

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491416 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.26

(51) Int. Cl. C07K 14/18 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01)  
C12N 7/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.11.28

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ МОЛЕКУЛ РНК

(31) 63/283,660

(32) 2021.11.29

(33) US

(86) PCT/US2022/080515

(87) WO 2023/097317 2023.06.01

(71) Заявитель:  
РЕПЛИКЕЙТ БАЙОСАЙЕНС, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Ван Натаниэль Стефен, Мияке-  
Стоунер Сигеки Джозеф, Алияхмад  
Париназ (US)

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

(57) Настоящее изобретение в целом относится к новым способам получения систем самореплицирующейся РНК (srRNA) с превосходными свойствами экспрессии. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам и рекомбинантным клеткам, экспрессирующим такие конструкции srRNA, а также к фармацевтическим композициям, содержащим их. Кроме того, предложены композиции и способы вызова фармакодинамических эффектов у субъекта и для профилактики и/или лечения различных заболеваний.

ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ МНОЖЕСТВА КОНСТРУКЦИЙ ЭКСПРЕССИИ SRRNA, КАЖДАЯ ИЗ КОТОРЫХ СОДЕРЖИТ КОДИРУЮЩУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ИНТЕРЕСУЮЩЕЙ ПОЛИПЕПТИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ (РС), ФУНКЦИОНАЛЬНО ВСТРОЕННУЮ В АЛЬФАВИРУСНЫЙ ВЕКТОР SRRNA. ПРИЧЕМ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ЧАСТЬ КОДИРУЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ АЛЬФАВИРУСНЫХ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ЗАМЕНЕНА КОДИРУЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ РС



АНАЛИЗ УРОВНЯ ИЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ РС, КОТОРЫЕ ЭКСПРЕССИРУЮТ ВО МНОЖЕСТВЕ КОНСТРУКЦИЙ ЭКСПРЕССИИ SRRNA, ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОДНОГО ИЛИ БОЛЕЕ КАНДИДАТОВ РС, ИМЕЮЩИХ ОПРЕДЕЛЕННОЕ СВОЙСТВО



ОБЪЕДИНЕНИЕ КОНСТРУКЦИЙ ЭКСПРЕССИИ SRRNA, СПОСОБНЫХ ЭКСПРЕССИРОВАТЬ КАНДИДАТЫ РС, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ НА ЭТАПЕ (В), ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ, С ОДНИМ СРЕДСТВОМ ДОСТАВКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМБИНАТОРНОЙ КОЛЛЕКЦИИ СИСТЕМ ДОСТАВКИ



АНАЛИЗ СИСТЕМ ДОСТАВКИ НА ПРЕДМЕТ ИХ СПОСОБНОСТИ ОКАЗЫВАТЬ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДИН ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ У СУБЪЕКТА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОНСТРУКЦИИ ЭКСПРЕССИИ SRRNA, СПОСОБНОЙ ОКАЗЫВАТЬ НУЖНЫЙ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ

A1

202491416

202491416

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 581358EA/061

### СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ МОЛЕКУЛ РНК

#### Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/283660, поданной 29 ноября 2021 г. Раскрытие вышеупомянутой заявки полностью включено в настоящий документ посредством ссылки, включая любые чертежи.

#### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0002] Настоящее изобретение относится к области иммунологии и медицины и, в частности, относится к новым способам получения репликонов, например, самореплицирующихся молекул РНК (srRNA), с превосходными свойствами экспрессии. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам и рекомбинантным клеткам, экспрессирующим такие молекулы srRNA, а также к фармацевтическим композициям, содержащим их. Кроме того, предложены композиции и способы вызова фармакодинамических эффектов у субъекта и профилактики и/или лечения различных заболеваний.

#### Включение списка последовательностей

[0003] Материал из прилагаемого перечня последовательностей включен в настоящую заявку посредством ссылки. Сопроводительный текстовый файл списка последовательностей с именем 058462-506001WO\_Sequence\_Listing\_ST26.xml был получен 22 ноября 2022 г., его размер составляет 14 КБ.

#### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0004] В последние годы несколько различных групп вирусов животных подвергали генетическим манипуляциям либо путем гомологичной рекомбинации, либо путем прямой инженерии их геномов. Доступность систем обратной генетики как для ДНК, так и для РНК-вирусов открыла новые перспективы для использования рекомбинантных вирусов, например, в качестве вакцин, векторов экспрессии, противоопухолевых средств, векторов генной терапии *in vivo* и средств доставки лекарств.

[0005] Недавние достижения в этом отношении включают рекомбинантные репликоны, например, самореплицирующуюся РНК (srRNA), которые происходят из геномов РНК-вирусов с положительной цепью и представляют собой мощный инструмент для разработки новых безопасных и эффективных вакцин и средств доставки лекарств. В частности, srRNA поддерживает аутореplikативную активность, полученную из РНК-вирусного вектора, и, следовательно, может реплицироваться в клетках-хозяевах, что приводит к амплификации некоторого количества РНК, кодирующей нужный генный продукт, и может использоваться для повышения эффективности доставки РНК и/или экспрессии кодируемых генных продуктов для терапевтического и/или профилактического применения. Например, при применении вакцин вакцины на основе srRNA более выгодны по сравнению с нереplikативными РНК (например mRNA),

поскольку они сохраняют преимущества mRNA-вакцин, такие как быстрая разработка, модульная конструкция и бесклеточный синтез, но требуется более низкая доза РНК из-за свойств саморепликации. Это снижает нагрузку на получение как фармацевтической субстанции, так и продукта и является потенциально выгодным в контексте реагирования на пандемию, поскольку позволит вакцинировать больший процент населения за более короткий промежуток времени.

[0006] Хотя в последние годы был достигнут огромный прогресс в технологиях srRNA, сохраняется потребность в дополнительных способах быстрого получения новых инструментов экспрессии на основе srRNA для экспрессии *in vivo* или *ex vivo* генных продуктов, таких как терапевтические полипептиды, в количествах и в течение определенного периода времени, достаточного для достижения терапевтического и/или профилактического эффекта.

### **Сущность настоящего изобретения**

[0007] Настоящее изобретение в целом относится к новым способам идентификации и/или характеристики конструкций самореплицирующейся РНК (srRNA), например, репликонов, с превосходными свойствами экспрессии, которые подходят для экспрессии представляющих интерес рекомбинантных полипептидов, таких как, например, молекулы антигена и биотерапевтические молекулы, в культурах клеток или в живых организмах для профилактического и/или терапевтического применения. Также раскрыты нуклеиновые кислоты и рекомбинантные клетки, экспрессирующие такие конструкции srRNA, а также фармацевтические композиции, содержащие их. В настоящем документе также раскрыты способы вызова фармакодинамического эффекта у субъекта и, в частности, способы вызова иммунного ответа и способы предотвращения и/или лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способы включают профилактическое или терапевтическое введение одной или более конструкций srRNA, конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или фармацевтической композиции согласно раскрытию.

[0008] В одном аспекте изобретения в настоящем документе предложены способы идентификации и/или характеристики конструкции самореплицирующейся РНК (srRNA), например, репликона, причем способ включает: (a) предоставление множества экспрессирующих srRNA конструкций, каждая из которых содержит кодирующую последовательность интересующей полипептидной конструкции (PCI), функционально встроенную в альфавирусный вектор srRNA, причем по меньшей мере часть кодирующей последовательности для альфавирусных структурных белков заменена кодирующей последовательностью PCI; (b) анализ уровня и/или функциональности PCI, которые экспрессируются из множества конструкций экспрессии srRNA, для идентификации одного или более кандидатов PCI, имеющих определенное свойство; (c) объединение экспрессирующих srRNA конструкций, способных экспрессировать кандидаты PCI, идентифицированные на этапе (b), по меньшей мере, с одним средством доставки для получения комбинаторной коллекции систем доставки; и (d) анализ систем доставки на

предмет их способности оказывать по меньшей мере один фармакодинамический эффект у субъекта для идентификации конструкции экспрессии srRNA, способной оказывать нужный фармакодинамический эффект.

[0009] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления способов согласно настоящему изобретению могут включать в себя один или несколько следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность PCI содержит последовательность, кодирующую одиночный полипептид (например моногенную PCI) или последовательности, кодирующие множество полипептидов, (например мультигенную PCI). В некоторых вариантах осуществления последовательности, кодирующие множество полипептидов, функционально связаны друг с другом внутри одной открытой рамки считывания (т.е. в полицистронной ORF). В некоторых вариантах осуществления множество полипептидов функционально связаны друг с другом посредством одной или нескольких соединительных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления соединительная последовательность из множества соединительных последовательностей содержит аутопротеолитическую пептидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления аутопротеолитическая пептидная последовательность содержит одну или несколько последовательностей аутопротеолитического расщепления, полученных из кальцийзависимой сериновой эндопротеазы (фурина), свиного тековируса-1 2A (P2A), вируса ящура (FMDV) 2A (F2A), вируса ринита лошадей A (ERAV) 2A (E2A), вируса *Thea asigna* 2A (T2A), вируса цитоплазматического полиэдроса 2A (BmCPV2A), вируса Flacherie 2A (BmIFV2A) или их комбинации.

[0010] В некоторых вариантах осуществления последовательности, кодирующие множество полипептидов, функционально связаны друг с другом посредством одного или нескольких внутренних сайтов связывания рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления один или несколько IRES выбирают из вирусного IRES, клеточного IRES и искусственного IRES. В некоторых вариантах осуществления один или несколько IRES выбирают из IRES, ассоциированного с герпесвирусом саркомы Капоши (KSHV), IRES вируса гепатита, IRES Pestivirus, IRES Cripavirus, IRES вируса *Rhopalosiphum Padi*, IRES фактора роста фибробластов, IRES фактора роста тромбоцитов, IRES фактора роста эндотелия сосудов, IRES инсулиноподобного фактора роста, IRES picornavirus, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), IRES Pim-1, IRES p53, IRES Araf-1, IRES TDP2, IRES L-мус и IRES c-мус.

[0011] В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько полипептидов, выбранных из микробных белков, белков вирусов, белков бактерий, белков грибов, белков млекопитающих и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько полипептидов, выбранных из молекул антигена, биотерапевтических молекул или комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько антигенных полипептидов, выбранных из опухолеассоциированных антигенов, опухолеспецифических антигенов,

неоантигенов и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления один или несколько антигенных полипептидов включают рецепторы эстрогена, ферменты-преобразователи внутриклеточных сигналов и эпидермальные рецепторы роста человека. В некоторых вариантах осуществления один или несколько антигенных полипептидов выбирают из ESR1, PI3K, HER2, HER3, вариантов любого из них и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько биотерапевтических полипептидов, выбранных из иммуномодуляторов, модуляторов ангиогенеза, модуляторов внеклеточного матрикса, модуляторов метаболизма, неврологических модуляторов и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько цитокинов, выбранных из хемокинов, интерферонов, интерлейкинов, лимфокинов и факторов некроза опухоли. В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько интерлейкинов, выбранных из IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, IL-35, IFN $\gamma$  и субъединицы любых из них. В некоторых вариантах осуществления один или несколько биотерапевтических полипептидов выбирают из IL-12A, IL-12B, IL-1RA и комбинаций любых из них.

[0012] В некоторых вариантах осуществления этап (а) способов, описанных в настоящем документе, включает предоставление множества конструкций экспрессии srRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI. В некоторых вариантах осуществления предоставление в (а) включает: (i) получение вектора экспрессии srRNA альфавируса, в котором по меньшей мере часть кодирующей последовательности структурных белков альфавируса заменена кодирующей последовательностью интересующей полипептидной конструкции (PCI); и (ii) получение множества конструкций экспрессии srRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI. В некоторых вариантах осуществления предоставление в (а) включает: (i) получение кодирующих последовательностей для множества вариантов представляющей интерес полипептидной конструкции (PCI); и (ii) получение множества конструкций экспрессии srRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI из множества вариантов PCI из (а), функционально вставленных в вектор srRNA альфавируса, где по меньшей мере часть кодирующей последовательности для альфавирусных структурных белков заменена последовательностью, кодирующей вариант PCI.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, вариант PCI из множества вариантов PCI имеет одно или несколько молекулярных изменений. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько молекулярных изменений в варианте PCI выбирают из группы, состоящей из делеций, замен, вставок, дубликаций, мутаций, вариантов сдвига рамки считывания, вариантов сплайсинга и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько молекулярных изменений объединены в множество кассет изменений, расположенных тандемно по длине антигенной последовательности. В некоторых

вариантах осуществления кассета изменений из множества кассет изменений содержит одно, два, три, четыре, пять или более молекулярных изменений. В некоторых вариантах осуществления множество кассет изменений функционально связаны друг с другом одним или несколькими линкерами. В некоторых вариантах осуществления линкер из одного или нескольких линкеров представляет собой синтетический соединительный линкер или пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAY, EAAAK (SEQ ID NO: 1), RVRR (SEQ ID NO: 2), GGGGS (SEQ ID NO: 3) и GP GPG (SEQ ID NO: 4).

[0014] В некоторых вариантах осуществления анализ уровня и/или функциональности PCI на этапе (b) проводят *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления анализ уровня и/или функциональности PCI включает в себя иммуноблоттинг, флуоресцентную проточную цитометрию, иммуноферментный анализ, анализ иммуногенности, анализ биоактивности и/или эффективности на модели заболевания. В некоторых вариантах осуществления анализ систем доставки на предмет их способности оказывать по меньшей мере один фармакодинамический эффект на этапе (d) проводят *in vivo* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один фармакодинамический эффект включает в себя одно или несколько из следующих: эффект иммуногенности, ответ биомаркера, терапевтический эффект, профилактический эффект, нужный эффект, нежелательный эффект, неблагоприятный эффект и эффект в модели заболевания. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один фармакодинамический эффект включает в себя вызов иммунного ответа.

[0015] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, системы доставки включают физиологический буфер, липосому, наночастицу на основе липидов (LNP), полимерную наночастицу, частицу вирусного репликаона (VRP), микросферу, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), конъюгат биоактивного лиганда или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления система доставки LNP представляет собой катионный липид, ионизируемый катионный липид, анионный липид или нейтральный липид. В некоторых вариантах осуществления система доставки LNP представляет собой ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, состоящей из ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления LNP представляет собой катионный липид, выбранный из группы, состоящей из 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1, 7C1 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления LNP представляет собой нейтральный липид, выбранный из группы, состоящей из DPSC, DPPC, POPC, DOPE, SM и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления LNP представляет собой липид, выбранный из группы, состоящей из C12-200, C14-PEG2000, DOPE, DMG-PEG2000, DSPC, DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерина, DOTAP-холестерина, GAP-DMORIE-DPPE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоля (PEG).

[0016] В некоторых вариантах осуществления для получения LNP липиды могут

быть объединены в любом количестве молярных соотношений. Кроме того, для получения LNP полинуклеотид (полинуклеотиды) можно комбинировать с липидом (липидами) в широком диапазоне молярных соотношений. В некоторых вариантах осуществления, где системы доставки, описанные в настоящем документе, включают LNP, массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 100:1 до примерно 3:1, от примерно 70:1 до 10:1 или от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 20:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 8:1.

[0017] В некоторых вариантах осуществления наночастицы на основе липидов (LNP) имеют средний диаметр менее примерно 1000 нм, примерно 500 нм, примерно 250 нм, примерно 200 нм, примерно 150 нм, примерно 100 нм, примерно 75 нм, примерно 50 нм или примерно 25 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют средний диаметр примерно от 70 нм до 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 88 нм до примерно 92 нм, от примерно 82 нм до примерно 86 нм или от примерно 80 нм до примерно 95 нм.

[0018] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, рекомбинантная srRNA альфавируса представляет собой вирус, принадлежащий к роду Alphavirus семейства Togaviridae. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная srRNA альфавируса представляет собой альфавирус, принадлежащий к группе VEEV/EEEV, или группе SFV, или группе SINV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV), вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV), вирус Everglades (EVEV), вирус Mucambo (MUCV), вирус Pixuna (PIXV), вирус Middleburg (MIDV), вирус Chikungunya (CHIKV), вирус O'Nyong-Nyong (ONNV), вирус Ross River (RRV), вирус Barmah Forest (BF), вирус Getah (GET), вирус Sagiyama (SAGV), вирус Bebaru (BEBV), вирус Mayaro (MAYV), вирус Una (UNAV), вирус Sindbis (SINV), вирус Aura (AURAV), вирус Whataroa (WHAV), вирус Babanki (BABV), вирус Kyzylgach (KYZV), вирус западного лошадиного энцефалита (WEEV), вирус Highland J (HJV), вирус Fort Morgan (FMV), вирус Ndumu (NDUV), вирус Madariaga (MADV) или вирус Buggy Creek. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой VEEV, EEEV, CHIKV или SINV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой VEEV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой EEEV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой CHIKV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой SINV.

[0019] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, вектор экспрессии srRNA идентифицирован как обладающий

иммуноиндуцирующей активностью, подходящей для профилактического применения и/или терапевтического применения. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии srRNA идентифицирован как обладающий иммуноиндуцирующей активностью, подходящей для профилактического применения. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии srRNA идентифицирован как обладающий иммуноиндуцирующей активностью, подходящей для терапевтического применения.

[0020] В одном аспекте в настоящем документе представлены конструкции srRNA, идентифицированные в соответствии с описанным в настоящем документе способом.

[0021] В другом аспекте в настоящем документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие конструкцию srRNA, описанную в настоящем документе.

[0022] В еще одном аспекте в настоящем документе представлены рекомбинантные клетки, содержащие (а) конструкцию РНК, которая описана в настоящем документе; и/или (b) нуклеиновую кислоту, которая описана в настоящем документе. Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления способов согласно настоящему изобретению могут включать в себя один или несколько следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку насекомого. В некоторых вариантах осуществления клетка насекомого представляет собой клетку комара. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой В-клетку, моноцит, естественную клетку-киллер (NK), естественную Т-клетку киллер (NKT), базофил, эозинофил, нейтрофил, дендритную клетку (DC), макрофаг, регуляторную Т-клетку, Т-хелперную клетку (TH), цитотоксическую Т-клетку (TCTL), Т-клетку памяти, гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клетку, гемопоэтическую стволовую клетку или предшественника гемопоэтической стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой В-клетку, Т-клетку или дендритную клетку (DC).

[0023] В родственном аспекте в настоящем документе представлены клеточные культуры, содержащие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, которая раскрыта в настоящем документе, и среду для культуры клеток.

[0024] В еще одном аспекте в настоящем документе предложены композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие терапевтически приемлемый наполнитель и одно или несколько из следующего: (а) конструкцию РНК, которая описана в настоящем документе; и/или (b) нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе; и (c) рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе.

[0025] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления композиций,

описанных в настоящем документе, могут иметь одну или несколько из следующих характеристик. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена в виде вакцины. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой терапевтическую вакцину. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена как иммуногенная композиция. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена как биотерапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена с использованием средства доставки в систему доставки. В некоторых вариантах осуществления система доставки содержит физиологический буфер, липосому, наночастицу на основе липидов (LNP), полимерную наночастицу, частицу вирусного репликона (VRP), микросферу, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), конъюгат биоактивного лиганда или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления система доставки LNP содержит катионный липид, ионизируемый катионный липид, анионный липид или нейтральный липид. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, состоящей из ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит катионный липид, выбранный из группы, состоящей из 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1, 7C1 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит нейтральный липид, выбранный из группы, состоящей из DPSC, DPPC, POPC, DOPE, SM и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит липид, выбранный из группы, состоящей из C12-200, C14-PEG2000, DOPE, DMG-PEG2000, DSPC, DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерина, DOTAP-холестерина, GAP-DMORIE-DPYPE, GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоля (PEG) и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 100:1 до примерно 3:1, примерно от 70:1 до 10:1 или от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 20:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 8:1. В некоторых вариантах осуществления наночастицы на основе липидов (LNP) имеют средний диаметр менее примерно 1000 нм, примерно 500 нм, примерно 250 нм, примерно 200 нм, примерно 150 нм, примерно 100 нм, примерно 75 нм, примерно 50 нм или примерно 25 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 70 нм до 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 88 нм до примерно 92 нм, от примерно 82 нм до примерно 86 нм или от примерно 80 нм до примерно 95 нм.

[0026] В другом аспекте в настоящем документе представлены способы вызова фармакодинамического эффекта у субъекта, причем способы включают введение субъекту

композиции, содержащей одно или несколько из следующего: (a) конструкцию srRNA, которая описана в настоящем документе; (b) нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе; (c) рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе; и (d) фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармакодинамический эффект содержит возникновение иммунного ответа у субъекта. В другом аспекте в настоящем документе предложены способы предотвращения или лечения заболевания у субъекта, причем способы включают профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, содержащей одно или несколько из следующего: (a) конструкцию srRNA, описанную в настоящем документе; (b) нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе; (c) рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе; и (d) фармацевтическую композицию, которая описана в настоящем документе.

[0027] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления способов вызова фармакодинамического эффекта, и/или предотвращения, и/или лечения заболевания у субъекта, которые описаны в настоящем документе, могут иметь один или несколько следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления введенная композиция вызывает выработку одной или нескольких провоспалительных молекул у субъекта. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько провоспалительных молекул включают гамма-интерферон ( $IFN\gamma$ ), цитокины, TNF- $\alpha$ , GM-CSF и MIP1 $\alpha$ , гранзим B, гранзим A, перфорин или комбинацию любых из них. В некоторых вариантах осуществления субъекта ранее лечили с помощью одного или нескольких способов лечения, и у него развилась по меньшей мере частичная резистентность к указанному одному или нескольким способам лечения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из одного или нескольких способов лечения предусматривает малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой пролиферативное заболевание, воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или микробную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется или подозревается наличие заболевания, связанного с пролиферативным расстройством, воспалительным заболеванием, аутоиммунным заболеванием или микробной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления пролиферативное заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в сочетании по меньшей мере с одним дополнительным способом терапии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный способ лечения выбирают из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсинотерапии, таргетной терапии и хирургического вмешательства.

[0028] В другом аспекте в настоящем документе представлены наборы для применения на практике способа согласно настоящему изобретению, например, для вызова иммунного ответа, для профилактики и/или лечения заболевания, наборы

включают одно или несколько из следующего: (a) конструкцию srRNA, описанную в настоящем документе; (b) конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе; (c) рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе; и (d) фармацевтическую композицию, которая описана в настоящем документе.

[0029] Приведенное выше краткое изложение носит исключительно иллюстративный характер и не предназначено для каких-либо ограничений. В дополнение к иллюстративным вариантам осуществления и признакам, описанным в настоящем документе, дополнительные аспекты, варианты осуществления, объекты и признаки изобретения станут полностью очевидными из чертежей, подробного описания и формулы изобретения.

### **Краткое описание чертежей**

[0030] На фиг. 1 представлена блок-схема, иллюстрирующая неограничивающий пример способа идентификации и/или характеристики конструкции самореплицирующейся РНК (srRNA) в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0031] На фиг. 2 представлено графическое изображение иммуногенности у мышей, использованное для оптимизации конструкции кассеты мутантного антигена ESR1. На оси X указан порядковый номер мутаций ESR1 K303R, E380Q, Y537C, Y537S, Y537N и D538G в генной кассете, а также использование линкеров, соединяющих эти мутации. На оси Y показаны общие ответы Т-клеток с использованием пептидов, кодирующих последовательности ESR1, в анализе ELISpot.

[0032] На фиг. 3 представлены фигуры, показывающие экспрессию белка из клеток ВНК-21, трансфицированных моногенными, бигенными или тетрагенными srRNA, кодирующими ESR1, PI3K, HER2 и HER3, из панели конструкций, имеющих различные молекулярные конфигурации, и сравнение их с моногенными конструкциями. Уровням экспрессии белка моногенных конструкций присваивается значение «1», а относительная экспрессия каждого гена в бигенных или тетрагенных конфигурациях сравнивается с уровнями экспрессии белка моногенной конструкции. На фиг. 3A представлен иммуноблоттинг экспрессии белка ESR1. На фиг. 3B представлена диаграмма, показывающая относительную экспрессию ESR1 на основании интенсивности сигнала полос иммуноблота. На фиг. 3C представлен иммуноблоттинг для экспрессии белка PI3K. На фиг. 3D представлена диаграмма, показывающая относительную экспрессию PI3K на основе интенсивности сигнала полос иммуноблота. На фиг. 3E представлена диаграмма, показывающая относительную экспрессию HER2 на основе средней интенсивности флуоресценции (MFI), определенной количественно с помощью флуоресцентной проточной цитометрии (FFC) после окрашивания меченным Alexa Fluor® 488 (AF488), специфичным к HER2 антителом. На фиг. 3F представлена диаграмма, показывающая относительную экспрессию HER3 на основе MFI, количественно определенной с помощью FFC, после окрашивания меченным аллофикоцианином (APC), специфичным к HER3 антителом. На фиг. 3G представлена диаграмма паука, суммирующая показания

экспрессии белков ESR1, PI3K, HER2 и HER3 на панели конструкций.

[0033] На фиг. 4 показано графическое представление ответов Т-клеток у мышей, которым вводили конструкции, имеющие различные молекулярные конфигурации. На оси X показаны различные конструкции в моногенной, бигенной или тетрагенной форме, имеющие разную структуру ESR1, PI3K, HER2 и HER3. На оси Y показаны общие ответы Т-клеток на пептиды, кодирующие последовательности, полученные в результате мутаций ESR1, HER2 и HER3, в анализе ELISpot. В этом эксперименте не измеряли ответы PI3K, поскольку он не формирует ответы у мышей BALB/c.

[0034] На фиг. 5 представлена схема иллюстративной кассеты неоантигена. Пептиды, содержащие мутации, разделены линкерами для получения единой кассеты.

[0035] На фиг. 6 показано графическое представление ответов Т-клеток у мышей, которым вводили конструкции, имеющие разные векторы sgRNA и составленные в виде двух разных липидных наночастиц, отличающихся катионным липидом либо LNP1 («L1»), либо LNP2 («L2») в композиции.

[0036] На фиг. 7 представлена схема, описывающая два типа (т.е. терапевтический и профилактический) исследований на модели заболевания человека эффективности против рака молочной железы, положительного по рецептору эстрогена.

[0037] На фиг. 8А-8В представлено графическое изображение экспрессии белка *in vitro* из моногенных и мультигенных конструкций sgRNA VEEV. Супернатанты трансфицированных клеток ВНК-21 каждой конструкцией sgRNA использовали для измерения экспрессии белка, определенной с помощью ELISA. На фиг. 8А показаны результаты ELISA IL-12. По оси X показаны различные протестированные конструкции. На фиг. 8В показаны результаты ELISA IL-RA. По оси X показаны различные протестированные конструкции.

[0038] На фиг. 9А-9В представлено графическое изображение биоактивности белков *in vitro* из моногенных и мультигенных конструкций при VEE. Супернатанты трансфицированных клеток ВНК-21 каждой конструкцией sgRNA использовали для измерения белковой биоактивности цитокинов в репортерных клетках, экспрессирующих родственные им рецепторы. На фиг. 9А показаны результаты биоанализа IL-12. По оси X показаны различные протестированные конструкции. На фиг. 9В показаны результаты анализа биоактивности IL-1RA. По оси X показаны различные протестированные конструкции.

[0039] На фиг. 10 показано графическое представление объединенных данных о биоактивности IL-12 и экспрессии IL-1RA из конструкций sgRNA.

[0040] На фиг. 11А-11В показаны графические изображения экспрессии белка из двух лучших мультигенных конфигураций, клонированных в шесть различных векторов sgRNA. На фиг. 11А показаны результаты ELISA IL-12. По оси X показаны различные протестированные конструкции. На фиг. 11В показаны результаты ELISA IL-RA. По оси X показаны различные протестированные конструкции.

[0041] На фиг. 12А-12В показано графическое представление биоактивности

белков двух лучших мультигенных конфигураций, клонированных в шесть различных векторов srRNA. На фиг. 12А показаны результаты биоанализа IL-12. По оси X показаны различные протестированные конструкции. На фиг. 12В показаны результаты биоанализа IL-1RA. По оси X показаны различные протестированные конструкции.

[0042] На фиг. 13 показано графическое представление, суммирующее биологическую активность L-12 и IL-1RA двух лучших мультигенных конфигураций в шести различных векторах srRNA.

[0043] На фиг. 14А-14В показано графическое представление экспрессия белка *in vivo* в сыворотке мыши с помощью двух лучших бигенных конфигураций в шести различных векторах srRNA. На фиг. 14А показаны результаты ELISA IL-12. По оси X показаны различные протестированные конструкции. На фиг. 14В показаны результаты ELISA IL-1RA. По оси X показаны различные протестированные конструкции.

[0044] На фиг. 15А-15В показано графическое изображение экспрессии белков *in vivo* из различных составов оптимальных конструкций srRNA. На фиг. 15А показаны результаты ELISA IL-12. На оси X показаны различные протестированные конструкции и препараты. На фиг. 15В показаны результаты ELISA IL-1RA. На оси X показаны различные протестированные конструкции и препараты.

[0045] На фиг. 16А-16В представлены гистограммы, иллюстрирующие иммуногенность *in vivo* панели srRNA, кодирующей иллюстративный вирусный антиген, который представляет собой гликопротеин оболочки G вируса бешенства (RABV-G). В состав панели вошли srRNA, полученные из вируса венесуэльского лошадиного энцефалита (VEE.TC83), штаммов вируса Chikungunya S27 (CHIK.S27) и DRDE-06 (CHIK.DRDE), штаммов вируса Sindbis Girdwood (SIN.GW) и AR86-Girdwood Hybrid 1 (SIN.AR86) и вируса восточного лошадиного энцефалита (EEE.FL93). На фиг. 16А показано количественное определение антигенспецифических Т-клеточных ответов селезенки, оцененных с помощью ELISpot после двух иммунизаций. На фиг. 16В показаны титры антирабических нейтрализующих антител из сыворотки после двух иммунизаций.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

[0046] Настоящее изобретение в целом относится к новым способам идентификации и/или характеристики конструкций самореплицирующейся РНК (srRNA), например, репликонов, с превосходными свойствами экспрессии, которые подходят для экспрессии представляющих интерес рекомбинантных полипептидов, таких как, например, антигенные молекулы и биотерапевтические молекулы в культурах клеток или в живых организмах для профилактического и/или терапевтического применения. Соответственно, конструкции srRNA, идентифицированные с помощью способов, раскрытых в настоящем документе, также входят в объем изобретения. Некоторые аспекты и варианты осуществления изобретения относятся к рекомбинантным нуклеиновым кислотам и рекомбинантным клеткам, которые были сконструированы для экспрессии конструкций srRNA, раскрытых в настоящем документе, а также к

фармацевтическим композициям, содержащим их. Некоторые другие аспекты и варианты осуществления изобретения относятся к композициям и способам вызова фармакодинамических эффектов у субъекта и профилактики и/или лечения различных заболеваний.

[0047] Как описано выше, доступность систем обратной генетики как для ДНК, так и для РНК-вирусов в последние годы создала новые перспективы для использования рекомбинантных вирусов, например, в качестве вакцин, векторов экспрессии, противоопухолевых средств, векторов генной терапии и средств доставки лекарственных средств. Например, продолжает расширяться применение модифицированных вирусных векторов для экспрессии генов в клетках-хозяевах. В частности, многие экспрессирующие векторы на основе вирусов были использованы для экспрессии гетерологичных белков в культивируемых рекомбинантных клетках. Недавние достижения в этом отношении включают дальнейшую разработку способов и систем для получения многосубъединичных белковых комплексов и совместную экспрессию ферментов, модифицирующих белок, для улучшения получения гетерологичных белков. Другие недавние достижения в области технологий вирусных векторов экспрессии включают множество передовых вариантов применения геномной инженерии для регулирования экспрессии генов, получения вирусных векторов, применения генной терапии *in vivo* и получения векторов для доставки вакцин.

[0048] Конструкции самоамплифицирующейся РНК (srRNA), которая описана в настоящем документе, например, при доставке в клетку (например клетку-хозяина) или субъекту, могут амплифицироваться и инициировать экспрессию и/или сверхэкспрессию гетерологичных генных продуктов в клетке-хозяине или у субъекта. Самореплицирующиеся конструкции РНК (например репликоны) согласно настоящему изобретению, в отличие от mRNA, используют для амплификации собственную кодируемую вирусную полимеразу. Конкретные конструкции srRNA согласно настоящему изобретению, такие как конструкции на основе альфавирусов, генерируют большие количества субгеномных mRNA, из которых могут быть экспрессированы большие количества гетерологичных белков.

[0049] В некоторых вариантах осуществления srRNA, описанные в настоящем документе, основаны на РНК-вирусах (например альфавирусах) и могут использоваться в качестве надежных систем экспрессии. Например, сообщалось, что преимущество использования альфавирусов, таких как вирус Chikungunya (CHIKV), вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV), вирус Sindbis (SINV), в качестве векторов вирусной экспрессии, заключается в том, что они могут направлять синтез больших количеств рекомбинантных белков в рекомбинантных клетках-хозяевах. Помимо других преимуществ, полипептиды, такие как терапевтические одноцепочечные антитела, могут быть наиболее эффективными, если они в больших количествах экспрессируются *in vivo*. Кроме того, для получения рекомбинантных антител, очищенных из клеток в культуре (*ex vivo*), высокая экспрессия белка из srRNA (например репликона) может увеличить общий

выход продукта антитела. Более того, если экспрессируемый белок является вакцинным антигеном, высокий уровень экспрессии может вызвать наиболее сильный иммунный ответ *in vivo*.

[0050] В следующем подробном описании сделаны ссылки на прилагаемые чертежи, которые являются его частью. На чертежах аналогичные символы обычно обозначают аналогичные компоненты, если из контекста не следует иное. Иллюстративные альтернативы, описанные в подробном описании, чертежах и формуле изобретения, не предназначены для ограничения. Могут использоваться другие альтернативы и вноситься другие изменения, не выходя за пределы сущности и объема представленного в настоящем документе предмета. Будет легко понять, что аспекты, которые в общем описаны в настоящем документе и проиллюстрированы на фигурах, могут быть расположены, заменены, объединены и сконструированы с широким разнообразием различных конфигураций, каждая из которых явно предусмотрена и составляет часть данной заявки.

### **Определения**

[0051] Если не указано иное, все термины в области техники, обозначения и другие научные термины или терминология, используемые в настоящем документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится данная заявка. В некоторых случаях термины с общепонятными значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для удобства использования, и включение таких определений в настоящий документ не обязательно должно быть истолковано как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области техники. Многие из способов и методов, описанных или упомянутых в настоящем документе, хорошо понятны и обычно применяются специалистами в данной области техники с использованием традиционной методологии.

[0052] Формы единственного числа включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Например, термин «клетка» включает в себя одну или несколько клеток, включая их смеси. «А и/или В» используются в настоящем документе для включения всех следующих альтернатив: «А», «В», «А или В» и «А и В».

[0053] Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, включают «содержащие», «состоящие» и «по существу состоящие из» аспекты и варианты осуществления. В настоящем документе термин «содержащий» является синонимом слов «включающий», «закрывающий в себе» или «характеризующийся» и является включающим или открытым и не исключает дополнительных, неперечисленных элементов или этапов способа. В рамках настоящего изобретения термин «состоящий» исключает любые элементы, этапы или ингредиенты, не указанные в заявленной композиции или способе. В рамках настоящего изобретения термин «состоящий по существу из» не исключает материалы или этапы, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленной композиции или способа. Любое упоминание в настоящем документе термина «содержащий», в частности,

в описании компонентов композиции или в описании стадий способа, понимается как охватывающее те композиции и способы, состоящие по существу из перечисленных компонентов или стадий и состоящие из них.

[0054] Термины «введение» и любые их грамматические варианты, используемые в настоящем документе, относятся к доставке биоактивной композиции или препарата путем введения, включая, помимо прочего, интраназальный, чрескожный, внутривенный, внутриартериальный, внутримышечный, интранодальный, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное, пероральное, интравагинальное и местное введение или их комбинации. Этот термин включает в себя, помимо прочего, введение медицинским работником и самостоятельное введение.

[0055] Термины «клетка», «культура клеток» и «линия клеток» относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, культуре клеток или линии клеток, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки, культуры клеток или линии клеток, независимо от количества переносов или пассажей в культуре. Следует понимать, что не все потомство в точности идентично родительской клетке. Это связано с тем, что в последующих поколениях могут происходить определенные модификации из-за мутаций (например преднамеренных или случайных мутаций) или влияний окружающей среды (например метилирования или других эпигенетических модификаций), так что потомство может фактически не быть идентично родительской клетке, но все же включено в объем термина, используемого в настоящем документе, при условии, что потомство сохраняет ту же функциональность, что и исходная клетка, клеточная культура или клеточная линия.

[0056] Термин «конструкция» относится к рекомбинантной молекуле, например, рекомбинантной нуклеиновой кислоте или полипептиду, включая одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей из гетерологичных источников. Например, полипептидные конструкции могут представлять собой химерные полипептидные молекулы, в которых две или более аминокислотные последовательности различного происхождения функционально связаны друг с другом в одной полипептидной конструкции. Аналогично, конструкции нуклеиновой кислоты могут представлять собой химерные молекулы нуклеиновой кислоты, в которых две или более последовательности нуклеиновой кислоты различного происхождения собраны в одну молекулу нуклеиновой кислоты. Репрезентативные конструкции нуклеиновой кислоты могут включать любые рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, линейные или кольцевые, одноцепочечные или двухцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты ДНК или РНК, полученные из любого источника, такие как плазида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся полинуклеотидная молекула, фаг, способные к геномной интеграции или автономной репликации, включая молекулу нуклеиновой кислоты, в которой одна или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты функционально связаны. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько конструкций нуклеиновой кислоты могут быть включены (например вставлены) в одну молекулу нуклеиновой кислоты, например, в один вектор, или могут быть включены

(например вставлены) в две или более отдельные молекулы нуклеиновой кислоты, например два или более отдельных вектора. Термин «вектор» используется в настоящем документе для обозначения молекулы или последовательности нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Таким образом, термин «вектор» охватывает как векторы на основе ДНК, так и векторы на основе РНК. Термин «вектор» охватывает векторы клонирования и векторы экспрессии, а также вирусные векторы и интегрирующие векторы. «Вектор экспрессии» представляет собой вектор, который содержит регуляторную область и тем самым способен экспрессировать последовательности и фрагменты ДНК *in vitro*, *ex vivo* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать последовательности, которые управляют автономной репликацией в клетке, такие как, например, плаزمиды (вектор на основе ДНК) или самореплицирующийся РНК-вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать последовательности ДНК, которые можно транскрибировать в РНК *in vitro* и/или *in vivo*. Подходящие векторы представляют собой, например, плазмиды (например ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды, бактериальные искусственные хромосомы и вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления вектор согласно настоящему изобретению может представлять собой одноцепочечный вектор (например ssDNA или ssRNA). В некоторых вариантах осуществления вектор согласно настоящему изобретению может представлять собой двухцепочечный вектор (например dsDNA или dsRNA). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор доставки генов. В некоторых вариантах осуществления вектор используют в качестве средства доставки гена для переноса гена в клетку. В некоторых вариантах осуществления вектор согласно настоящему изобретению представляет собой вектор самореплицирующейся РНК (srRNA).

[0057] Термин «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество» композиции согласно настоящему изобретению, например, конструкций srRNA, конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций, обычно относится к количеству, достаточному чтобы композиция выполняла заявленную цель по сравнению с отсутствием композиции (например достигала эффекта, ради которого ее вводят, стимулировала иммунный ответ, предотвращала или лечила заболевание или уменьшала один или несколько симптомов заболевания, расстройства, инфицирования или нарушения здоровья). Примером «эффективного количества» является количество, достаточное для содействия лечению, профилактике или уменьшению симптома или симптомов заболевания, которое также можно назвать «терапевтически эффективным количеством». «Уменьшение» симптома означает уменьшение тяжести или частоты симптома (симптомов) или устранение симптома (симптомов). Точное количество композиции, содержащей «терапевтически эффективное количество», будет зависеть от

цели лечения и может быть установлено специалистом в данной области техники с использованием известных способов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[0058] Термин «голый», используемый в настоящем документе, относится к нуклеиновым кислотам, которые по существу не содержат других макромолекул, таких как липиды, полимеры и белки. «Голая» нуклеиновая кислота, такая как самореплицирующаяся РНК (например репликон), не входит в состав с другими макромолекулами для улучшения клеточного поглощения. Соответственно, голая нуклеиновая кислота не инкапсулирована, не абсорбирована и не связана с липосомой, микрочастицей, наночастицей, катионной эмульсией и т.п.

[0059] Термин «функционально связанный», используемый в настоящем документе, обозначает физическую или функциональную связь между двумя или более элементами, например, полипептидными последовательностями или полинуклеотидными последовательностями, которая позволяет им действовать по назначению. Например, термин «функционально связанный», когда он используется в контексте молекул нуклеиновой кислоты и конструкций srRNA, описанных в настоящем документе, или кодирующих последовательностей и промоторных последовательностей в конструкции нуклеиновой кислоты, означает, что кодирующие последовательности и промоторные последовательности находятся в рамке считывания с надлежащим пространственным расположением, чтобы обеспечить влияние соответствующего связывания факторами транскрипции или РНК-полимеразы на транскрипцию. Следует понимать, что функционально связанные элементы могут быть смежными или несмежными (например связанными друг с другом через линкер).

[0060] В контексте полипептидных конструкций термин «функционально связанный» относится к физической связи (например прямой или не прямой связи) между аминокислотными последовательностями (например различными сегментами, частями или доменами), обеспечивающей описанную активность конструкций. В настоящем описании область или домены конструкций согласно настоящему изобретению могут быть функционально связаны для сохранения правильного сворачивания, процессинга, нацеливания, экспрессии, связывания и других функциональных свойств конструкций в клетке. Если не указано иное, сегменты, части и домены конструкций согласно настоящему изобретению функционально связаны друг с другом. Функционально связанные сегменты, части и домены конструкций, раскрытых в настоящем документе, могут быть смежными или несмежными (например связанными друг с другом посредством линкера).

[0061] Термин «часть», используемый в настоящем документе, относится к фракции. Что касается конкретной структуры, такой как полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность или полипептид, термин

«часть» может обозначать непрерывную или прерывистую часть указанной структуры. Например, часть аминокислотной последовательности содержит по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% и по меньшей мере 90% аминокислот указанной аминокислотной последовательности. В дополнение или альтернативно, если часть представляет собой прерывистую фракцию, указанная прерывистая фракция состоит из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более частей структуры (например доменов белка), причем каждая часть является непрерывным элементом конструкции. Например, прерывистая фракция аминокислотной последовательности может состоять из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более, например, не более чем 4 частей указанной аминокислотной последовательности, где каждая часть содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 непрерывных аминокислот, по меньшей мере 10 непрерывных аминокислот, по меньшей мере 20 непрерывных аминокислот или по меньшей мере 30 непрерывных аминокислот аминокислотной последовательности.

[0062] Термин «фармацевтически приемлемый наполнитель», используемый в настоящем документе, относится к любому подходящему веществу, которое обеспечивает фармацевтически приемлемый носитель, добавку или разбавитель для введения субъекту представляющих интерес соединения (соединений). По существу, «фармацевтически приемлемый наполнитель» может представлять собой вещества, называемые фармацевтически приемлемыми разбавителями, фармацевтически приемлемыми добавками и фармацевтически приемлемыми носителями. В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя, помимо прочего, физиологический раствор, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и т.п., совместимые с фармацевтическим применением. Дополнительные активные соединения (например антибиотики и дополнительные терапевтические средства) также могут быть включены в композиции.

[0063] Термин «рекомбинантный», когда он используется по отношению к клетке, нуклеиновой кислоте, белку или вектору, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были изменены или получены в результате вмешательства человека, например, были изменены или являются результатом лабораторных способов. Так, например, рекомбинантные белки и нуклеиновые кислоты включают белки и нуклеиновые кислоты, полученные лабораторными способами. Рекомбинантные белки могут содержать аминокислотные остатки, не обнаруженные в нативной форме белка (нерекомбинантной или дикого типа), или могут содержать аминокислотные остатки, которые были модифицированы, например, мечены. Этот термин может включать любые модификации последовательности пептида, белка или нуклеиновой кислоты. Такие модификации могут включать следующее: любые химические модификации последовательности пептида, белка или нуклеиновой кислоты, включая одну или

несколько аминокислот, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов; добавление, удаление и/или замену одной или нескольких аминокислот в пептиде или белке; получение слитого белка, например, слитого белка, содержащего фрагмент антитела; и добавление, удаление и/или замену одной или нескольких нуклеиновых кислот в последовательности нуклеиновой кислоты. Термин «рекомбинантный», когда он используется по отношению к клетке, не предполагает включение встречающихся в природе клеток, а охватывает клетки, которые были сконструированы/модифицированы для включения или экспрессии полипептида или нуклеиновой кислоты, которые не присутствовали бы в клетке, если бы они не были сконструированы/модифицированы.

[0064] В рамках настоящего изобретения термин «субъект» или «индивидуум» включает в себя животных, таких как человек (например индивидуум-человек) и животных, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления «субъект» или «индивидуум» представляет собой пациента, находящегося под наблюдением врача. Таким образом, субъектом может быть пациент-человек или индивидуум, который болеет, имеет риск возникновения или подозревается наличие интересующего заболевания (например рака или инфекции) и/или одного или нескольких симптомов заболевания. Субъектом также может быть индивидуум, у которого диагностирован риск интересующего заболевания и/или состояния на момент постановки диагноза или позже. Термин «животные, отличные от человека», охватывает всех позвоночных, например, млекопитающих, например, грызунов, например, мышей, домашний скот, одомашненных животных и домашних животных, приматов, кроме человека, и других млекопитающих, таких как, например, овцы, кошки, собаки, коровы, куры, и не млекопитающих, таких как амфибии, рептилии и т. д.

[0065] Если указан диапазон значений, подразумевается, что в раскрытие включено каждое промежуточное значение с точностью до десятой единицы нижнего предела, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в этом заявленном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в изобретение, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон содержит один или оба предела, в раскрытие также включены диапазоны, исключаящие один или оба включенных предела.

[0066] В настоящем документе представлены определенные диапазоны, перед числовыми значениями стоит слово «примерно». Термин «примерно» используется в настоящем документе для обеспечения буквальной поддержки точного числа, которому он предшествует, а также числа, которое близко или примерно соответствует числу, которому предшествует этот термин. При определении того, является ли число близким или приблизительным к конкретно приведенному числу, близкое или приближающееся к нему не приведенное число может быть числом, которое в контексте, в котором оно представлено, обеспечивает существенный эквивалент конкретно приведенного числа.

Если степень приближения не ясна из контекста, «примерно» означает либо в пределах плюс или минус 10% предоставленного значения, либо округление до ближайшей значащей цифры, во всех случаях включая предоставленное значение. В некоторых вариантах осуществления термин «примерно» обозначает указанное значение  $\pm$  до 10%, до  $\pm$  5% или до  $\pm$  1%.

[0067] Рубрикаторы, например (a), (b), (i) и т.д., представлены просто для облегчения чтения описания и формулы изобретения. Использование рубрикаторов в описании или формуле изобретения не требует, чтобы этапы или элементы выполнялись в алфавитном или числовом порядке или в том порядке, в котором они представлены.

[0068] Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, включают «содержащие», «состоящие» и «состоящие по существу» аспекты и варианты осуществления. В настоящем документе термин «содержащий» является синонимом слов «включающий», «закрывающий в себе» или «характеризующийся», является включающим или открытым и не исключает дополнительных, неперечисленных элементов или этапов способа. В рамках настоящего изобретения термин «состоящий из» исключает любые элементы, этапы или ингредиенты, не указанные в заявленной композиции или способе. В рамках настоящего изобретения термин «состоящий по существу из» не исключает материалы или этапы, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленной композиции или способа. Любое упоминание в настоящем документе термина «содержащий», особенно в описании компонентов композиции или в описании стадий способа, понимается как охватывающее те композиции и способы, состоящие по существу из перечисленных компонентов или стадий и состоящие из них.

[0069] Все гены, названия генов и генные продукты, раскрытые в настоящем документе, предназначены для соответствия гомологам любых видов, к которым применимы раскрытые в настоящем документе композиции и способы. Таким образом, термины включают, помимо прочего, гены и генные продукты человека и мышей. Понятно, что при раскрытии гена или генного продукта конкретного вида, это раскрытие предназначено только для примера и не должно интерпретироваться как ограничение, если только контекст, в котором оно появляется, четко не указан. Таким образом, например, гены или генные продукты, раскрытые в настоящем документе, которые в некоторых вариантах осуществления относятся к последовательностям нуклеиновых кислот и аминокислот млекопитающих, предназначены для охвата гомологичных и/или ортологичных генов и генных продуктов других животных, включая, помимо прочего, других млекопитающих, рыб, амфибий, рептилий и птиц. В некоторых вариантах осуществления гены, последовательности нуклеиновых кислот, аминокислотные последовательности, пептиды, полипептиды и белки относятся к человеку. Термин «ген» также включает в себя его варианты.

[0070] Понятно, что некоторые признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть

предоставлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предоставлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящиеся к настоящему изобретению, конкретно включены в настоящее описание и раскрыты в настоящем документе так же, как если бы каждая комбинация была раскрыта индивидуально и явно. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементы также конкретно охватываются настоящим изобретением и раскрыты в настоящем документе так же, как если бы каждая такая подкомбинация была индивидуально и явно раскрыта в настоящем документе.

### **Альфовирусы**

[0071] Альфовирусы представляют собой небольшие РНК-вирусы с оболочкой и одноцепочечным геномом из положительной смысловой РНК. Род альфовирусов включает, среди прочего, вирус Sindbis (SINV), вирус Semliki Forest (SFV), вирус Ross River (RRV), вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV) и вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV), которые все тесно связаны и способны инфицировать различных позвоночных, таких как млекопитающие, грызуны, рыбы, виды птиц, и более крупных млекопитающих, таких как люди и лошади, а также беспозвоночных, таких как насекомые. В частности, широко изучены вирусы Sindbis и Semliki Forest, и жизненный цикл, способ репликации и т. д. этих вирусов хорошо охарактеризованы. Неограничивающие иллюстративные виды альфовирусов, подходящие для композиций и способов, раскрытых в настоящем документе, включают вирус Aura (AURAV), вирус Babanki (BABV), вирус Barmah Forest (BFV), вирус Bebaru (BEBV), вирус Buggy Creek, вирус Caatinga, вирус Cabassou, вирус Chikungunya (CHIKV), вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV), вирус Eilat, вирус Everglades (EVEV), вирус Fort Morgan (FMV), вирус Getah (GETV), вирус Highlands J (HJV), вирус Kyzylgach (KYZV), вирус Madariaga (MADV), вирус Mayago (MAYV), вирус Middelburg (MIDV), вирус Mosso das Pedras, вирус Mucambo (MUCV), вирус Ndumu (NDUV), вирус O'nyong'nyong (ONNV), вирус Pixuna (PIXV), вирус Rio Negro (RNV), вирус Ross River (RRV), вирус болезни поджелудочной железы лососевых (SPDV), вирус Semliki Forest (SFV), вирус Sindbis (SINV), вирус сонной болезни (SDV), вирус южного морского слона (SESV), вирус Tai Forest (TFV), вирус Tonate, вирус Trocara, вирус Una (UNAV), вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV), вирус западного лошадиного энцефалита (WEEV) и вирус Whataroa (WHAU).

[0072] Геном альфовируса имеет длину примерно 12 КБ и состоит из двух открытых рамок считывания (ORF): рамки 7 КБ, кодирующей неструктурные белки (nsPs), и рамки 4 КБ, кодирующей структурный полипротеин. Неструктурный полипротеин (nsP) расщепляется на четыре различных белка (nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4), которые необходимы для транскрипции и трансляции вирусной mRNA внутри цитоплазмы клеток-хозяев.

[0073] Белок nsP1 представляет собой фермент, копирующий mRNA, который

обладает активностью как гуанин-7-метилтрансферазы (MTase), так и гуанилилтрансферазы (GTase), причем они направляют метилирование и кэпирование вновь синтезированных вирусных геномных и субгеномных РНК. Мотив MTase в N-концевом домене nsP1 катализирует перенос метильной группы от S-аденозилметионина (AdoMet) в положение N7 молекулы GTP (m7Gppp). Затем GTase связывает m7Gppp, образуя ковалентную связь с каталитическим гистидином (m7Gr-GTase) и высвобождая PPi. Затем GTase переносит молекулу m7Gr на 5'-дифосфатную РНК с получением m7GpppNp-РНК. Полученная кэп-структура необходима для трансляции вирусной mRNA и предотвращает разрушение mRNA клеточными 5'-экзонуклеазами. За N-концевым доменом следуют элементы, которые позволяют белку nsP1 связываться с клеточными мембранами. Наличие  $\alpha$ -спиральной амфипатической петли и сайтов пальмитоилирования позволяет белку nsP1 и nsP1-содержащему репликационному комплексу закрепляться на плазматической мембране, возможно, посредством взаимодействия nsP1 с анионными фосфолипидами мембраны.

[0074] Белок nsP2 обладает множеством ферментативных функций и функциональными ролями. N-концевая область содержит хеликазный домен, который имеет семь характерных мотивов геликаз суперсемейства 1 (SF1). Он действует как РНК-трифосфатаза, которая выполняет первую реакцию кэпирования вирусной РНК. Он также действует как нуклеотидтрифосфатаза (NTPase), обеспечивая активность РНК-хеликазы. С-концевая область nsP2 содержит папаин-подобную цистеиновую протеазу, которая отвечает за процессинг вирусного неструктурного полипротеина. Протеаза распознает консервативные мотивы внутри полипротеина. Эта протеолитическая функция строго регулируется и модулируется другими доменами nsP2. Белок nsP2 альфавируса также был описан как фактор вирулентности, ответственный за отключение транскрипции и трансляции в инфицированных клетках-хозяевах и ингибирование опосредованных интерфероном (IFN) противовирусных ответов, способствующих регулированию механизмов трансляции вирусными факторами.

[0075] Точная роль белка nsP3 альфавируса в репликационном комплексе менее ясна. Белок nsP3 имеет три признанных домена: N-концевой макродомен с фосфатазной функцией и способностью связывать нуклеиновые кислоты, уникальный альфавирусный домен (AUD) и С-концевой гипервариабельный домен. Было продемонстрировано, что делеция этого домена в nsP3 SFV приводила к низкой патогенности вируса, что указывает на его важность в регуляции транскрипции вирусной РНК.

[0076] Полимераза nsP4 является наиболее консервативным белком альфавирусов, причем наиболее расходящиеся белки имеют более чем 50% идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с другими альфавирусными nsP4. nsP4 содержит на С-конце основной РНК-зависимый домен РНК-полимеразы (RdRp), который, как установлено, несет исключительную ответственность за синтетические свойства РНК вирусного репликационного комплекса. RdRp участвует в репликации геномной РНК через РНК с отрицательной цепью и транскрипции субгеномной РНК 26S. N-концевой

домен специфичен для альфавируса и может быть частично структурно разупорядочен.

[0077] 5'-две трети генома альфавируса кодируют ряд неструктурных белков (nsP), необходимых для транскрипции и репликации вирусной РНК. Эти белки транслируются непосредственно с РНК и вместе с клеточными белками образуют РНК-зависимую РНК-полимеразу, необходимую для репликации вирусного генома и транскрипции субгеномной РНК. Четыре неструктурных белка (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) образуются в виде одного полипротеина и составляют механизм репликации вируса. Процессинг полипротеина происходит строго регулируемым образом, при этом расщепление в месте соединения P2/3 влияет на использование матрицы РНК во время репликации генома. Это место расположено у подножия узкой расщелины и труднодоступно. После расщепления nsP3 создает кольцевую структуру, окружающую nsP2. Эти два белка имеют обширную область соприкосновения. Мутации в nsP2 приводят к образованию нецитопатических вирусов или кластера чувствительных к температуре фенотипов в области соприкосновения P2/P3. Мутации P3 напротив расположения нецитопатических мутаций nsP2 предотвращают эффективное расщепление P2/3. Это, в свою очередь, может повлиять на инфекционность РНК, изменяя уровни выработки вирусной РНК.

[0078] 3'-треть генома содержит субгеномную РНК, которая служит матрицей для трансляции всех структурных белков, необходимых для образования вирусных частиц: корового белка нуклеокапсида С и белков оболочки Р62 и Е1, которые соединяются в гетеродимер. Поверхностные гликопротеины, закрепленные на вирусной мембране, отвечают за распознавание рецепторов и проникновение в клетки-мишени посредством слияния мембран. Субгеномная РНК транскрибируется с субгеномного промотора р26S, имеющегося на 3'-конце последовательности РНК, кодирующей белок nsP4. Протеолитическое созревание Р62 в Е2 и Е3 вызывает изменение поверхности вируса. Вместе Е1, Е2, а иногда и Е3 гликопротеиновые «шипы» образуют димер Е1/Е2 или тример Е1/Е2/Е3, где Е2 простирается от центра к вершинам, Е1 заполняет пространство между вершинами, а Е3 - если он присутствует, то находится на дистальном конце шипа. При воздействии вируса на кислотную среду эндосомы Е1 диссоциирует от Е2 с образованием гомотримера Е1, который необходим на этапе слияния, чтобы свести вместе клеточные и вирусные мембраны. Альфавирусный гликопротеин Е1 представляет собой вирусный слитый белок класса II, который структурно отличается от слитых белков класса I, обнаруженных в вирусе гриппа и ВИЧ. Гликопротеин Е2 взаимодействует с нуклеокапсидом через свой цитоплазматический домен, а его эктодомен отвечает за связывание клеточного рецептора. Большинство альфавирусов теряют периферический белок Е3, тогда как у вирусов Semliki он остается связанным с вирусной поверхностью.

[0079] Сообщалось, что репликация альфавируса происходит на мембранных поверхностях внутри клетки-хозяина. На первом этапе инфекционного цикла 5'-конец геномной РНК транслируется в полипротеин (nsP1-4) с функцией РНК-полимеразы, который образует отрицательную цепь, комплементарную геномной РНК. На втором этапе отрицательная цепь используется в качестве матрицы для выработки двух РНК

соответственно: (1) положительной геномной РНК, соответствующей геному вторичных вирусов, продуцирующих посредством трансляции другие nsP и действующих как геном для вируса; и (2) субгеномной РНК, кодирующей структурные белки вируса, образующие инфекционные частицы. Соотношение положительной геномной РНК/субгеномной РНК регулируется протеолитическим ауторасщеплением полипротеина до nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4. На практике экспрессия вирусного гена происходит в две фазы. На первой фазе происходит основной синтез положительных и отрицательных цепей генома. Во время второй фазы синтез субгеномной РНК практически эксклюзивен, что приводит к получению большого количества структурного белка.

### **Самореплицирующаяся РНК**

[0080] Как будет понятно специалисту в данной области, термин «самореплицирующаяся РНК» относится к молекуле РНК, которая содержит всю генетическую информацию, необходимую для управления ее собственной амплификацией или саморепликацией внутри перmissive клетки. Поэтому srRNA иногда еще называют «самоамплифицирующейся РНК» (саРНК). В некоторых вариантах осуществления srRNA представляет собой «репликон», который может представлять собой линейный или кольцевой участок ДНК или РНК, который последовательно реплицируется как единое целое. Неограничивающие примеры репликонов включают «репликон РНК» или «РНК-репликон». Чтобы управлять собственной репликацией, srRNA обычно (1) кодирует полимеразу, репликазу или другие белки, которые могут взаимодействовать с белками вируса или клетки-хозяина, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, катализируя способ амплификации РНК; и (2) содержат цис-действующие последовательности РНК, необходимые для репликации и транскрипции РНК, кодируемой субгеномным репликоном. Эти последовательности могут быть связаны в способе репликации с самокодируемыми белками или несамокодируемыми белками клеточного происхождения, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами или комплексами между любыми из этих компонентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения репликон, например, srRNA, получен из альфавируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция srRNA альфавируса (например srRNA, saRNA или молекула репликона) обычно содержит следующие элементы: 5'-последовательность (последовательности) вирусной или дефектно-интерферирующей РНК, необходимые в цис для репликации, последовательности, кодирующие биологически активные неструктурные белки альфавируса (например nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4), субгеномный промотор (sg) для субгеномной РНК (sgRNA), 3'-вирусные последовательности, необходимые в цис для репликации, и, необязательно, полиаденилатный тракт (поли (a)). В некоторых случаях в конструкцию srRNA согласно настоящему изобретению может быть включен субгеномный промотор (sg), который управляет экспрессией гетерологичной последовательности.

[0081] Кроме того, термин молекула srRNA (например srRNA, saRNA или молекула репликона) обычно относится к молекуле с положительной полярностью или

смыслом «транскрипта», и длина srRNA может отличаться от длины любого известного, встречающегося в природе альфавируса. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения srRNA не содержит по меньшей мере части кодирующей последовательности одного или нескольких структурных белков альфавируса; и/или последовательности, кодирующие структурные гены, могут быть заменены гетерологичными последовательностями. В тех случаях, когда srRNA должна быть упакована в рекомбинантную альфавирусную частицу, она может содержать одну или несколько последовательностей, так называемых сигналов упаковки, которые служат для инициирования взаимодействий со структурными белками альфавируса, которые приводят к образованию частиц.

[0082] Конструкции srRNA согласно настоящему изобретению обычно имеют длину по меньшей мере примерно 2 т.п.н. Например, srRNA может иметь длину по меньшей мере примерно 2 т.п.н., по меньшей мере примерно 3 т.п.н., по меньшей мере примерно 4 т.п.н., по меньшей мере примерно 5 т.п.н., по меньшей мере примерно 6 т.п.н., по меньшей мере примерно 7 т.п.н., по меньшей мере примерно 8 т.п.н. т.п.н., по меньшей мере примерно 9 т.п.н., по меньшей мере примерно 10 т.п.н., по меньшей мере примерно 11 т.п.н., по меньшей мере примерно 12 т.п.н. или более 12 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления srRNA может иметь длину от примерно 4 т.п.н. до примерно 20 т.п.н., от примерно 4 т.п.н. до примерно 18 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 16 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 14 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 12 т.п.н. от примерно 8 т.п.н. до примерно 16 т.п.н., от примерно 9 т.п.н. до примерно 14 т.п.н., от примерно 10 т.п.н. до примерно 18 т.п.н., от примерно 11 т.п.н. до примерно 16 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 18 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 20 т.п.н., примерно от примерно 5 т.п.н. до примерно 10 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 8 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 7 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 6 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 12 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 11 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 10 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 9 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 8 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 7 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 11 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 10 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 9 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 8 т.п.н., от примерно 8 т.п.н. до примерно 11 т.п.н., от примерно 8 т.п.н. до примерно 10 т.п.н., от примерно 8 т.п.н. до примерно 9 т.п.н., от примерно 9 т.п.н. до примерно 11 т.п.н., от примерно 9 т.п.н. до примерно 10 т.п.н. или от примерно 10 т.п.н. до примерно 11 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления srRNA может иметь длину от примерно 6 т.п.н. до примерно 14 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления srRNA может иметь длину от примерно 6 т.п.н. до примерно 16 т.п.н.

#### **Способы идентификации и/или характеристики конструкций srRNA**

[0083] Как более подробно описано ниже, один аспект изобретения относится к способам идентификации и/или характеристики конструкции srRNA, например, конструкции srRNA, имеющей нужное свойство экспрессии, подходящей для экспрессии

представляющего интерес рекомбинантного полипептида, такого как, например, молекула антигена и биотерапевтическая молекула в клетке-хозяине, культуре клеток, бесклеточной системе экспрессии *ex-vivo* или у субъекта для профилактического и/или терапевтического применения.

[0084] На фиг. 1 представлена блок-схема, иллюстрирующая неограничивающий пример способа идентификации и/или характеристики конструкции самореплицирующейся РНК (srRNA, например, репликаона), раскрытой в настоящем документе. Как проиллюстрировано на фиг. 1, в некоторых вариантах осуществления способ согласно настоящему изобретению может включать следующие операции: (a) предоставление множества экспрессирующих srRNA конструкций, каждая из которых содержит кодирующую последовательность интересующей полипептидной конструкции (PCI), функционально встроенную в альфавирусный вектор srRNA, причем по меньшей мере часть кодирующей последовательности структурных белков альфавируса заменена кодирующей последовательностью PCI; (b) анализ уровня и/или функциональности PCI, которые экспрессируются из множества конструкций экспрессии srRNA, для идентификации одного или более кандидатов PCI, имеющих определенное свойство; (c) объединение экспрессирующих srRNA конструкций, способных экспрессировать кандидаты PCI, идентифицированные на этапе (b), по меньшей мере, с одним средством доставки для получения комбинаторной коллекции систем доставки; и (d) анализ систем доставки на предмет их способности оказывать по меньшей мере один фармакодинамический эффект у субъекта для идентификации конструкции экспрессии srRNA, способной оказывать нужный фармакодинамический эффект.

[0085] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления способов согласно настоящему изобретению могут иметь один или несколько следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен по меньшей мере части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько вирусных структурных белков CP, E1, E2, E3 и 6K вектора srRNA альфавируса. В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен части или всей последовательности, кодирующей CP. В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен части или всей последовательности, кодирующей E1. В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен части или всей последовательности, кодирующей E2. В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен части или всей последовательности, кодирующей E3. В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен части или всей последовательности, кодирующей 6K. В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен части или всей последовательности, кодирующей комбинацию CP, E1, E2, E3 и 6K. В некоторых вариантах осуществления изобретения присутствует кодирующая последовательность неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 альфавирусного вектора srRNA, однако отсутствует по меньшей мере часть или вся последовательность, кодирующая один или несколько структурных белков (например CP,

E1, E2, E3 и 6K) вектора srRNA альфавируса.

[0086] В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен значительной части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько вирусных структурных белков. Специалист в данной области поймет, что значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный структурный полипептид, может содержать достаточное количество последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный структурный полипептид, чтобы обеспечить предполагаемую идентификацию этого полипептида, либо путем ручной оценки последовательности специалистом в данной области техники, либо путем компьютерного сравнения и идентификации последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BLAST (см., например, в «Basic Local Alignment Search Tool»; Altschul SF et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 1993). Соответственно, существенная часть нуклеотидной последовательности содержит достаточную часть последовательности, чтобы обеспечить специфическую идентификацию и/или выделение фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащего последовательность. Например, существенная часть последовательности нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере примерно 20%, например, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95% полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты.

[0087] В некоторых вариантах осуществления вектор srRNA альфавируса лишен всей последовательности, кодирующей структурные белки вируса, например, вектор srRNA альфавируса не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вирусные структурные белки.

[0088] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность PCI содержит кодирующую последовательность одного полипептида (например моногенного PCI). В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность PCI содержит последовательности, кодирующие множество полипептидов, например, мультигенного PCI (например бигенного, тригенного или тетрагенного и т.д.). В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующих последовательностей множества полипептидов функционально связана с отдельной промоторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательности, кодирующие множество полипептидов, функционально связаны друг с другом внутри одной открытой рамки считывания (например в полицистронной ORF). В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность полицистронной ORF функционально связана с промоторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из промоторных последовательностей представляет собой субгеномный (sg) промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор sg представляет собой геномный промотор 26S.

[0089] В некоторых вариантах осуществления множество полипептидов могут быть связаны друг с другом прямо или косвенно (например через одну или несколько

соединительных последовательностей). Например, в некоторых вариантах осуществления множество полипептидов могут быть непосредственно связаны друг с другом, например, находиться рядом друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два (например 2, 3, 4 или 5) из множества полипептидов функционально связаны друг с другом посредством одной или нескольких соединительных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления длина и аминокислотный состав соединительных последовательностей могут быть оптимизированы для изменения ориентации, гибкости и/или близости полипептидов относительно друг друга для достижения нужной активности или свойства PCI. В некоторых вариантах осуществления соединительная последовательность из множества соединительных последовательностей содержит одну или несколько аутопротеолитических пептидных последовательностей. Неограничивающие примеры аутопротеолитических пептидных последовательностей, подходящих для способов и композиций согласно настоящему изобретению, включают последовательности аутопротеолитического расщепления, полученные из кальцийзависимой сериновой эндопротеазы (фурина), свиного тековируса-1 2A (P2A), вируса ящура (FMDV) 2A (F2A), вируса ринита лошадей A (ERAV) 2A (E2A), вируса *Thea asigna* 2A (T2A), вируса цитоплазматического полиэдроса 2A (BmCPV2A) и вируса Flacherie 2A (BmIFV2A). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из множества полипептидов функционально связаны друг с другом через последовательность аутопротеолитического расщепления P2A.

[0090] В некоторых вариантах осуществления последовательности, кодирующие множество полипептидов, функционально связаны друг с другом посредством одного или нескольких внутренних сайтов связывания рибосомы (IRES). Неограничивающие примеры IRES, подходящие для способов и композиций согласно настоящему изобретению, включают вирусные последовательности IRES, клеточные последовательности IRES и искусственные последовательности IRES. Примеры подходящих последовательностей IRES включают, помимо прочего, IRES вируса герпеса, ассоциированного с герпесвирусом саркомы Капоши (KSHV), IRES вируса гепатита, IRES Pestivirus, IRES Crivavirus, IRES вируса *Rhopalosiphum Padi*, IRES фактора роста фибробластов, IRES тромбоцитарного фактора роста, IRES фактора роста эндотелия сосудов, IRES инсулиноподобного фактора роста, IRES picornavirus, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), IRES Pim-1, IRES p53, IRES Apaf-1, IRES TDP2, IRES L-мус и IRES с-мус.

#### **Представляющая интерес полипептидная конструкция (PCI)**

[0091] Как более подробно описано ниже, представляющая интерес полипептидная конструкция (PCI) может содержать аминокислотные последовательности одного или нескольких полипептидов. В принципе, не существует особых ограничений в отношении подходящих полипептидов, которые могут экспрессироваться с помощью конструкций srRNA согласно настоящему изобретению. Иллюстративные типы полипептидов, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают

микробные белки, белки вирусов, белки бактерий, белки грибов, белки млекопитающих и любой их комбинации. Например, PCI может представлять собой одну или несколько молекул антигена и/или биотерапевтических молекул, таких как цитокины, цитотоксины, хемокины, иммуномодуляторы, проапоптотические факторы, антиапоптотические факторы, гормоны, факторы дифференцировки, факторы дедифференцировки, рецепторы иммунных клеток или репортеры или их комбинации.

[0092] В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой один или несколько интерлейкинов и взаимодействующих белков, таких как G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-10, IL-10-подобные, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-18BP, IL-1-подобные, IL-1RA, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-20, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6-подобные, IL-7, IL-9, IL-21, IL-22, IL-33, IL-37, IL-38, LIF и OSM. Дополнительные подходящие полипептиды представляют собой, помимо прочего, интерфероны (например IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), TNF (например CD154, LT- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK и TRANCE), TGF- $\beta$  (например TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3), гематопоэтины (например Epo, Tpo, Flt-3L, SCF, M-CSF, MSP), хемокины и их рецепторы (например XCL1, XCL2, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 и CX3CL1), продукты иммуносупрессивных генов и родственные факторы транскрипции (например PECAM1, FCGR3A, FOS, NFkB1, JUN, HIF1A, PD-L1, mTOR, STAT5B и STAT4).

[0093] Дополнительные полипептиды, подходящие для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают, помимо прочего, продукты иммуностимулирующих генов (например CD27/CD70, CD40, CD40L, B7.1, BTLA, MAVS, OX40, OX40L, RIG-I и STING), мутанты/варианты генов, устойчивые к лекарствам, такие как ABCB1, ABCC1, ABCG2, AKT1, ALK, BAFF, BCR-ABL, BRAF, CCND1, cMET, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERK2, ESR1, GRB2, KRAS, MDR1, MRP1, NTRK1, PDC4, P-gp, PI3K, PTEN, RET, ROS1, RSK1, RSK2, SHIP и STK11. Также последовательности, подходящие для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают последовательности, кодирующие белки вирусов, в частности белки шипов, белки волокон, структурные белки и белки прикрепления. В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой один или несколько экспонируемых на поверхности вирусных антигенов, например, экспонируемых на поверхности белков вирусов. В некоторых вариантах осуществления белок вируса представляет собой гликопротеин. В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой поверхностный гликопротеин. В некоторых вариантах осуществления вирусный гликопротеин представляет собой гликопротеин вируса бешенства. В некоторых вариантах осуществления вирусный гликопротеин представляет собой гликопротеин оболочки G вируса бешенства (RABV-G).

[0094] В некоторых вариантах осуществления PCI может содержать аминокислотные последовательности для одного или нескольких антител или вариантов антител (например одноцепочечные Fv, биспецифические, верблюжки, Fab и HCAb). В некоторых вариантах осуществления антитело нацелено на молекулы, связанные с раком или с повышенной регуляцией при раке, или молекулы, связанные с инфекционным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления антитело нацелено на молекулы, обладающие иммуностимулирующей функцией или обладающие иммуносупрессивной функцией.

[0095] В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой аминокислотные последовательности фермента, дефицит или мутация которого связана с заболеваниями или состояниями здоровья, такого как, например, агалсидаза бета, агалсидаза альфа, имиглюцераза, талиглюцераза альфа, велаглюцераза альфа, алглюцераза, себелипаза альфа, ларонидаза, идурсульфаза, элосульфаза альфа, галсульфаза, алглюкозидаза альфа и CTFR.

[0096] В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой аминокислотные последовательности полипептида, выбранного из молекул антигена, биотерапевтических молекул или комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой аминокислотные последовательности полипептида, выбранного из опухолеассоциированных антигенов, опухолеспецифических антигенов, неоантигенов и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой аминокислотные последовательности полипептида, выбранного из рецепторов эстрогена, ферментов-передатчиков внутриклеточных сигналов и эпидермальных рецепторов роста человека. В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой аминокислотные последовательности биотерапевтического полипептида, выбранного из иммуномодуляторов, модуляторов ангиогенеза, модуляторов внеклеточного матрикса, модуляторов метаболизма, неврологических модуляторов и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой аминокислотные последовательности цитокина, выбранного из хемокинов, интерферонов, интерлейкинов, лимфокинов и факторов некроза опухоли. В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой аминокислотные последовательности интерлейкинов, выбранных из IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, IL-35, IFN $\gamma$  и субъединицы любых из них. В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой аминокислотные последовательности биотерапевтического полипептида, выбранного из IL-12A, IL-12B, IL-1RA и комбинаций любых из них.

[0097] В некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой один или несколько антигенных полипептидов. Как обсуждалось выше, в принципе, не существует особых ограничений в отношении подходящих антигенных полипептидов, которые могут экспрессироваться с помощью конструкций sgRNA согласно настоящему

изобретению. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления PCI может представлять собой один или несколько антигенных полипептидов, которые могут представлять собой опухолеассоциированные антигены (ТАА), опухолеспецифические антигены (TSA), неоантигены и комбинации любых из них. Как будет понятно специалисту в данной области, ТАА представляют собой молекулу, например белок, присутствующую на опухолевых клетках и нормальных клетках или на многих нормальных клетках, но в гораздо более низкой концентрации, чем на опухолевых клетках. Напротив, TSA обычно представляет собой молекулу, например белок, который присутствует в опухолевых клетках, но отсутствует в нормальных клетках. Опухалеассоциированный антиген может представлять собой антиген, ассоциированный с раковой клеткой, например, клеткой рака молочной железы, в-клеточной лимфомой, раком поджелудочной железы, клеткой лимфомы Ходжкина, клеткой рака яичника, клеткой рака простаты, мезотелиомой, клеткой рака легкого, клеткой неходжкинской В-клеточной лимфомы (В-NHL), клеткой рака яичника, клеткой рака простаты, клеткой мезотелиомы, клеткой меланомы, клеткой хронического лимфоцитарного лейкоза, клеткой острого лимфоцитарного лейкоза, клеткой нейробластомы, глиомы, глиобластомы, клеткой колоректального рака и т. д. Также следует понимать, что в некоторых случаях опухалеассоциированный антиген также может экспрессироваться нераковой клеткой.

[0098] В некоторых вариантах осуществления один или несколько антигенных полипептидов включают в себя рецепторы эстрогена, ферменты-преобразователи внутриклеточных сигналов и эпидермальные рецепторы роста человека. В некоторых вариантах осуществления один или несколько антигенных полипептидов выбирают из группы, состоящей из ESR1, PI3K, HER2, HER3, вариантов любого из них и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая вариант ESR1, имеет одно или несколько молекулярных изменений, которые способствуют активности лиганд-независимого рецептора. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько молекулярных изменений включают в себя активирующую мутацию, выбранную из группы, состоящей из K303R, E380Q, Y537C, Y537S, Y537N и D538G. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность варианта PI3K имеет одно или несколько молекулярных изменений, которые способствуют активности лиганд-независимого рецептора. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько молекулярных изменений включают в себя активирующую мутацию, выбранную из группы, состоящей из E542K, E545K, H1047L и H1047R. В некоторых вариантах осуществления вариант HER2 содержит последовательность, кодирующую внеклеточный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления вариант HER3 содержит последовательность, кодирующую киназо-неактивный HER3. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность PCI содержит в направлении от 5'- к 3'-: а) последовательность, кодирующую вариант PI3K, содержащую одно или несколько

активирующих молекулярных изменений, выбранных из E542K, H1047L, E545K и H1047R; b) кодирующую последовательность аутопротеолитического пептида P2A; c) последовательность, кодирующую вариант HER2, содержащую его внеклеточный домен и трансмембранный домен; d) кодирующую последовательность аутопротеолитического пептида P2A; e) кодирующую последовательность киназо-неактивного варианта HER3; f) кодирующую последовательность внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES); и g) последовательность, кодирующую вариант ESR1, содержащую одно или несколько активирующих молекулярных изменений, выбранных из Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G и Y537N.

[0099] В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько биотерапевтических полипептидов. Как правило, не существует особых ограничений в отношении подходящих биотерапевтических полипептидов, которые могут экспрессироваться конструкциями srRNA согласно настоящему изобретению. Примеры биотерапевтических полипептидов, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают, помимо прочего, иммуномодуляторы, модуляторы ангиогенеза, модуляторы внеклеточного матрикса, модуляторы метаболизма, неврологические модуляторы и любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько цитокинов. Неограничивающие примеры цитокинов включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухоли. В некоторых вариантах осуществления PCI содержит один или несколько интерлейкинов. Подходящие интерлейкины включают IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, IL-35, IFN $\gamma$  и любые их субъединицы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько биотерапевтических полипептидов выбирают из субъединицы p35 интерлейкина 12 (p35 или IL-12A), субъединицы p40 интерлейкина 12 (p40 или IL-12B), антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA), вариантов любого из них и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес полипептидная конструкция содержит в направлении от N-конца к C-концу: a) полипептид IL-12A, полипептид IL-12B и полипептид IL-1RA; или b) полипептид IL-1RA, полипептид IL-12B и полипептид IL-12A; при этом полипептиды IL-12A, IL-12B и IL-1RA функционально связаны друг с другом посредством одной или нескольких последовательностей аутопротеолитического расщепления или внутренних сайтов связывания рибосомы.

[0100] В некоторых вариантах осуществления этап (a) способов, описанных в настоящем документе, включает предоставление множества конструкций экспрессии srRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI. Термин «вариант» PCI относится к полипептидной конструкции, в которой присутствует одно или несколько молекулярных изменений (например делеции, замены, вставки, дубликации и/или мутации аминокислот) по сравнению с аминокислотной последовательностью оригинальной PCI. Термин «вариант» также включает варианты со

сдвигом рамки и сплайсинговые варианты. В некоторых вариантах осуществления предоставление в (а) включает: (i) получение вектора экспрессии sgRNA альфавируса, в котором по меньшей мере часть кодирующей последовательности структурных белков альфавируса заменена кодирующей последовательностью интересующей полипептидной конструкции (PCI); и (ii) получение множества конструкций экспрессии sgRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI.

[0101] В некоторых вариантах осуществления этап (а) способов, описанных в настоящем документе, включает предоставление множества конструкций экспрессии sgRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI, при этом предоставление в (а) включает: (i) получение кодирующих последовательностей для множество вариантов интересующей полипептидной конструкции (PCI); и (ii) получение множества конструкций экспрессии sgRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI из множества вариантов PCI из (а), функционально вставленных в вектор sgRNA альфавируса, причем по меньшей мере часть кодирующей последовательности для альфавирусных структурных белков заменена последовательностью, кодирующей вариант PCI.

[0102] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, вариант PCI из множества вариантов PCI имеет одно или несколько молекулярных изменений. Иллюстративными типами молекулярных изменений в варианте PCI могут быть одна или несколько делеций, замен, вставок, дупликаций, мутаций, вариантов сдвига рамки считывания, вариантов сплайсинга и комбинаций любых из них.

[0103] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, одно или несколько молекулярных изменений собраны во множество кассет изменений. В некоторых вариантах осуществления множество кассет изменения расположены тандемно по длине последовательности PCI. В некоторых вариантах осуществления длина и аминокислотный состав кассет изменений могут быть оптимизированы для достижения нужной активности или свойства PCI или варианта PCI. В некоторых вариантах осуществления кассета изменений из множества кассет изменений содержит одноцепочечную полипептидную последовательность, содержащую от примерно 1 до примерно 30 аминокислотных остатков (например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и т.д. аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления кассета изменений из множества кассет изменений содержит от примерно 2 до примерно 50 аминокислотных остатков, например, от примерно 5 до примерно 45, от примерно 10 до примерно 40, от примерно 15 до примерно 30, от примерно 20 до примерно 50, от примерно 2 до примерно 30, от примерно 3 до примерно 25, от примерно 4 до примерно 20, от примерно 5 до примерно 15, от примерно 6 до примерно 10, от примерно 3 до примерно 15, от примерно 4 до примерно 10, от примерно 5 до примерно 30, от примерно 2 до примерно 5, от примерно 3 до примерно 5, от примерно 4 до примерно 8 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах

осуществления кассета изменений из множества кассет изменений содержит 31 аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления кассета изменений из множества кассет изменений содержит одно, два, три, четыре, пять или более молекулярных изменений.

[0104] В некоторых вариантах осуществления кодирующую последовательность РСИ реорганизуют и/или оптимизируют для нужного свойства, такого как повышенная стабильность, эффективность и экспрессия (например эффективность трансляции), что, в свою очередь, может максимизировать воздействие с целью получения, доставки и введения биотерапевтических препаратов. Например, в некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность РСИ оптимизирована для экспрессии на уровне выше, чем уровень экспрессии эталонной кодирующей последовательности, например, на 20% выше, на 30% выше, на 40% выше, на 50% выше, на 60% выше, на 70% выше, на 80% выше, на 90% выше или на 95% выше, чем эталонная кодирующая последовательность. В некоторых вариантах осуществления эталонная кодирующая последовательность представляет собой неоптимизированную последовательность дикого типа. Что касается оптимизации последовательности нуклеотидных последовательностей, вырожденность генетического кода обеспечивает возможность замены по меньшей мере одного основания кодирующей белок последовательности гена другим основанием, не вызывая при этом замены аминокислотной последовательности полипептида, полученного из этого гена. Следовательно, конструкции нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению также могут иметь любую последовательность оснований, которая была изменена по сравнению с любой полинуклеотидной последовательностью, раскрытой в настоящем документе, путем замены в соответствии с вырожденностью генетического кода. Ссылки, описывающие использование кодонов, широко доступны. В некоторых вариантах осуществления по разным причинам могут быть получены варианты полинуклеотидной последовательности, например, для оптимизации экспрессии для конкретного хозяина (например изменение использования кодонов в mRNA альфавируса на те, которые предпочитают другие организмы, такие как человек, приматы, не относящиеся к человеку, хомяк, мышь или обезьяна). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность РСИ оптимизирована для экспрессии на уровне выше, чем уровень экспрессии эталонной кодирующей последовательности, такой как, например, кодирующая последовательность, которая не была оптимизирована по кодонам в целевой клетке-хозяине за счет использования кодонов, оптимизированных для экспрессии. В некоторых вариантах осуществления оптимизированная по кодомам последовательность РСИ приводит к повышению уровня экспрессии по меньшей мере на 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100% по сравнению с эталонной кодирующей последовательностью, которая не была оптимизирована по кодомам. В некоторых вариантах осуществления последовательность РСИ с

оптимизированными кодонами приводит к повышению уровня экспрессии по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз по сравнению с эталонной кодирующей последовательностью, которая не была оптимизирована по кодонам.

[0105] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность РСИ оптимизирована для повышения стабильности и/или экспрессии РНК. Стабильность РНК обычно связана с «периодом полужизни» РНК. «Период полужизни» относится к периоду времени, который необходим для устранения половины активности, количества или числа молекул. В контексте настоящего изобретения период полужизни РНК является показателем стабильности указанной РНК. Период полужизни РНК может влиять на «продолжительность экспрессии» РНК. Известны несколько методов и способов, полезных для оценки стабильности РНК, включая различные методы *in silico* и/или эмпирическое стресс-тестирование хранения репликонов, например, самореплицирующихся РНК, с различным использованием кодонов РСИ и его влияние на эффективность *siRNA* (например исследование *dsRNA* в клетках после трансфекции) и экспрессию генов. Дополнительную информацию по этому поводу можно найти, например, в Wayment-Steele, H. et al. (2021). Cold Spring Harbor Laboratory ([doi.org/10.1101/2020.08.22.262931](https://doi.org/10.1101/2020.08.22.262931)). Дополнительную информацию о принципах, стратегиях и способах повышения стабильности РНК можно найти, например, в Leppek K. et al., Combinatorial optimization of mRNA structure, stability, and translation for RNA-based therapeutics. *bioRxiv*. (Preprint). Mar 30, 2021. doi: 10.1101/2021.03.29.437587.

[0106] В некоторых вариантах осуществления множество кассет изменений функционально связаны друг с другом одним или несколькими линкерами. В некоторых вариантах осуществления линкер из одного или нескольких линкеров представляет собой синтетический соединительный линкер или пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой синтетическое соединение, такое как, например, химическое сшивающее средство. Неограничивающие примеры подходящих сшивающих средств, доступных на рынке, включают N-гидроксисукцинимид (NHS), дисукцинимидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS3), дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP), дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP), бис(сукцинимидилсукцинат) этиленгликоля (EGS), бис(сульфосукцинимидилсукцинат) этиленгликоля (сульфо-EGS), дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-DST), бис[2-(сукцинимидооксикарбонилокси)этил]сульфон (BSOCOES)) и бис[2-(сульфосукцинимидооксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-BSOCOES).

[0107] В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой пептидный линкер, который соединяет вместе две соседние кассеты изменений, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления длина и аминокислотный состав последовательности пептидного линкера могут быть оптимизированы для изменения ориентации, гибкости и/или близости кассет изменений

относительно друг друга для достижения нужной активности или свойства PCI или варианта PCI.

[0108] В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер содержит одноцепочечную полипептидную последовательность, содержащую от примерно 1 до примерно 30 аминокислотных остатков (например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и т.д. аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит примерно от 2 до 30, примерно от 3 до 25, примерно от 4 до 20, примерно от 5 до 15, примерно от 6 до 10, примерно от 3 до 15, примерно от 4 до 10, примерно от 5 до 30, примерно 2 до 5, примерно от 3 до 5, примерно от 4 до 8 аминокислотных остатков.

[0109] В некоторых вариантах осуществления длина и аминокислотный состав последовательности линкерного полипептида могут быть оптимизированы для изменения ориентации, гибкости и/или близости каскет изменений относительно друг друга для достижения нужной активности или свойства PCI. В некоторых вариантах осуществления ориентацию, гибкость и/или близость каскет изменения относительно друг друга можно изменять в качестве инструмента «настройки» для достижения эффекта настройки, который будет усиливать или снижать активность PCI или варианта PCI. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит только остатки глицина и/или серина (например глицин-сериновый линкер). Примеры таких полипептидных линкеров включают: Gly, Ser; Gly Ser; Gly Gly Ser; Ser Gly Gly; Gly Gly Gly Ser; Ser Gly Gly Gly; Gly Gly Gly Gly Ser; Ser Gly Gly Gly Gly; Gly Gly Gly Gly Gly Ser; Ser Gly Gly Gly Gly Gly; Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser; Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly; Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser; Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly; (Gly Gly Gly Gly Ser)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, равное одному или более; и (Ser Gly Gly Gly Gly)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, равное одному или более. В некоторых вариантах осуществления полипептидные линкеры модифицированы таким образом, что аминокислотная последовательность Gly Ser Gly (GSG) (которая встречается на стыке традиционных полипептидных повторов линкера Gly/Ser) отсутствует. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAY, EAAAK (SEQ ID NO: 1), RVRR (SEQ ID NO: 2), GGGGS (SEQ ID NO: 3) и GPGPG (SEQ ID NO: 4).

#### Анализ уровня и/или функциональности PCI

[0110] Как описано выше, способы согласно настоящему изобретению включают в себя способ анализа уровня и/или функциональности PCI, которые экспрессируются из множества конструкций экспрессии srRNA, для идентификации одного или более кандидатов PCI, имеющих определенное свойство (см., например, фиг. 1). Анализ уровня и/или функциональности PCI можно проводить *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления анализ уровня и/или функциональности PCI может представлять собой один или несколько аналитических способов. Примеры подходящих аналитических способов включают, помимо прочего, анализ иммуноблоттинга, анализ флуоресцентной проточной цитометрии, иммуноферментный анализ, анализ

иммуногенности, анализ биоактивности и эффективность на модели заболевания.

### **Получение комбинаторной коллекции систем доставки, включая конструкции экспрессии srRNA**

[0111] Как описано выше, способы согласно настоящему изобретению включают способ встраивания конструкций экспрессии srRNA, способных экспрессировать кандидаты PCI, идентифицированные на этапе (b), по меньшей мере с одним средством доставки, для получения комбинаторной коллекции систем доставки. Иллюстративные средства доставки, подходящие для способов и композиций согласно настоящему изобретению, включают, помимо прочего, физиологические буферы, липосомы, наночастицы на основе липидов (LNP), полимерные наночастицы, частицы вирусного репликона (VRP), микросферы, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM) и конъюгаты биоактивных лигандов, которые могут облегчить доставку и/или усилить иммунный ответ. Эти соединения легко доступны специалисту в данной области; например, см. «Liposomes: A Practical Approach, RCP New Ed, IRL press (1990). В данной области также известны и используются адъюванты, отличные от липосом и т.п. Адъюванты могут защищать антиген (например конструкцию srRNA) от быстрого распространения путем его изоляции в локальном месте, или они могут содержать вещества, которые стимулируют хозяина секретировать факторы, хемотаксические для макрофагов и других компонентов иммунной системы. Соответствующий выбор может быть сделан специалистами в данной области, например, из описанного ниже.

[0112] В некоторых вариантах осуществления системы доставки могут содержать одно или несколько из следующих веществ: физиологический буфер, липосому, наночастицу на основе липидов (LNP), полимерную наночастицу, частицу вирусного репликона (VRP), микросферу, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), конъюгат биоактивного лиганда или их комбинацию.

[0113] Иллюстративные типы липидов, подходящих для систем доставки, описанных в настоящем документе, включают катионные липиды, ионизируемые катионные липиды, анионные липиды, нейтральные липиды и их комбинации.

[0114] В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению может содержать один или несколько ионизируемых липидов. Иллюстративные ионизируемые липиды, подходящие для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают липиды, описанные в публикациях PCT WO2020252589A1 и WO2021000041A1, а также Love K.T. et al., Proc Natl Acad Sci USA, Feb. 2, 2010 107 (5) 1864-1869, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0115] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению имеет одно или несколько липидных соединений, описанных в Love KT et al., 2010, см. выше, таких как C16-96, C14-110 и C12-200. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, состоящей из ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102 и любой их

комбинации. В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит C12-200.

[0116] В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит один или несколько катионных липидов. Подходящие катионные липиды включают, помимо прочего, 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 и 7C1.

[0117] В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит один или несколько нейтральных липидов. Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления нейтральные липиды, также известные как «структурные липиды» или «хелперные липиды», также могут быть включены в липидные препараты и липидные частицы. Липидные препараты и липидные частицы могут содержать один или несколько структурных липидов в количестве примерно от 10 до 40 моль% композиции. Подходящие структурные липиды поддерживают образование частиц во время получения. Структурные липиды относятся к любому из множества видов липидов, которые существуют либо в анионной, незаряженной, либо в нейтральной цвиттер-ионной форме при физиологическом pH. Типичные структурные липиды включают диацилфосфатидилхолины, диацилфосфатидилэтаноламины, диацилфосфатидилглицерины, церамиды, сфингомиелины, дигидросфингомиелины, цефалины и цереброзиды.

[0118] Примеры структурных липидов включают цвиттерионные липиды, например, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE) и диолеоилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-мометил PE, 16-О-диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE) и 1,2-диелаидоил-sn-глицеро-3-фофоэтаноламин (транс DOPE).

[0119] В другом варианте структурный липид может представлять собой любой липид, имеющий отрицательный заряд при физиологическом pH. Эти липиды включают фосфатидилглицерины, такие как диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG), кардиолипин, фосфатидилинозитол, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидную кислоту и другие анионные модифицирующие группы, присоединенные к нейтральным липидам. Другие подходящие структурные липиды включают гликолипиды (например моносиалоганглиозид GM1).

[0120] Неограничивающие нейтральные липиды, подходящие для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению имеет

одно или несколько ионизируемых липидных соединений, описанных в публикациях PCT WO2020252589A1 и WO2021000041A1, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0121] В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один липид, выбранный из группы, состоящей из C12-200, C14-PEG2000, DOPE, DMG-PEG2000, DSPC, DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерина, DOTAP-холестерина, GAP-DMORIE-DPYPE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоля (PEG).

[0122] В некоторых вариантах осуществления, где системы доставки, описанные в настоящем документе, включают LNP, массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 100:1 до примерно 3:1, от примерно 70:1 до 10:1 или от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 20:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 8:1. В некоторых вариантах осуществления наночастицы на основе липидов (LNP) имеют средний диаметр менее примерно 1000 нм, примерно 500 нм, примерно 250 нм, примерно 200 нм, примерно 150 нм, примерно 100 нм, примерно 75 нм, примерно 50 нм или примерно 25 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют средний диаметр примерно от 70 нм до 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 88 нм до примерно 92 нм, от примерно 82 нм до примерно 86 нм или от примерно 80 нм до примерно 95 нм.

[0123] Стабилизирующие средства могут быть включены в варианты осуществления липидных составов для обеспечения целостности смесей. Стабилизирующие средства представляют собой класс молекул, которые разрушают или помогают создать гидрофобно-гидрофильные взаимодействия между молекулами. Подходящие стабилизирующие средства включают, помимо прочего, полисорбат 80 (также известный как Твин 80, название LUPAC 2-[2-[3,4-бис(2-гидроксиэтокси)оксолан-2-ил]-2-(2-гидроксиэтокси)этокси]этилоктадек-9-еноат), Mupj52 (полиоксиэтилен (40) стеарат) и Brij™ S10 (полиоксиэтилен (10) стеариловый эфир). Также могут быть использованы липиды, конъюгированные с полиэтиленгликолем. Стабилизирующие средства можно использовать по отдельности или в комбинации друг с другом.

[0124] В некоторых вариантах осуществления стабилизирующие средства составляют примерно от 0,1 до 3 моль% от общей липидной смеси. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующие средства составляют примерно от 0,5 до 2,5 моль% от общей липидной смеси. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующее средство присутствует в количестве более 2,5 моль%. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующее средство присутствует в концентрации 5

моль%. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующее средство присутствует в концентрации 10 моль%. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующее средство составляет примерно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 и так далее. В других вариантах осуществления стабилизирующее средство составляет 2,6-10 мол% липидной смеси. В других вариантах осуществления стабилизирующие средства присутствуют в количестве более 10 моль% липидной смеси.

[0125] Стероиды также могут быть включены в липидные композиции для определенных вариантов применения, а липидные частицы, полученные из них, включают стеринны, такие как холестерин и фитостерин.

### **Оценка фармакодинамических эффектов *in vivo* или *ex vivo***

[0126] Как описано выше, некоторые варианты осуществления способов согласно настоящему изобретению включают способ анализа систем доставки на предмет их способности оказывать по меньшей мере один фармакодинамический эффект у субъекта с целью идентификации конструкции экспрессии srRNA, способной оказывать нужный фармакодинамический эффект. В некоторых вариантах осуществления анализ систем доставки на предмет их способности оказывать по меньшей мере один фармакодинамический эффект на этапе (d) проводят *in vivo* или *ex vivo*. Примеры фармакодинамических эффектов, которые можно анализировать, включают: эффект иммуногенности (например возникновение иммунного ответа *in vivo*), ответ биомаркера, терапевтический эффект, профилактический эффект, нужный эффект, нежелательный эффект, неблагоприятный эффект и эффект в модели заболевания. В некоторых вариантах осуществления оценка фармакодинамических эффектов включает в себя оценку вызова иммунного ответа *in vivo* (см., например, примеры 1-4). В некоторых вариантах осуществления оценка фармакодинамических эффектов включает в себя оценку индукции цитокиновых путей, которые могут потенцировать иммунный ответ и предотвращать ангиогенез и метастазирование (см., например, примеры 5-7).

[0127] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, рекомбинантная srRNA альфавируса представляет собой вирус, принадлежащий к роду Alphavirus семейства Togaviridae. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная srRNA альфавируса представляет собой альфавирус, принадлежащий к группе VEEV/EEEV, или группе SFV, или группе SINV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV), вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV), вирус Everglades (EVEV), вирус Mucambo (MUCV), вирус Pixuna (PIXV), вирус Middleburg (MIDV), вирус Chikungunya (CHIKV), вирус O'Nyong-Nyong (ONNV), вирус Ross River (RRV), вирус Barmah Forest (BF), вирус Getah (GET), вирус Sagiyama (SAGV), вирус Bebaru (BEBV), вирус Mayaro (MAYV), вирус Una (UNAV), вирус Sindbis (SINV), вирус Aura (AURAV), вирус Whataroa (WHAV), вирус Babanki (BABV), вирус Kyzylgach (KYZV), вирус западного лошадиного энцефалита (WEEV), вирус Highland J (HJV), вирус

Fort Morgana (FMV), вирус Ndumu (NDUV), вирус Madariaga (MADV) или вирус Buggy Creek. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой VEEV, EEEV), CHIKV или SINV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой VEEV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой EEEV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой CHIKV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой SINV.

[0128] Подходящие последовательности альфавируса дикого типа хорошо известны и доступны в хранилищах последовательностей, таких как Американская коллекция типовых культур, Роквилл, Мэриленд. Репрезентативные примеры подходящих альфавирусов включают Aura (ATCC VR-368), вирус Bebaru (ATCC VR-600), ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), вирус Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), вирус восточного лошадиного энцефаломиелита (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), вирус Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), вирус Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), вирус Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), вирус Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), вирус Ross River (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), вирус Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinita (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), венесуэльский лошадиный энцефаломиелит (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532), западный лошадиный энцефаломиелит (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926) и Y-62-33 (ATCC VR-375).

[0129] В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой вирус Chikungunya (CHIKV). Неограничивающие примеры штаммов CHIKV, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают CHIKV S27, CHIKV LR2006-OPY-1, CHIKV YO123223, CHIKV DRDE, CHIKV 37997, CHIKV 99653, CHIKV Ag41855 и штамм Nagpur (Индия) 653496. Пригодны как вирулентные, так и авирулентные штаммы CHIKV. Дополнительные примеры штаммов CHIKV, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают, помимо прочего, штаммы, описанные в Afreen et al. *Microbiol. Immunol.* 2014, 58:688-696, Lanciotti and Lambert *ASTMH* 2016, 94(4):800-803 and Langsjoen et al. *mBio.* 2018, 9(2):c02449-17. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или репликон CHIKV, например, самореплицирующаяся РНК, получен из штамма CHIKV S27. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA CHIKV получен из штамма CHIKV DRDE. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA CHIKV получен из штамма CHIKV DRDE-06. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA CHIKV получен из штамма CHIKV DRDE-07.

[0130] В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой

вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV) или вирус Madariaga (MADV). Неограничивающие примеры штаммов EEEV и MADV, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают EEEV 792138, 783372, BeAn5122, BeAr300851, BeAr436087, C-49, FL91-4679, FL93-939, GML903836, MP-9, PE6, и B105-00210. Пригодны как вирулентные, так и авирулентные штаммы EEEV. Дополнительные подходящие штаммы EEEV включают, помимо прочего, штаммы, описанные на веб-сайте ресурсов вирусных патогенов (ViPR; который общедоступен по адресу [www.viprbrc.org/brc/vipr\\_genome\\_search.spg?method=SubmitForm&blockId=868&decorator=toga](http://www.viprbrc.org/brc/vipr_genome_search.spg?method=SubmitForm&blockId=868&decorator=toga)). В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или репликон EEEV, например, самореплицирующаяся РНК, получен из штамма EEEV FL93-939. Дополнительные подходящие штаммы MADV включают, помимо прочего, штаммы, описанные в Arrigo et al., *J. Virology*, Jan 2010, 1014-1025, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или репликон MADV, например, самореплицирующаяся РНК, получен из штамма MADV BeAr300851.

[0131] В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой вирус Sindbis (SINV). В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или репликон, например, самореплицирующаяся РНК, принадлежит штамму SINV. Неограничивающие примеры штаммов SINV, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают штаммы SINV AR339, AR86 и Girdwood. Примеры штаммов SINV, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают, помимо прочего, штаммы, описанные Sammels et al. *J. Gen. Virol.* 1999, 80(3):739-748, Lundström and Pfeffer *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010, 10(9):889-907, Sigei et al. *Arch. of Virol.* 2018, 163:2465-2469 and Ling et al. *J. Virol.* 2019, 93:e00620-19. Дополнительные подходящие штаммы SINV включают, помимо прочего, штаммы, описанные на веб-сайте ресурсов вирусных патогенов (ViPR). Пригодны как вирулентные, так и авирулентные штаммы SINV. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA принадлежит штамму SINV Girdwood. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA принадлежит штамму SINV AR86. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA SINV получен из штамма SINV Girdwood. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA SINV получен из штамма SINV AR86. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один гетерологичный nsP или его часть модифицированного генома или srRNA получена из штамма SINV AR86. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один гетерологичный nsP или его часть представляет собой nsP1, nsP3, nsP4 или любую их часть, или комбинацию любого из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA принадлежит штамму SINV AR86.

[0132] В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой вирус западного лошадиного энцефалита (WEEV). Неограничивающие примеры штаммов

WEEV, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают WEEV California, McMillan, IMP181, Imperial, Imperial181, IMPR441, 71V-1658, AG80-646, BFS932, COA592, EP-6, E1416, BFS1703, BFS2005, BSF3060, BSF09997, CHLV53, KERN5547, 85452NM, Montana-64, S8-122 и TBT-235. Дополнительные примеры штаммов WEEV, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают 5614, 93A27, 93A30, 93A38, 93A79, B628(C115), CBA87, CNTR34, CO921356, Fleming, Lake43, PV012357A, PV02808A, PV72102, R02PV001807A, R02PV002957B, R02PV003422B, R05PV003422B, R0PV003814A и R0PV00384A. Пригодны как вирулентные, так и авирулентные штаммы WEEV. Дополнительные подходящие штаммы WEEV включают, помимо прочего, штаммы, описанные Bergren NA et al., J. Virol. 88(16): 9260-9267, август 2014 г., а также на веб-сайте ресурсов вирусных патогенов (ViPR). В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или srRNA WEEV получен из штамма WEEV Imperia.

[0133] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, вектор экспрессии srRNA идентифицирован как обладающий иммуноиндуцирующей функцией, подходящей для профилактического применения и/или терапевтического применения. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии srRNA идентифицирован как обладающий иммуноиндуцирующей функцией, подходящей для профилактического применения. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии srRNA идентифицирован как обладающий иммуноиндуцирующей функцией, подходящей для терапевтического применения.

#### **Композиции согласно раскрытию**

##### **Конструкции нуклеиновой кислоты**

[0134] Как более подробно описано ниже, один аспект настоящего изобретения относится к конструкциям нуклеиновой кислоты, включая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую конструкцию srRNA, которая описана в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая конструкцию srRNA, может быть функционально связана, например, помещена под управление элементов, необходимых для экспрессии (например промоторных последовательностей), которые обеспечивают экспрессию конструкции srRNA в клетке-хозяине, у субъекта или в бесклеточной системе экспрессии ex-vivo.

[0135] Термины «молекула нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся как к молекулам РНК, так и к молекулам ДНК, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие cDNA, геномную ДНК, синтетическую ДНК и молекулы ДНК или РНК, содержащие аналоги нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты может быть двухцепочечной или одноцепочечной (например смысловая цепь или антисмысловая цепь). Молекула нуклеиновой кислоты может содержать нетрадиционные или модифицированные нуклеотиды. Термины «полинуклеотидная последовательность» и «последовательность нуклеиновой кислоты», используемые в настоящем документе

взаимозаменяемо, относятся к последовательности полинуклеотидной молекулы. Полинуклеотидные и полипептидные последовательности, раскрытые в настоящем документе, показаны с использованием стандартных буквенных сокращений для нуклеотидных оснований и аминокислот, как указано в 37 CFR §1.82, который включает посредством ссылки WIPO Standard ST.25 (1998), Приложение 2, Таблицы 1-6.

[0136] Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут представлять собой молекулы нуклеиновой кислоты любой длины, включая молекулы нуклеиновой кислоты, длина которых обычно составляет от примерно 2 т.п.н. до примерно 50 т.п.н., например, от примерно 5 т.п.н. до примерно 40 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. 30 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 20 т.п.н. или от примерно 10 т.п.н. до примерно 50 т.п.н., например, от примерно 15 т.п.н. до примерно 30 т.п.н., от примерно 20 т.п.н. до примерно 50 т.п.н., от примерно 20 т.п.н. до примерно 40 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 25 т.п.н. или от примерно 30 т.п.н. до примерно 50 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты имеют длину по меньшей мере 6 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты имеют размер от примерно 6 т.п.н. до примерно 20 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты (например векторы или конструкции *srRNA*) согласно настоящему изобретению обычно имеют длину по меньшей мере примерно 2 т.п.н. Например, конструкции нуклеиновой кислоты (например векторы или *srRNA*) могут иметь длину по меньшей мере примерно 2 т.п.н., по меньшей мере примерно 3 т.п.н., по меньшей мере примерно 4 т.п.н., по меньшей мере примерно 5 т.п.н., по меньшей мере примерно 6 т.п.н. по меньшей мере примерно 7 т.п.н., по меньшей мере примерно 8 т.п.н., по меньшей мере примерно 9 т.п.н., по меньшей мере примерно 10 т.п.н., по меньшей мере примерно 11 т.п.н., по меньшей мере примерно 12 т.п.н. или более 12 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты (например векторы или *srRNA*) могут иметь длину от примерно 4 т.п.н. до примерно 20 т.п.н., от примерно 4 т.п.н. до примерно 18 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 16 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 14 т.п.н. от примерно 7 т.п.н. до примерно 12 т.п.н., от примерно 8 т.п.н. до примерно 16 т.п.н., от примерно 9 т.п.н. до примерно 14 т.п.н., от примерно 10 т.п.н. до примерно 18 т.п.н., от примерно 11 т.п.н. до примерно 16 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 18 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 20 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 10 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 8 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 7 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. до примерно 6 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 12 т.п.н., от примерно 6 до примерно 11 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 10 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 9 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 8 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. до примерно 7 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 11 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 10 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 9 т.п.н., от примерно 7 т.п.н. до примерно 8 т.п.н., от примерно 8 т.п.н. до примерно 8 т.п.н. до примерно 11 т.п.н., от примерно 8 т.п.н. до примерно 10 т.п.н., от примерно 8 т.п.н. до примерно 9 т.п.н., от примерно 9 т.п.н. до примерно 11 т.п.н. т.п.н., от примерно 9 т.п.н. до

примерно 10 т.п.н. или от примерно 10 т.п.н. до примерно 11 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты (например векторы или sgRNA) могут иметь длину от примерно 6 т.п.н. до примерно 14 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты (например векторы или sgRNA) могут иметь длину от примерно 6 т.п.н. до примерно 16 т.п.н.

[0137] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию sgRNA, включена в экспрессионную кассету или вектор экспрессии. Следует понимать, что кассета экспрессии обычно содержит конструкцию генетического материала, которая содержит кодирующие последовательности sgRNA и достаточное количество регуляторной информации для управления правильной транскрипцией и/или трансляцией кодирующих последовательностей в клетке-реципиенте *in vivo* и/или *ex vivo*. Как правило, кассета экспрессии может быть вставлена в вектор для нацеливания на нужную клетку-хозяина и/или на субъекта или индивидуума. В некоторых вариантах осуществления термин «кассета экспрессии» может использоваться взаимозаменяемо с термином «конструкция экспрессии». Таким образом, в некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии согласно настоящему изобретению содержит кодирующую последовательность sgRNA, которая раскрыта в настоящем документе, которая функционально связана с элементами регулирования экспрессии, такими как промотор, и необязательно, с любыми или комбинацией других последовательностей нуклеиновых кислот, которые влияют на транскрипцию или трансляцию кодирующей последовательности.

[0138] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность включена в вектор экспрессии. Специалисту в данной области техники будет понятно, что термин «вектор» обычно относится к рекомбинантной полинуклеотидной конструкции, предназначенной для переноса между клетками-хозяевами, и которую можно использовать с целью трансформации, например, введения гетерологичной ДНК в клетку-хозяин. По существу, в некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой репликон (например sgRNA), такой как плазида, фаг или космида, в который может быть вставлен другой сегмент ДНК, чтобы вызвать репликацию вставленного сегмента. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии может представлять собой интегрирующий вектор.

[0139] Молекулярные методы и способы, с помощью которых конструкции нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть собраны и охарактеризованы, более полно описаны в примерах настоящей заявки.

[0140] В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Как описано выше, термин «молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты» означает любую молекулу нуклеиновой кислоты (например ДНК, РНК), которая существует или возникает, хотя и косвенно, в результате манипуляций человека. В качестве неограничивающих примеров: cDNA представляет собой молекулу рекомбинантной ДНК, как и любая молекула

нуклеиновой кислоты, которая была получена с помощью полимеразной реакции (реакций) *in vitro* или к которой были присоединены линкеры или которая была интегрирована в вектор, такой как вектор клонирования или вектор экспрессии. В качестве неограничивающих примеров молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты: 1) была синтезирована или модифицирована *in vitro*, например, с использованием химических или ферментативных способов (например с использованием химического синтеза нуклеиновой кислоты или с использованием ферментов для репликации, полимеризации, экзонуклеолитического расщепления, эндонуклеолитического расщепления, лигирования, обратной транскрипции, транскрипции, модификации оснований (включая, например, метилирование) или рекомбинации (включая гомологичную и сайт-специфическую рекомбинацию) молекул нуклеиновой кислоты 2) содержит соединенные нуклеотидные последовательности, которые не являются сросшимися по своей природе; 3) была сконструирована с использованием способов молекулярного клонирования так, что в ней отсутствует один или несколько нуклеотидов по сравнению с встречающейся в природе нуклеотидной последовательностью; и/или 4) подвергалась манипуляциям с использованием способов молекулярного клонирования, так что она имеет одно или несколько изменений или перегруппировок последовательности по сравнению с встречающейся в природе нуклеотидной последовательностью.

[0141] В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе, получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК (например амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР), клонирования и т.д.) или химического синтеза. Молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе, включают молекулы природных нуклеиновых кислот и их гомологи, включая, помимо прочего, природные аллельные варианты и модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, в которых один или несколько нуклеотидных остатков были вставлены, удалены и/или заменены, так что такие модификации обеспечивают нужное свойство проявления биоактивности, которая описана в настоящем документе.

[0142] Специалисту в данной области техники будет понятно, что молекулы нуклеиновой кислоты, включая варианты встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты, можно получить с использованием ряда способов, известных специалистам в данной области (см., например, Sambrook et al., In: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Последовательность молекулы нуклеиновой кислоты может быть модифицирована относительно встречающейся в природе последовательности, из которой она получена, с использованием различных способов, включая, помимо прочего, классические способы мутагенеза и способы рекомбинантной ДНК, такие как, помимо прочего, направленный мутагенез, химическая обработка молекулы нуклеиновой кислоты для вызова мутаций, расщепление фрагмента нуклеиновой кислоты рестриктазой, лигирование фрагментов

нуклеиновой кислоты, ПЦР-амплификация и/или мутагенез выбранных участков последовательности нуклеиновой кислоты, рекомбинационное клонирование и химический синтез, включая химический синтез смесей олигонуклеотидов и лигирование групп смеси для «построения» смеси молекул нуклеиновой кислоты и их комбинаций. Гомологи молекул нуклеиновой кислоты можно выбрать из смеси модифицированных молекул нуклеиновой кислоты путем скрининга функции белка или репликона, например, самореплицирующейся РНК, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, и/или путем гибридизации с геном дикого типа или его фрагментом, или с помощью ПЦР с использованием праймеров, гомологичных молекуле или последовательности нуклеиновой кислоты-мишени или дикого типа.

#### Рекомбинантные клетки

[0143] Как более подробно описано ниже, один аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантным клеткам, которые были сконструированы таким образом, чтобы они содержали конструкцию нуклеиновой кислоты, которая описана в настоящем документе, и/или содержали (например экспрессировали) конструкцию srRNA, которая описана в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты и/или конструкция srRNA согласно настоящему изобретению может быть введена в клетку-хозяина для получения рекомбинантной клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты и/или конструкцию srRNA. Соответственно, прокариотические или эукариотические клетки, которые содержат конструкцию srRNA, которая описана в настоящем документе, и/или конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую конструкцию srRNA, которая описана в настоящем документе, также являются признаками настоящего изобретения. Введение конструкций srRNA и конструкций нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению в клетки может быть достигнуто способами, известными специалистам в данной области, такими как, например, вирусная инфекция, трансфекция, конъюгация, слияние протопластов, липофекция, электропорация, нуклеофекция, осаждение фосфата кальция, трансфекция, опосредованная полиэтиленимином (PEI), трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном, трансфекция, опосредованная липосомами, технология пушки для внедрения микрочастиц в клетку, прямая микроинъекция, доставка нуклеиновой кислоты с помощью наночастиц и т.п.

[0144] Соответственно, некоторые варианты осуществления изобретения относятся к рекомбинантным клеткам, например, рекомбинантным эукариотическим клеткам, например, клеткам насекомых или клеткам животных, которые содержат конструкцию srRNA и/или конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные клетки содержат конструкцию нуклеиновой кислоты, причем конструкция нуклеиновой кислоты может быть стабильно интегрирована в геном хозяина или может реплицироваться эписомально, или присутствовать в рекомбинантной клетке-хозяине в виде вектора экспрессии мини-кольца для стабильной или транзientной экспрессии. Соответственно, в некоторых вариантах

осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты сохраняется и реплицируется в рекомбинантной клетке-хозяине в виде эписомальной единицы. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты стабильно интегрирована в геном рекомбинантной клетки. Стабильная интеграция может быть достигнута с использованием классических способов случайной геномной рекомбинации или с помощью более точных способов редактирования генома, таких как использование направляющей РНК CRISPR/Cas9 или редактирования генома TALEN. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты присутствует в рекомбинантной клетке-хозяине в виде экспрессирующего вектора в форме мини-кольца для стабильной или транзистентной экспрессии.

[0145] Клетки-хозяева могут представлять собой либо нетрансформированные клетки, либо клетки, которые уже были трансфицированы по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева могут быть генетически сконструированы (например трансдуцированы, трансформированы или трансфицированы) по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0146] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии представляющих интерес полипептидов, которые описаны в настоящем документе, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка согласно настоящему изобретению представляет собой прокариотическую клетку, такую как бактерия *E.coli*, или эукариотическую клетку, такую как клетка насекомого (например клетка комара или клетка Sf21), или клетки млекопитающих (например клетки COS, клетки NIH 3T3 или клетки HeLa). В некоторых вариантах осуществления клетка существует *in vivo*, например, рекомбинантная клетка в живом организме, например, клетка трансгенного субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления субъектом является насекомое. В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект-млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка существует *ex vivo*, например, она была экстрагирована как отдельная клетка или как часть органа или ткани из живого тела или организма для лечения или процедуры, а затем возвращена в живой организм или организм. В некоторых вариантах осуществления клетку получают *in vitro*, например, из репозитория.

[0147] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка согласно изобретению представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка животного представляет собой клетку

млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления неограничивающие примеры рекомбинантной клетки согласно настоящему изобретению включают клетку CV1 почки обезьяны, трансформированную SV40 (например COS-7), эмбриональную клетку почки человека (например клетку НЕК 293 или НЕК 293), клетку почки детеныша хомяка (ВНК), клетку Сертоли мышцы (например клетки ТМ4), клетку почки обезьяны (CV1), клетку карциномы шейки матки человека (например HeLa), клетку почки собаки (например MDCK), клетку печени буйволиной крысы (например BRL 3A), клетку легкого человека (например W138), клетку печени человека (например Hep G2), клетку опухоли молочной железы мышцы (например ММТ 060562), клетку TRI, клетку FS4, клетку яичника китайского хомячка (клетку СНО), клетку почки африканской зеленой мартышки (например клетку Vero), клетку A549 человека, клетку шейки матки человека, клетку СHME5 человека, клетку PER.C6 человека, клетку миеломы мышцы NS0, эпидермоидную клетку гортани человека, клетку фибробласта человека, клетку HUH-7 человека, клетку MRC-5 человека, мышечную клетку человека, эндотелиальную клетку человека, клетку астроцита человека, клетку макрофага человека, клетку RAW 264.7 человека, клетку 3T3 мышцы, клетку L929 мышцы, клетку соединительной ткани мышцы, мышечную клетку мышцы и клетку почки кролика.

[0148] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантную клетку выбирают из группы, состоящей из клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero), клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки яичника китайского хомячка (клетки СНО), клетки A549 человека, клетки шейки матки человека, клетки яичника китайского хомячка (клетки СНО), клетки СHME5, эпидермоидной клетки гортани человека, клетки фибробласта человека, клетки НЕК-293 человека, клетки HeLa человека, клетки HepG2 человека, клетки HUH-7 человека, клетки MRC-5 человека, мышечной клетки человека, клетки 3T3 мышцы, клетки соединительной ткани мышцы, мышечной клетки мышцы и клетки почки кролика. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку, полученную из клетки, описанной выше (т.е. производную клетку исходной клетки, описанной в настоящем документе), такую как, например, клетка, которая либо размножена из клона исходной клетки, сконструированная версия исходной клетки или реклассификация исходной клетки после того, как она подверглась обширному пассажу или прошла через другого хозяина.

[0149] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка представляет собой клетку насекомого, например, клетку клеточной линии насекомых. В некоторых вариантах осуществления клетка насекомого представляет собой клетку Sf21. Дополнительные подходящие клеточные линии насекомых включают, помимо прочего, клеточные линии, полученные из отрядов насекомых Diptera, Lepidoptera и Hemiptera, и могут быть получены из различных источников тканей. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка согласно настоящему изобретению представляет собой клетку клеточной линии чешуекрылых насекомых. За последние несколько десятилетий доступность клеточных линий чешуекрылых насекомых увеличилась

примерно на 50 линий в десятилетие. Дополнительную информацию относительно доступных клеточных линий чешуекрылых насекомых можно найти, например, в Lynn D.E., Available lepidopteran insect cell lines. *Methods Mol. Biol.* 2007;388:117-38, который включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку комара, например, клетку видов комаров родов *Anopheles* (An), *Culex* (Cx) и *Aedes* (*Stegomyia*) (Ae). Иллюстративные клеточные линии комаров, подходящие для описанных в настоящем документе композиций и способов, включают клеточные линии следующих видов комаров: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes pseudoscutellaris*, *Aedes triseriatus*, *Aedes vexans*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles Stephensi*, *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex theileri*., *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex bitaeniorhynchus* и *Toxorhynchites amboinensis*. Подходящие клеточные линии комаров включают, помимо прочего, CCL-125, Aag-2, RML-12, C6/26, C6/36, C7-10, AP-61, At GRIP-1, At GRIP-2, UM-AVE1, Mos.55, Sua1B, 4a-3B, Mos.43, MSQ43 и LSB-AA695BB. В некоторых вариантах осуществления клетка комара представляет собой клетку клеточной линии C6/26.

#### Культура клеток

[0150] В другом аспекте в настоящем документе представлены клеточные культуры, содержащие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе, и культуральную среду. Как правило, культуральная среда может представлять собой любую подходящую культуральную среду для культивирования описанных в настоящем документе клеток. Методы трансформации широкого спектра вышеупомянутых клеток и видов-хозяев известны в данной области техники и описаны в технической и научной литературе. Соответственно, клеточные культуры, содержащие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе, также входят в объем настоящей заявки. В данной области техники известны способы и системы, подходящие для получения и поддержания культур клеток.

#### Трансгенные животные

[0151] В другом аспекте также предусмотрены трансгенные животные, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую конструкцию *srRNA*, которая описана в настоящем документе (например вектор или молекулу *srRNA*). В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления трансгенное млекопитающее представляет собой млекопитающее, отличное от человека. Как правило, трансгенные животные согласно настоящему изобретению могут представлять собой любое животное, кроме человека, известное в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления животные согласно настоящему изобретению, отличные от человека, представляют собой приматов, отличных от человека. Другие виды животных, подходящие для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают животных, которые (i) подходят для трансгенеза и (ii) способны перестраивать сегменты

гена иммуноглобулина для получения гуморального ответа. Примеры таких видов включают, помимо прочего, мышей, крыс, хомяков, кроликов, кур, коз, свиней, овец и коров. Дополнительные примеры животных, отличных от человека, подходящих для композиций и способов согласно настоящему изобретению, могут включать, помимо прочего, лабораторных животных (например мышей, крыс, хомяков, песчанок, морских свинок и т.д.), домашний скот (например лошадей, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, утки, гуси, куры и т. д.), одомашненных животных и домашних животных (например кошек, собак и т. д.), приматов, кроме человекообразных (например человекообразных обезьян, шимпанзе, орангутангов, мартышек и т. д.), рыб, амфибий (например лягушек, саламандр и т. д.), рептилий (например змей, ящериц и т. д.) и других животных (например лис, ласк, кроликов, норок, бобров, горностаев, выдр, соболей, тюленей, койотов., шиншиллы, оленей, ондатр, опоссумов и др.).

[0152] В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой насекомое. В некоторых вариантах осуществления насекомое представляет собой комара. В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные согласно настоящему изобретению представляют собой химерных трансгенных животных. В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные согласно настоящему изобретению представляют собой трансгенных животных с зародышевыми клетками и соматическими клетками, содержащими одну или несколько (например одну или несколько, две или более, три или более, четыре или более и т.д.) конструкции нуклеиновой кислоты согласно настоящему раскрытию. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько конструкций нуклеиновой кислоты стабильно интегрированы в геном трансгенных животных. В некоторых вариантах осуществления геномы трансгенных животных согласно настоящему изобретению могут содержать любую из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более копий одной или более конструкций нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

[0153] В данной области известны подходы и способы получения трансгенных животных, отличных от человека. Иллюстративные способы включают пронуклеарную микроинъекцию, микроинъекцию ДНК, перенос ДНК, опосредованный лентивирусным вектором, в ранние эмбрионы и опосредованный спермой трансгенез, опосредованное аденовирусом введение ДНК в сперму животных (например свиней), ретровирусные векторы (например видов птиц), перенос ядерных соматических клеток (например у коз). Обзор современного уровня получения трансгенных домашних сельскохозяйственных животных представлен в Niemann, H. et al. (2005) Rev. Sci. Tech. 24:285-298. В некоторых вариантах осуществления трансгенных животных-хозяев согласно настоящему изобретению, отличных от человека, получают с использованием стандартных способов, известных в данной области техники, для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в геном животного, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием классических способов случайной геномной рекомбинации или с

помощью более точных способов, таких как редактирование генома CRISPR/Cas под управлением направляющей РНК или редактирование генома эндонуклеазой под управлением ДНК с помощью NgAgo (*Natronobacterium gregoryi* Argonaute), или редактирование генома TALEN (эффektorные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции). В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии трансгенной микроинъекции и не требуют использования технологии гомологичной рекомбинации, и, таким образом, считается, что их легче подготовить и отобрать, чем подходы, использующие гомологичную рекомбинацию. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное продуцирует представляющий интерес белок, который описан в настоящем документе.

#### Фармацевтические композиции

[0154] Конструкции sgRNA, конструкции нуклеиновых кислот и рекомбинантные клетки согласно настоящему изобретению можно включать в композиции, включая фармацевтические композиции. Такие композиции обычно содержат одну или несколько конструкций sgRNA, конструкций нуклеиновых кислот и рекомбинантных клеток, описанных и представленных в настоящем документе, а также фармацевтически приемлемый наполнитель, например, носитель. Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения в настоящем документе представлены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически приемлемый наполнитель и одно или несколько из следующего: (1) конструкцию sgRNA, раскрытую в настоящем документе, (2) нуклеиновую кислоту, раскрытую в настоящем документе, (3) рекомбинантную клетку, которая раскрыта в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены композиции, содержащие конструкцию sgRNA, раскрытую в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены композиции, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены композиции, содержащие рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

[0155] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, могут иметь одну или несколько из следующих характеристик. Конструкции sgRNA согласно настоящему изобретению можно использовать в чистом виде или в составе средства доставки. Иллюстративные пути включают использование в свободной форме, например, встраивание в нуклеиновую кислоту, например, в вектор. Например, как более подробно описано ниже, конструкция sgRNA, описанная в настоящем документе, может быть использована в качестве вакцины.

[0156] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению составлены для профилактики, лечения или управления заболеванием, таким

как иммунное заболевание или микробная инфекция. Например, композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены в виде профилактической композиции, терапевтической композиции или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый наполнитель, или их смеси.

[0157] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению составлены для применения в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящей заявке получены для использования в качестве адъюванта. В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению составлены для применения в качестве иммуногенной композиции. В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящей заявке получены для использования в качестве биотерапевтических средств.

[0158] Для использования в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению конструкция *srRNA*, нуклеиновая кислота или рекомбинантная клетка, которая описана в настоящем документе, могут быть включены в состав средств доставки или вместе с ними. Иллюстративные средства доставки, подходящие для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают, помимо прочего, липосомы (например нейтральные или анионные липосомы), микросферы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), наночастицы на основе липидов (LNP), полимерные наночастицы, вирусные репликационные частицы (VRP) или конъюгированные с биоактивными лигандами, которые могут облегчить доставку и/или усилить иммунный ответ. Эти соединения легко доступны специалисту в данной области; например, см. «Liposomes: A Practical Approach, RCP New Ed, IRL press (1990). Также в данной области известны и используются адъюванты, отличные от липосом и т.п. Адъюванты могут защищать антиген (например конструкцию *srRNA*) от быстрого распространения путем его изоляции в локальном месте, или они могут содержать вещества, которые стимулируют хозяина секретировать факторы, хемотаксические для макрофагов и других компонентов иммунной системы. Соответствующий выбор может быть сделан специалистами в данной области, например, из описанных ниже.

[0159] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению может содержать одно или несколько из следующих веществ: физиологический буфер, липосому, наночастицу на основе липидов (LNP), полимерную наночастицу, частицу вирусного репликационного комплекса (VRP), микросферу, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), конъюгат биоактивного лиганда или любое из них.

[0160] В некоторых вариантах осуществления конструкции *srRNA* и конструкции нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть доставлены в клетку или субъекту с помощью наночастиц на основе липидов (LNP). LNP обычно менее иммуногенны, чем вирусные частицы. Хотя у многих людей уже есть иммунитет к вирусным частицам, иммунитета к LNP не существует. Кроме того, маловероятно возникновение адаптивного иммунного ответа против LNP, что позволяет повторно

вводить дозу LNP.

[0161] Липиды, подходящие для описанных в настоящем документе композиций и способов, могут представлять собой катионные липиды, ионизируемые катионные липиды, анионные липиды или нейтральные липиды.

[0162] В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению может содержать один или несколько ионизируемых липидов. В рамках настоящего изобретения термин «ионизируемый липид» относится к липиду, который является катионным или становится ионизируемым (протонированным), когда pH снижается ниже значения pKa ионизируемой группы липида, но является более нейтральным при более высоких значениях pH. При значениях pH ниже pKa липид способен связываться с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами (например олигонуклеотидами). В рамках настоящего изобретения термин «ионизируемый липид» включает липиды, которые принимают положительный заряд при снижении pH по сравнению с физиологическим pH, и любой из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд при селективном pH, таком как физиологический pH. Постоянно катионные липиды, такие как DOTMA, оказались слишком токсичными для клинического использования. Ионизируемый липид может присутствовать в липидных препаратах согласно другим вариантам осуществления, предпочтительно в соотношении от примерно 30 до примерно 70 моль%, в некоторых вариантах осуществления примерно 30 моль%, в других вариантах осуществления примерно 40 моль%, в других вариантах осуществления примерно 45 моль%, в других вариантах, примерно 47,5 моль% в других вариантах, примерно 50 моль%, в других вариантах и примерно 60 моль% в третьих («моль%» означает процент от общего числа молей, который имеет конкретный компонент). Термин «примерно» в этом абзаце означает диапазон плюс или минус 5 моль%. ДОДМА, или 1,2-диолеилокси-3-диметиламинопропан, представляет собой ионизируемый липид, как и DLin-MC3-DMA или 0-(Z,Z,Z,Z-гептатриаконта-6,9,26,29-тетраен-19-ил)-4-(N,N-диметиламино) («MC3»).

[0163] Иллюстративные ионизируемые липиды, подходящие для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают липиды, описанные в публикациях PCT WO2020252589A1 и WO2021000041A1, патентах США №№ 8450298 и 10844028 и Love K.T. et al., Proc Natl Acad Sci USA, Feb. 2, 2010 107 (5) 1864-1869, которые все полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит одно или несколько липидных соединений, описанных Love KT et al. (2010 см. выше), такие как C16-96, C14-110 и C12-200. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, состоящей из ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит липид C12-200. Структура липида C12-200 известна в данной области техники и описана, например, в патентах США № 8450298 и 10844028, которые полностью включены в

настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления C12-200 комбинируют с холестерином, C14-PEG2000 и DOPE. В некоторых вариантах осуществления C12-200 комбинируют с DSPC и DMG-PEG2000.

[0164] В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит один или несколько катионных липидов. Для использования при LNP было разработано несколько различных ионизируемых катионных липидов. Подходящие катионные липиды включают, помимо прочего, 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 и 7C1. В одном типе LNP фрагмент GalNAc прикреплен к внешней стороне LNP и действует как лиганд для поступления в печень через рецептор асиалогликопротеина. Любой из этих катионных липидов можно использовать для составления LNP для доставки конструкций siRNA и конструкций нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению.

[0165] В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит один или несколько нейтральных липидов. Неограничивающие нейтральные липиды, подходящие для композиций и способов согласно настоящему изобретению, включают DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. В некоторых вариантах осуществления LNP согласно настоящему изобретению содержит одно или несколько ионизируемых липидных соединений, описанных в публикациях PCT WO2020252589A1 и WO2021000041A1.

[0166] Для получения LNP можно использовать ряд других липидов или комбинаций липидов, известных в данной области. Неограничивающие примеры липидов, подходящих для использования для получения LNP, включают DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерин, DOTAP-холестерин, GAP-DMORIE-DPPE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоль (PEG). Дополнительные неограничивающие примеры катионных липидов включают 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1, 7C1 и комбинацию любого из них. Дополнительные неограничивающие примеры нейтральных липидов включают DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. Неограничивающие примеры PEG-модифицированных липидов включают PEG-DMG, PEG-CerC14 и PEG-CerC20.

[0167] В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 100:1 до примерно 3:1, от примерно 70:1 до 10:1 или от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 20:1. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 8:1. В некоторых вариантах осуществления наночастицы на основе липидов имеют средний диаметр менее примерно 1000 нм, примерно 500 нм, примерно 250 нм, примерно 200 нм, примерно 150 нм, примерно 100 нм, примерно 75 нм, примерно 50 нм или примерно 25 нм. В некоторых

вариантах осуществления LNP имеют средний диаметр примерно от 70 нм до 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 88 нм до примерно 92 нм, от примерно 82 нм до примерно 86 нм или от примерно 80 нм до примерно 95 нм.

[0168] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению составлены в виде полимерных наночастиц. В некоторых вариантах осуществления композиции представляют собой иммуногенные композиции, например композиции, которые могут стимулировать иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции составлены в виде вакцины. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены в виде адьюванта.

[0169] В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции по существу неиммуногенны для субъекта, например, композиции, которые минимально стимулируют иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления неиммуногенные или минимально иммуногенные композиции составляют в качестве биотерапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены для одного или более из интраназального введения, трансдермального введения, внутривентриального введения, внутримышечного введения, внутритрахеального введения, интранодального введения, внутриопухолевого введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения, внутриглазного, ректального введения и перорального введения.

[0170] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экспресс-приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™. (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). В этих случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она может быть стабильной в условиях получения и хранения и может быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ, например, додецилсульфата натрия. Предотвратить действие микроорганизмов можно с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобных. Во многих случаях в композицию обычно следует включать изотонические средства,

например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит и/или хлорид натрия. Пролонгированной абсорбции инъеклируемых композиций можно добиться путем включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[0171] Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше.

[0172] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению составлены для ингаляции, например, в виде аэрозоля, спрея, аэрозоля, жидкости или порошка. Введение путем ингаляции может осуществляться в форме сухих порошков или аэрозольных составов, которые вдыхает субъект (например пациент) с помощью либо ингаляционного устройства, например, микрораспылителя, дозирующего ингалятора под давлением, либо небулайзера.

[0173] В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для одного или более из интраназального введения, трансдермального введения, внутримышечного введения, интранодального введения, внутриопухолевого введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, внутрибрюшинного введения, внутритрахеального введения, перорального введения, интравагинального, внутриглазного, ректального или внутрочерепного введения. В некоторых вариантах осуществления введенная композиция приводит к увеличению выработки интерферона у субъекта.

#### Наборы

[0174] В настоящем документе также представлены различные наборы для применения описанного в настоящем документе способа. В частности, некоторые варианты осуществления изобретения предоставляют наборы для вызова иммунного ответа у субъекта. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для профилактики заболеваний у субъектов, нуждающихся в этом. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для способов лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены наборы, которые содержат одну или несколько конструкций srRNA, конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций, представленных и описанных в настоящем документе, а также письменные инструкции по их получению и использованию.

[0175] В некоторых вариантах осуществления наборы согласно настоящему изобретению дополнительно содержат одно или несколько средств, полезных для введения субъекту любой из представленных конструкций srRNA, конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций.

Например, в некоторых вариантах осуществления наборы согласно настоящему изобретению дополнительно содержат один или несколько шприцов (включая предварительно заполненные шприцы) и/или катетеры (включая предварительно заполненные шприцы), используемые для введения субъекту любой из предложенных конструкций *srRNA*, конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать одно или несколько дополнительных терапевтических средств, которые можно вводить одновременно или последовательно с другими компонентами набора для нужной цели, например, для вызова иммунного ответа, для предотвращения или лечения состояния у нуждающегося в этом субъекта.

[0176] Любой из описанных выше наборов может дополнительно содержать один или несколько дополнительных реагентов, причем такие дополнительные реагенты можно выбирать из: буферов для разведения, растворов для восстановления, промывочных буферов, контрольных реагентов, контрольных векторов экспрессии, отрицательного контроля, положительного контроля, реагентов, подходящих для получение *in vitro* предложенных конструкций *srRNA*, конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению.

[0177] В некоторых вариантах осуществления компоненты набора могут находиться в отдельных контейнерах. В некоторых других вариантах осуществления компоненты набора можно объединить в одном контейнере. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения набор содержит одну или несколько конструкций нуклеиновых кислот (например векторов или молекул *srRNA*), рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, представленных и описанных в настоящем документе, в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе) и дополнительное терапевтическое средство в другом контейнере (например в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

[0178] В другом варианте осуществления набор содержит комбинацию описанных в настоящем документе композиций, включая одну или несколько конструкций нуклеиновых кислот (например векторов или молекул *srRNA*), рекомбинантных клеток и/или рекомбинантных полипептидов согласно настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, составленными вместе в фармацевтической композиции и, необязательно, в одном общем контейнере.

[0179] Если набор содержит фармацевтическую композицию для парентерального введения субъекту, набор может содержать устройство (например инъекционное устройство или катетер) для выполнения такого введения. Например, набор может содержать одну или несколько игл для подкожных инъекций или другие устройства для инъекций, как обсуждалось выше, содержащие одну или несколько конструкций нуклеиновой кислоты (например векторов или молекул *srRNA*), рекомбинантных клеток и/или рекомбинантных полипептидов согласно настоящему изобретению.

[0180] В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно

содержать инструкции по использованию компонентов набора для применения на практике способов, раскрытых в настоящем документе. Например, набор может содержать вкладыш в упаковку, содержащий информацию о фармацевтических композициях и лекарственных формах в наборе. Как правило, такая информация помогает пациентам и врачам эффективно и безопасно использовать прилагаемые фармацевтические композиции и лекарственные формы. Например, во вкладыше может быть представлена следующая информация, касающаяся комбинации раскрытия: фармакокинетика, фармакодинамика, клинические исследования, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, меры предосторожности, побочные реакции, передозировка, правильная дозировка и способ применения, как поставлено, надлежащие условия хранения, ссылки, информация о производителе/дистрибьютере и информация об интеллектуальной собственности.

[0181] Инструкции по применению способов обычно записывают на подходящем носителе записи. Например, инструкции могут быть напечатаны на подложке, такой как бумага или пластик и т. д. Инструкции могут присутствовать в наборе в виде вкладыша в упаковке, в маркировке контейнера набора или его компонентов (например связанных с упаковкой или дополнительной упаковкой) и т. д. Инструкции могут быть представлены в виде электронного файла данных, находящегося на подходящем машиночитаемом носителе, например компакт-диске, дискете, флэш-накопителе и т. д. В некоторых случаях реальных инструкций в наборе нет, но могут быть предусмотрены средства для получения инструкций из удаленного источника (например через Интернет). Примером этого варианта осуществления является набор, который содержит веб-адрес, по которому можно просмотреть инструкции и/или с которого можно загрузить инструкции. Как и в случае с инструкциями, это средство получения инструкций может быть записано на подходящей подложке.

Способы вызова иммунного ответа, профилактики или лечения заболеваний

[0182] Введение любой из описанных в настоящем документе композиций, например, конструкций *srRNA*, конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций, можно использовать при лечении соответствующих заболеваний, таких как пролиферативные расстройства (например рак), инфекционные заболевания, заболевания (например острые инфекции, хронические инфекции или вирусные инфекции), редкие заболевания, и/или аутоиммунные заболевания, и/или воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления конструкции *srRNA*, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть полезны для вызова фармакодинамического эффекта у субъекта. В некоторых вариантах осуществления конструкции *srRNA*, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть полезны для модуляции, например, вызова или подавления иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления конструкции

stRNA, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть включены в терапевтические средства для использования в способах лечения субъекта, у которого есть заболевание, у которого подозревается наличие заболевания или который может иметь высокий риск развития одного или нескольких соответствующих заболеваний или состояний. Иллюстративные заболевания или состояния могут включать в себя, помимо прочего, рак, иммунные заболевания, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, генную терапию, замену генов, сердечно-сосудистые заболевания, возрастные патологии, редкие заболевания, острую инфекцию и хроническую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент, находящийся под наблюдением врача.

[0183] Примеры аутоиммунных заболеваний, подходящих для способов согласно настоящему изобретению, включают, помимо прочего, ревматоидный артрит, остеоартрит, болезнь Стилла, семейную средиземноморскую лихорадку, системный склероз, рассеянный склероз, болезнь Бехтерева, тиреоидизм Хашимото, системную красную волчанку, синдром Шегрена, диабетическую ретинопатию, диабетическую васкулопатию, диабетическую невралгию, инсулит, псориаз, большую алопецию, тепловую и холодную аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА), пернициозную анемию, острые воспалительные заболевания, аутоиммунный аденолит, хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию (CIDP), синдром Ламберта-Итона, склероатрофический лишай, болезнь Лайма, болезнь Грейвса, болезнь Бехчета, болезнь Меньера, реактивный артрит (синдром Рейтера), синдром Черджа-Стросса, синдром Когана, синдром Тибьержа-Вейсенбаха, обыкновенную и листовидную пузырчатку, буллезный пемфигоид, ревматическую полимиалгию, полимиозит, первичный билиарный цирроз, панкреатит, перитонит, псориазический артрит, ревматическую лихорадку, саркоидоз, синдром Шергенсена, склеродермию, целиакию, синдром ригидности, артериит Такаюсу, транзиторную непереносимость глютена, аутоиммунный увеит, витилиго, полихондрит, герпетиформный дерматит (DH) или болезнь Дюринга, фибромиалгию, Синдром Гудпасчера, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, аутоиммунный гепатит, воспалительные заболевания кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, миастению, нарушения иммунного комплекса, гломерулонефрит, узелковый полиартериит, антифосфолипидный синдром, полигландулярный аутоиммунный синдром, идиопатический фиброз легких, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), крапивницу, аутоиммунное бесплодие, ювенильный ревматоидный артрит, саркоидоз и аутоиммунную кардиомиопатию.

[0184] Неограничивающие примеры инфекций, подходящих для способов согласно настоящему изобретению, включают инфекции, вызванные вирусами, такими как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), цитомегаловирус (CMV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирус папилломы

человека (HPV), вирус Эпштейна-Барра (EBV), коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV2), коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), ближневосточный респираторный синдром (MERS), вирус гриппа, и вирус Эбола. Дополнительные инфекции, подходящие для способов согласно настоящему изобретению, включают инфекции внутриклеточными паразитами, такими как *Leishmania*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Plasmodium*, *Brucella*, микобактерии, листерии, токсоплазмы и трипаносомы. В некоторых вариантах осуществления конструкции sgRNA, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции могут быть полезны при лечении и/или профилактике иммунных заболеваний, аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, таких как, например, гломерулонефрит, воспалительные заболевания. заболевания кишечника, нефрит, перитонит, псориазический артрит, остеоартрит, болезнь Стилла, семейная средиземноморская лихорадка, системная склеродермия и склероз, воспалительные заболевания кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, острое повреждение легких, менингит, энцефалит, увеит, множественная миелома, гломерулонефрит, нефрит, астма, атеросклероз, дефицит адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Шегрена, ювенильный диабет, болезнь Рейтера, болезнь Бехчета, иммунокомплексный нефрит, IgA-нефропатия, IgM-полинейропатии, иммуноопосредованные тромбоцитопении, гемолитическая анемия, миастения gravis, волчаночный нефрит, красная волчанка, ревматоидный артрит (RA), анкилозирующий спондилит, пузырьчатка, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, васкулиты мелких сосудов, синдром Омена, хроническая почечная недостаточность, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, острый инфекционный мононуклеоз, ВИЧ, ассоциированные с вирусом герпеса заболевания, вирусные инфекции человека, коронавирус, другие энтеровирусы, вирус герпеса, вирус гриппа, вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус или аденовирусная инфекция, бактериальная пневмония, раны, сепсис, церебральный инсульт/отек мозга, ишемически-реперфузионное повреждение и гепатит С.

[0185] Неограничивающие примеры воспалений, подходящих для способов согласно настоящему изобретению, включают воспалительные заболевания, такие как астма, воспалительное заболевание кишечника (IBD), хронический колит, спленомегалия и ревматоидный артрит.

[0186] В одном аспекте в настоящем документе предложены способы вызова фармакодинамического эффекта у субъекта, причем способы включают введение субъекту композиции, содержащей одно или несколько из следующего: (a) репликон, например, конструкцию самореплицирующейся РНК (srRNA), которая описана в настоящем документе; (b) нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе; (c) рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе; и (d) фармацевтическую композицию, которая описана в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармакодинамический эффект включает возникновение

иммунного ответа у субъекта.

[0187] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы предотвращения или лечения заболевания у субъекта, причем способы включают профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, содержащей одно или несколько из следующего: (a) репликон, например, самореплицирующуюся конструкцию РНК (srRNA), которая описана в настоящем документе; (b) нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе; (c) рекомбинантную клетку, которая описана в настоящем документе; и (d) фармацевтическую композицию, которая описана в настоящем документе.

[0188] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления способов вызова фармакодинамического эффекта, и/или предотвращения, и/или лечения заболевания у субъекта, как описано в настоящем документе, могут иметь один или несколько следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления введенная композиция вызывает выработку одной или нескольких провоспалительных молекул у субъекта. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько провоспалительных молекул включают гамма-интерферон ( $IFN\gamma$ ), цитокины,  $TNF-\alpha$ , GM-CSF и  $MIP1\alpha$ , гранзим В, гранзим А, перфорин или комбинацию любых из них. В некоторых вариантах осуществления субъекта ранее лечили одним или несколькими способами лечения, и у него развилась по меньшей мере частичная резистентность к указанному одному или нескольким способам лечения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из одного или нескольких способов лечения предусматривает малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой пролиферативное заболевание, воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или микробную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется или подозревается наличие заболевания, связанного с пролиферативным расстройством, воспалительным заболеванием, аутоиммунным заболеванием или микробной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления пролиферативное заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы.

[0189] Неограничивающие примеры рака молочной железы, подходящие для способов согласно настоящему изобретению, включают рак протоков молочной железы, дольковый рак молочной железы, недифференцированный рак молочной железы, дольковую саркому молочной железы, ангиосаркому молочной железы и первичную лимфому молочной железы. Рак молочной железы может включать рак молочной железы стадии I, стадии II, стадии IIIA, стадии IIIB, стадии IIIC и стадии IV. Протоковые карциномы молочной железы могут включать инвазивные типы карциномы, инвазивную карциному *in situ* с преобладанием внутрижелезистых компонентов, воспалительный рак молочной железы и протоковую карциному молочной железы. Протоковые карциномы молочной железы могут включать инвазивные дольковые карциномы с преобладанием компонентов *in situ*, инвазивные дольковые карциномы и инфильтрирующие дольковые карциномы. Рак молочной железы может включать болезнь Педжета, экстрамаммарную

болезнь Педжета, болезнь Педжета с внутрижелезистым раком и болезнь Педжета с инвазивной протоковой карциномой. Рак молочной железы может включать новообразования молочной железы с гистологической и гиперструктурной гетерогенностью (например смешанные типы клеток). Рак молочной железы можно классифицировать как базальноподобный, люминальный А, люминальный В, ERBB2/Her2+ или нормальный молочноподобный молекулярный подтип.

[0190] В некоторых вариантах осуществления раскрытые композиции могут быть составлены так, чтобы быть совместимыми с предполагаемым путем введения. Например, конструкции sgRNA, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить перорально, ингаляционно или парентерально. Примеры парентеральных путей введения включают, например, внутримышечное, внутриопухолевое, внутриглазное, внутривенное, внутриузловое, внутрикожное, подкожное, чрескожное (местное), чресслизистое, интравагинальное и ректальное введение. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутриопухолевое. Растворы или суспензии, используемые для парентерального применения, могут содержать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты, фосфаты, трис, сахароза и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как одно- и/или двухосновный фосфат натрия, соляная кислота или гидроксид натрия (например с pH примерно 7,2-7,8, например 7,5). Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[0191] Описанные в настоящем документе композиции, например, конструкции sgRNA, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции можно вводить от одного или более раз в день до одного или более раз в неделю; в том числе один раз через день. Лечение субъекта терапевтически эффективным количеством конструкций sgRNA субъекта, конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению может предусматривать однократное лечение или может предусматривать серию курсов лечения. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят с недельными интервалами, например, 1-2, 2-3 или 3-4 дозы, вводимые с интервалами 1-2, 2-3 или 3-4 недели. За этим может последовать дополнительное введение каждые 1, 2, 3 или 4 месяца. В некоторых вариантах осуществления можно вводить 3 дозы внутримышечно с интервалом в 3-4 недели с

последующим внутримышечным введением каждые 3 месяца. Альтернативно, композицию можно вводить с более короткими интервалами, например, каждые 8 часов в течение пяти дней, с последующим периодом отдыха от 2 до 14 дней, например 9 дней, с последующими дополнительными пятью днями введения каждые 8 часов. Что касается конструкций srRNA и конструкций нуклеиновой кислоты, терапевтически эффективное количество конструкции srRNA и конструкции нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению (например эффективная дозировка) зависит от выбранной конструкции srRNA и конструкции нуклеиновой кислоты.

[0192] Как обсуждалось выше, терапевтически эффективное количество включает количество терапевтической композиции, достаточное для обеспечения конкретного эффекта при введении субъекту, например, субъекту, у которого имеется, подозревается наличие или имеется риск развития заболевания, например рака. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество включает количество, достаточное для предотвращения или задержки развития симптома заболевания, изменения течения симптома заболевания (например помимо прочего, замедления прогрессирования симптома заболевания), или обращения вспять симптома заболевания.

[0193] Лечение считается эффективным, если по меньшей мере один или все признаки или симптомы заболевания улучшаются или уменьшаются. Эффективность также может быть измерена по отсутствию ухудшения состояния пациента по оценкам госпитализации или необходимости медицинского вмешательства (например прогрессирование заболевания останавливается или, по меньшей мере, замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области и/или описаны в настоящем документе. Лечение включает любое лечение заболевания у субъекта или животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающее) и включает: (1) ингибирование заболевания, например, остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания, например, вызывая регресс симптомов; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития симптомов.

[0194] В некоторых вариантах осуществления конструкции srRNA, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту в композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, и в количестве, эффективном для стимуляции иммунного ответа. Как правило, субъекта можно иммунизировать с помощью начальной серии инъекций (или введения одним из других способов, описанных ниже) и впоследствии провести ревакцинацию для повышения защиты, обеспечиваемой исходной серией инъекций. Начальную серию инъекций и последующие бустерные инъекции вводят в таких дозах и в течение такого периода времени, которые необходимы для стимуляции иммунного ответа у субъекта. В некоторых вариантах раскрытых способов субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек.

[0195] Как описано выше, фармацевтически приемлемые носители, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для импровизированного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В этих случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Кроме того, композиция должна быть стабильной в условиях получения и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.д.), их подходящие смеси и растительные масла. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Профилактика действия микроорганизмов может быть достигнута различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п.

[0196] Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения конструкций sgRNA, конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций в необходимое средство в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием.

[0197] Когда конструкции sgRNA, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции надлежащим образом защищены, как описано выше, их можно вводить перорально, например, с инертным разбавителем или ассимилируемым съедобным носителем. Конструкции sgRNA, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции и другие ингредиенты также могут быть заключены в желатиновые капсулы с твердой или мягкой оболочкой, спрессованы в таблетки или включены непосредственно в рацион человека. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть включено в состав наполнителей и использовано в форме пероральных таблеток, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п.

#### Дополнительные способы лечения

[0198] В некоторых вариантах осуществления композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в сочетании по меньшей мере с одним дополнительным способом терапии (например второй терапией). В некоторых вариантах осуществления вторую терапию выбирают из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсинотерапии, таргетной терапии и хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления вторую

терапию выбирают из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсической терапии или хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления первую терапию и вторую терапию назначают одновременно. В некоторых вариантах осуществления первую терапию назначают одновременно со второй терапией. В некоторых вариантах осуществления первую терапию и вторую терапию проводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления первую терапию назначают перед второй терапией. В некоторых вариантах осуществления первую терапию назначают после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления первую терапию назначают до и/или после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления первую терапию и вторую терапию назначают поочередно. В некоторых вариантах осуществления первую терапию и вторую терапию проводят вместе в виде одного препарата.

#### Примеры

[0199] В практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, традиционные способы молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, которые хорошо известны специалистам в данной области. Такие способы подробно описаны в литературе, например, в Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory and Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (jointly referred to herein as “Sambrook”); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (including supplements through 2014); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. et al. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferré, F. & Gibbs, R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (including supplements through 2014); and Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V, раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0200] Дополнительные варианты осуществления раскрыты более подробно в следующих примерах, которые представлены в качестве иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения объема данного раскрытия или формулы изобретения.

#### Пример 1

Получение векторов EEEV, кодирующих конструкции srRNA для применения в

вакцинах

[0201] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для конструирования базового вектора EEEV (например без гетерологичного гена), который впоследствии использовался для конструирования векторов EEEV, которые экспрессируют представляющий интерес ген или гены (например ESR1 или его варианты, PI3K или его варианты, HER2 или его варианты и HER3 или его варианты).

[0202] Базовый вектор EEEV (т.е. без представляющего интерес гетерологичного гена) конструировали следующим образом. Базовый вектор EEEV синтезировали de novo из четырех частей размером ~4 т.п.н. (Twist Bioscience) из эталонной последовательности (Genbank EF151502) с несколькими модификациями. Молчащие мутации G301A, A3550C, G4516A, G5725A и G7399A были включены для устранения сайтов разрезания рестриктазой. Уникальный сайт разрезания рестриктазой (SpeI, 5'-A'CTAG, T-3') был включен вместо кодирующей последовательности нативных структурных генов EEEV (где 5'А соответствует местоположению стартового кодона ATG структурного полипротеина, а 3'Т соответствует местоположению стоп-кодона TAA структурного полипротеина). 5'-адаптерную последовательность (5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3'; SEQ ID NO: 5) вводили перед сайтом SpeI, а 3'-адаптерную последовательность (5'-GACCGCTACGCCCAATGACCCGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 6) вводили после сайта SpeI для последующих процедур Gibson Assembly® (Gibson et al., Nat. Methods 6, 343-345, 2009). Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 7) был включен до последовательности генома EEEV, а после содержал последовательность poly(A), за которой следовал сайт SapI, который делал разрез перед последовательностью сайта узнавания. Сразу после сайта SapI находится терминирующая последовательность T7 (5'-ААССССТСТСТААААССГГАГГГГТТТТТТТТ-3'; SEQ ID NO: 8), за которой следует уникальный сайт разрезания рестриктазой (NotI, 5'-GC'GGCC, GC-3'). Части были объединены в реакции Gibson Assembly®, состоящей из пяти частей: линейаризованная основная цепь pYL и четыре синтезированных фрагмента, в результате чего получился базовый вектор EEEV.

[0203] Конструирование вектора EEEV, содержащего гетерологичные гены, осуществляли следующим образом: базовый вектор EEEV линейаризовали путем расщепления SpeI. Варианты ESR1, PI3K, HER2 и HER3 были оптимизированы/реорганизованы по кодонам для экспрессии в организме человека in silico и вместе с EMCV IRES были синтезированы de novo (GeneArt, IDT). Синтетические продукты амплифицировали с использованием праймеров, которые добавляли либо 5', либо 3'-адаптерные последовательности на концах генов, либо праймеров, которые добавляли последовательности Р2А и/или гомологичные последовательности к вставкам соседних генов. Продукт расщепления и продукты ПЦР объединяли с помощью процедуры Gibson Assembly®, получая конечные векторы.

Пример 2

Оценка *in vitro* векторов EEEV, кодирующих конструкции srRNA вакцины

[0204] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vitro*, проведенных для оценки уровней экспрессии синтетических конструкций srRNA EEEV, описанных в примере 1 выше, и для исследования любого их дифференциального поведения (например репликации и экспрессии белка).

[0205] Транскрипция *in vitro*: РНК получали путем транскрипции *in vitro* из линейаризованной SapI плазмидной матрицы с полимеразой бактериофага T7 либо с 5'-кэпом ARCA (набор mRNA HiScribe™ T7 ARCA, NEB), либо путем транскрипции без кэпа (набор для синтеза РНК HiScribe™ T7 High Yield, NEB) с последующим добавлением 5'-кэпа 1 (система кэпирования Vaccinia, mRNA Cap 2'-O-метилтрансфераза, NEB). Затем РНК очищали с помощью экстракции фенолом/хлороформом или очистки на колонке (набор для очистки Monarch® RNA Cleanup Kit, NEB). Концентрацию РНК определяли по поглощению при 260 нм (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

[0206] Репликация: РНК трансформировали путем электропорации в клетки ВНК-21 или Vero (например 4D-Nucleofector™, Lonza). Через 15-22 часа после трансформации клетки фиксировали и пермеабелизировали (eBioscience™ Foxp3/набор буферов для окрашивания факторов транскрипции, Invitrogen) и окрашивали с использованием PE-конъюгированных мышиных моноклональных антител против dsRNA (J2, Scicons) для количественного определения частоты dsRNA<sup>+</sup> клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI) dsRNA в отдельных клетках способом флуоресцентной проточной цитометрии.

[0207] Экспрессия белка: РНК трансформировали путем электропорации в клетки ВНК-21 или Vero (например 4D-Nucleofector™, Lonza). ESR1: через 15-22 часа после трансформации клетки собирали и лизировали в буфере RIPA. Концентрацию белка лизата нормализовали, затем исследовали с помощью иммуноблота с использованием кроличьих антител против ER $\alpha$  (A300-497A, Bethyl) и визуализировали с использованием конъюгированных с AF800 козьих антител против IgG кролика (A32735, Thermo) (фиг. 3A). Сигнал флуоресценции от образцов клеток, трансформированных синтетическим моногенным репликоном EEEV, экспрессирующим ESR1, использовали для нормализации уровней экспрессии для оценки относительной экспрессии ESR1 по панели бигенных и тетрагенных репликонов (фиг. 3B). P13K: через 15-22 часа после трансформации клетки собирали и лизировали в буфере RIPA. Концентрацию белка лизата нормализовали, затем исследовали в иммуноблоте с кроличьими антителами против P13KCA (PA587398, Thermo) и визуализировали с конъюгированных с AF800 козьих антител против IgG кролика (A32735, Thermo) (фиг. 3C). Сигнал флуоресценции от образцов клеток, трансформированных синтетическим моногенным репликоном EEEV, экспрессирующим P13K, использовали для нормализации уровней экспрессии и оценки относительной экспрессии P13K по панели бигенных и тетрагенных репликонов (фиг. 3D). HER2: через 15-22 часа после трансформации клетки фиксировали и пермеабелизировали (eBioscience™ Foxp3/набор буферов для окрашивания факторов транскрипции, Invitrogen)

и окрашивали с использованием конъюгированных с AF488 мышинных моноклональных антител против HER2 (24D2, Biolegend). Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) AF488 использовалась в качестве показателя экспрессии HER2. MFI клеток, трансформированных синтетическим моногенным репликоном EEEV, экспрессирующим HER2, использовали для нормализации уровней экспрессии для оценки относительной экспрессии HER2 по панели бигенных и тетрагенных репликонов (фиг. 3E). HER3: через 15-22 часа после трансформации клетки фиксировали и пермеабелизировали (eBioscience™ Foxp3/набор буферов для окрашивания факторов транскрипции, Invitrogen) и окрашивали с использованием конъюгированных с APC мышинных моноклональных антител против HER3 (IB4C3, Biolegend). Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) APC использовалась в качестве показателя экспрессии HER3. MFI клеток, трансформированных синтетическим моногенным репликоном EEEV, экспрессирующим HER3, использовали для нормализации уровней экспрессии для оценки относительной экспрессии HER3 по панели бигенных и тетрагенных репликонов (фиг. 3F). Нормализованные данные об экспрессии ESR1, PI3K, HER2 и HER3 из тетрагенных репликонов визуализировали на диаграмме паука (фиг. 3G).

### Пример 3

Оценка *in vivo* векторов EEEV, кодирующих конструкции вакцинной srRNA

[0208] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vivo*, проведенных для оценки любых дифференциальных иммунных ответов после вакцинации синтетическими конструкциями репликона EEEV, описанными в настоящем документе (например векторами как в чистом виде, так и в составе LNP).

[0209] В этих экспериментах были получены и впоследствии оценены синтетические конструкции репликонов, полученные из штамма EEEV FL93-939.

[0210] Мыши и инъекции. Мышей BALB/c приобретали у Charles River Labs, Envigo или Jackson Laboratories. В день введения от 0,01 до 10 мкг материала вводили внутримышечно либо в одну, либо дробно в обе четырехглавые мышцы. Векторы вводили либо в чистом виде в физиологическом растворе, либо в составе LNP. За животными следили по массе тела и другим общим наблюдениям на протяжении всего исследования. Для исследований иммуногенности животным вводили дозу только в день 0 или в день 0 и день 21.

[0211] Препарат LNP. Репликонную РНК вводили в липидные наночастицы с использованием микрофлюидного смесителя и анализировали размер частиц, полидисперсность с использованием динамического светорассеяния и эффективность инкапсуляции. Липиды суспендировали в этаноле. Для С12-200 РНК суспендировали в 10 мМ цитратного буфера с pH 5,0 до концентрации 172 мкг/мл и смешивали при скорости потока 3:1 (вода:органика). Для L2 РНК суспендировали в 250 мМ NaOAc, pH 4,0, в концентрации 82 мкг/мл и перемешивали при скорости потока 3:1 (вода:органика).

[0212] ELISpot. Для измерения величины Т-клеточных ответов, специфичных для ESR1, HER2 и HER3, проводили анализ IFN $\gamma$  ELISpot с использованием набора Mouse

IFN $\gamma$  ELISpot PLUS (HRP) (MabTech) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, спленоциты выделяли и ресуспендировали до концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл в среде, содержащей пептиды, полученные из ESR1, HER2 и HER3, PMA/иономицин в качестве положительного контроля или ДМСО в качестве имитации стимуляции.

#### Оценка линкеров

[0213] На фиг. 2 показаны результаты анализа ELISpot для обнаружения мышинового IFN $\gamma$ , измеренные с помощью пятнообразующих единиц, соответствующих иммунореактивным Т-клеткам селезенки, через 14 дней после внутримышечной инъекции моногенной репликонной РНК, кодирующей мутации ESR1 с разной структурой и соединенных между собой разными линкерами. Линкеры AAY, EAAAK (SEQ ID NO: 1), RVRR (SEQ ID NO: 2), GGGGS (SEQ ID NO: 3) и GPGPG (SEQ ID NO: 4), которые тестировали с разной структурой в кассете антигена ESR1, содержащей мутации K303R, E380Q, Y537C, Y537S, Y537N и D538G. Столбцы для каждой кассеты соответствуют следующим условиям стимуляции одним пептидом в порядке K303R, E380Q, Y537N, Y537S, Y537C, D538G, ESR1 дикого типа и средах. На оси у показаны общие ответы Т-клеток (представленные как подсчитанные единицы образования пятен на миллион клеток). Структура линкера GGGGS (SEQ ID NO: 3) вызывала наиболее устойчивые Т-клеточные ответы.

#### Оценка количества и структуры генов

[0214] Результаты анализа ELISpot для обнаружения мышинового IFN $\gamma$ , измеренные с помощью пятнообразующих единиц, соответствующих иммунореактивным Т-клеткам селезенки, на день 35 после двух внутримышечных инъекций репликонной РНК, кодирующей ESR1, HER2 и HER3, показаны на фиг. 4. Были протестированы различные конструкции, в моногенной, бигенной или тетрагенной форме, имеющие различную структуру и соединяющие последовательности ESR1, P13K, HER2 и HER3, чтобы определить, какая конфигурация генов в конструкциях дает наиболее устойчивые ответы Т-клеток на стимуляцию. На оси Y показаны общие ответы Т-клеток. Ответы P13K не измеряли в этом эксперименте, поскольку он не формирует ответы у мышей BALB/c.

#### Оценка структуры генов и препарата липидов

[0215] На фиг. 6 показаны результаты анализа ELISpot для обнаружения мышинового IFN $\gamma$ , измеренного с помощью единиц образования пятен, соответствующих иммунореактивным Т-клеткам селезенки, на день 35 после двух внутримышечных инъекций репликонной РНК либо в физиологическом растворе, либо в составе двух разных композиций LNP L1 или L2, кодирующих ESR1, P13K, HER2, и HER3. Различные тетрагенные конструкции, имеющие разные скелеты векторов репликонов, были протестированы для определения того, какой вектор репликона РНК и препарат дают наиболее устойчивые ответы Т-клеток при стимуляции.

#### ПРИМЕР 4

Эффективности против рака молочной железы, положительного по рецептору эстрогена

[0216] Две модели эффективности показаны на фиг. 7, чтобы имитировать два клинических сценария. В терапевтической модели сначала имплантируется линия опухолевых клеток, экспрессирующая мутацию устойчивости, на которую нацелена вакцина. После этого проводят вакцинацию. Это моделирует сценарий лечения пациентов с ранее существовавшими мутациями. В профилактической модели вакцинацию проводят до имплантации линии опухолевых клеток, с закодированной мутацией устойчивости, включенной в вакцину. Этот сценарий имитирует лечение пациентов до появления приобретенных мутаций. Введение репликонной РНК, кодирующей мутации (мутаций), экспрессируемой линией опухолевых клеток, должно вызвать у мышей устойчивые Т-клеточные ответы, которые приведут к задержке роста опухоли. Если рост опухоли не задерживается, вполне вероятно, что линия опухолевых клеток эволюционировала и потеряла целевую мутацию, показывая, что репликонная РНК была способна оказывать селективное давление со стороны иммунной системы с потерей активирующей мутации.

#### Пример 5

Получение векторов на основе альфавирусов, кодирующих конструкции srRNA для биотерапевтического применения

[0217] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для конструирования базовых альфавирусных векторов (например без гетерологичного гена), которые впоследствии использовались для конструирования векторов, экспрессирующих представляющий интерес ген или гены (например субъединицу p35 IL-12 или ее функциональные варианты, субъединицу p40 IL-12 или ее функциональные варианты и IL-1RA или его функциональный вариант).

#### Базовый вектор EEEV

[0218] Базовый вектор EEEV (т.е. без представляющего интерес гетерологичного гена) конструировали следующим образом. Базовый вектор EEEV синтезировали de novo из четырех частей размером ~4 т.п.н. (Twist Bioscience) из эталонной последовательности (Genbank EF151502) с несколькими модификациями. Молчащие мутации G301A, A3550C, G4516A, G5725A, G7399A были включены для устранения сайтов разрезания рестриктазами. Уникальный сайт разрезания рестриктазой (SpeI, 5'-A'CTAG,T-3') был включен вместо кодирующей последовательности нативных структурных генов EEEV (где 5'А соответствует местоположению стартового кодона структурного полипротеина ATG, а 3'-Т соответствует местоположению стоп-кодона структурного полипротеина TAA).

5'-адаптерную последовательность (5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3'; SEQ ID NO: 5) встраивали перед сайтом SpeI, а 3'-адаптерную последовательность (5'-GACCGCTACGCCCAATGACCCGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 6) вводили после сайта SpeI для последующих процедур Gibson Assembly® (Gibson et al., Nat. Methods 6, 343-345, 2009). Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 7) был включен перед последовательностью генома EEEV, а после содержалась последовательность poly(A), за которой следовал сайт SapI, который делал

разрез перед последовательностью сайта узнавания. Сразу после сайта SapI находится терминаторная последовательность T7 (5'-AACCCCTCTCTAAAACGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 8), за которой следует уникальный сайт разрезания рестриктазой (NotI, 5'-GC'GGCC,GC-3'). Части были объединены в реакции Gibson Assembly®, состоящей из пяти частей : линейризованная основная цепь pYL и четыре синтезированных фрагмента, в результате чего получился базовый вектор EEEV.

#### Базовый вектор CHIKV

[0219] Базовый вектор CHIKV S27 был синтезирован de novo из четырех частей размером ~4 т.п.н. (Twist Bioscience, Thermo Fisher GeneArt) из эталонной последовательности (Genbank AF369024) с молчащей мутацией A5366G и с уникальным сайтом разрезания рестриктазой (SpeI, 5'-A'CTAG,T-3') вместо кодирующей последовательности структурных генов CHIKV (где 5'A соответствует местоположению стартового кодона ATG структурного полипротеина, а 3'T соответствует местоположению стоп-кодона TAA структурного полипротеина). 5'-адаптерную последовательность (5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3'; SEQ ID NO: 5) встраивали перед сайтом SpeI, а 3'-адаптерную последовательность (5'-GACCGCTACGCCCAATGACCCGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 6) встраивали после сайта SpeI для последующих процедур Gibson Assembly®. Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 7) встраивали перед последовательностью генома CHIKV, а после встраивали последовательность poly(A), за которой следовал сайт SapI, который делал разрез перед сайтом узнавания. Сразу после сайта SapI находится терминаторная последовательность T7 (5'-AACCCCTCTCTAAAACGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 8), за которой следует уникальный сайт разрезания рестриктазой (NotI, 5'-GC'GGCC,GC-3'). Части были объединены в реакции Gibson Assembly®, состоящей из пяти частей: линейризованная основная цепь pYL и четыре синтезированных фрагмента, в результате чего получился базовый вектор CHIKV S27.

[0220] Базовый вектор CHIKV DRDE конструировали аналогичным образом на основе эталонной последовательности (Genbank EF210157), за исключением того, что вместо 3'-UTR DRDE использовали 3'-UTR S27.

#### Базовые векторы SINV

[0221] Базовый вектор SINV Girdwood был синтезирован de novo из четырех частей размером ~4 т.п.н. (Twist Bioscience, Thermo Fisher GeneArt) из эталонной последовательности штамма Girdwood (Genbank MF459683) с уникальным сайтом разрезания рестриктазой (SpeI, 5'-A'CTAG,T-3') вместо кодирующей последовательности структурных генов SINV (где 5'A представляет собой следующий нуклеотид после последовательности P2A, следующий за нуклеотидом 93 гена структурного полипротеина, а 3'T соответствует местоположению стоп-кодона структурного полипротеина TGA). Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 7) встраивали перед последовательностью генома SINV, а после встраивали

последовательность poly(A), за которой следовал сайт SapI, который делал разрез перед сайтом узнавания. Сразу после сайта SapI находится терминаторная последовательность T7 (5'-AACCCCTCTCTAAAACGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 8), за которой следует уникальный сайт разрезания рестриктазой (NotI, 5'-GC'GGCC,GC-3'). Части были объединены в реакции Gibson Assembly®, состоящей из пяти частей (например линейаризованная основная цепь pYL и четыре синтезированных фрагмента), с получением базового вектора SINV Girdwood.

[0222] Базовый вектор SINV AR86 был аналогичным образом сконструирован на основе эталонной последовательности (Genbank U38305), за исключением того, что кодирующая последовательность nsP2 была получена из эталонной последовательности Girdwood.

#### Базовый вектор VEE

[0223] Базовый вектор VEE был синтезирован de novo из четырех частей размером ~4 т.п.н. (Twist Bioscience, Thermo Fisher GeneArt) из эталонной последовательности штамма TC-83 (Genbank L01443) с молчащей мутацией A2087G и уникальным сайтом разрезания рестриктазой (SpeI, 5'-A'CTAG,T-3') вместо кодирующей последовательности структурных генов VEE (где 5'A представляет собой следующий нуклеотид после последовательности P2A, следующий за нуклеотидом 93 гена структурного полипротеина, а 3' T соответствует местоположению стоп-кодона TGA структурного полипротеина). 5'-адаптерную последовательность (5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3'; SEQ ID NO: 5) встраивали перед сайтом SpeI, а 3'-адаптерную последовательность (5'-GACCGCTACGCCCCAATGACCCGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 6) встраивали после сайта SpeI для последующих процедур Gibson Assembly®. Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 7) встраивали перед последовательностью генома VEE, а после содержалась последовательность poly(A), за которой следовал сайт SapI, который делал разрез перед сайтом узнавания. Сразу после сайта SapI находится терминаторная последовательность T7 (5'-AACCCCTCTCTAAAACGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 8), за которой следует уникальный сайт разрезания рестриктазой (NotI, 5'-GC'GGCC,GC-3'). Части были объединены в реакции Gibson Assembly®, состоящей из пяти частей (например линейаризованная основная цепь pYL и четыре синтезированных фрагмента), с получением базового вектора VEE.

#### Итоговый вектор

[0224] Конструирование векторов, содержащих гетерологичные гены, осуществляли следующим образом: вектор с пустым основанием линейаризовали путем расщепления SpeI. Гены IL-12A, IL12-B, IL-1RN были оптимизированы/реорганизованы по кодонам для экспрессии у человека in silico и вместе с EMCV IRES были синтезированы de novo (IDT). Синтетические продукты амплифицировали с использованием праймеров, которые добавляли либо 5'- и 3'-адаптерные последовательности к концам генов, либо праймеров, которые добавляли

последовательности P2A и/или гомологичные последовательности к вставкам соседних генов. Продукт расщепления и продукты ПЦР объединяли с помощью процедуры Gibson Assembly® с получением итоговых векторов.

#### Пример 6

Оценка *in vitro* векторов EEEV, кодирующих биотерапевтические конструкции *srRNA*

[0225] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vitro*, проведенных для оценки уровней экспрессии синтетических конструкций *srRNA*, описанных в примере 5 выше, и для исследования любого их дифференциального поведения (например репликации и экспрессии белка).

[0226] Транскрипция *in vitro* : РНК получали путем транскрипции *in vitro* из линейаризованной SapI плазмидной матрицы с полимеразой бактериофага T7 либо с 5'-кэпом ARCA (набор mRNA HiScribe™ T7 ARCA, NEB), либо путем транскрипции без кэпа (набор для синтеза РНК HiScribe™ T7 High Yield, NEB) с последующим добавлением 5'-кэпа 1 (система кэпирования Vaccinia, mRNA Cap 2'-O-метилтрансфераза, NEB). Затем РНК очищали с помощью экстракции фенолом/хлороформом или путем очистки на колонке (набор Monarch® RNA Cleanup, NEB). Концентрацию РНК определяли по поглощению при 260 нм (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

[0227] Репликация: РНК трансформировали путем электропорации в клетки ВНК-21 или Vero (например 4D-Nucleofector™, Lonza). Через 15-22 часа после трансформации клетки фиксировали и пермеабелизировали (eBioscience™ Foxp3/набор буферов для окрашивания факторов транскрипции, Invitrogen) и окрашивали с использованием конъюгированных с PE мышинных моноклональных антител против dsRNA (J2, Scicons) для количественного определения частоты клеток dsRNA+ и средней интенсивности флуоресценции (MFI) dsRNA в отдельных клетках с помощью флуоресцентной проточной цитометрии.

[0228] Экспрессия белка с помощью ELISA:

[0229] Человеческие IL-12p70 и IL-1RA были обнаружены в электропорированных клетках ВНК-21 с 500 нг моногенных или мультигенных конструкций *srRNA*. Супернатанты собирали примерно через 24 и 48 часов после трансфекции и анализировали с использованием человеческого IL-12p70 от RnD Systems (кат. № DY1270) и человеческого IL-1ra/IL-1F3 DuoSet ELISA от RnD Systems (кат. № DY280).

[0230] Анализ биоактивности:

[0231] Человеческие IL-12p70 и IL-1RA были обнаружены в электропорированных клетках ВНК-21 с 500 нг моногенных или мультигенных конструкций *srRNA*. Супернатанты собирали примерно через 24 и 48 часов после трансфекции и анализировали с помощью биоанализа GloMax от Promega на IL-12 (кат. номер JA2601). IL-1RA анализировали с использованием репортерных клеток IL-1β HEK 293 (Invivogen, hkb-il1bv2), предварительно инкубированных с 4 нг/мл IL1β (конечная 1 нг/мл), и супернатантов трансфицированных клеток ВНК в соответствии с протоколом

производителя.

#### Оценка количества и структуры генов

[0232] Результаты анализа ELISA обнаружения мышинных IL-12 и IL-1RA, измеренные в трансфицированных клетках ВНК-21, показаны на фиг. 8А, 8В, 11А и 11В. Различные конструкции, как в моногенной, так и в мультигенной форме, имеющие различную структуру субъединицы р35 IL-12, субъединицы р40 IL-12 и IL-1RA, были протестированы, чтобы определить, какая конфигурация генов в конструкциях обеспечивает наиболее устойчивую экспрессию IL-12 и IL-1RA. По оси Y показана концентрация IL-12 или IL-1RA в нг/мл. На фиг. 10 показаны соответствующие концентрации IL-12 и IL-1RA, измеренные для каждой протестированной конструкции.

[0233] Биологическую активность выявления мышинового IL-12 и IL-1RA измеряли в супернатантах трансфицированных клеток ВНК-21 с различными конструкциями srRNA, протестированными на репортерных клетках, экспрессирующих различные рецепторы цитокинов. Результаты показаны на фиг. 9А, 9В, 12А и 12В. На фиг. 13 показаны соответствующая биоактивность IL-12 и IL-1RA, измеренная для каждой протестированной конструкции.

#### Пример 7

Оценка *in vivo* альфавирусных векторов, кодирующих биотерапевтические конструкции srRNA

[0234] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vivo*, проведенных для оценки описанных в настоящем документе конструкций srRNA (например векторов как в чистом виде, так и в составе LNP).

[0235] В этих экспериментах были получены и впоследствии оценены синтетические конструкции srRNA, полученные из различных штаммов альфавируса.

[0236] Мыши и инъекции. Мышей BALB/c приобрели у Charles River Labs, Envigo или Jackson Laboratories. В день введения от 0,01 до 40 мкг материала вводили внутримышечно либо в одну, либо дробно в обе четырехглавые мышцы. Векторы вводили либо в чистом виде в физиологическом растворе, либо в составе LNP. За животными следили по массе тела и другим общим наблюдениям на протяжении всего исследования. Для фармакокинетических исследований животным вводили дозу только в день 0.

[0237] Препарат LNP. Репликонную РНК вводили в липидные наночастицы с использованием микрофлюидного смесителя и анализировали на размер частиц, полидисперсность с использованием динамического светорассеяния и эффективность инкапсуляции. Липиды суспендировали в этаноле. Для L1 РНК суспендировали в 10 мМ цитратного буфера с рН 5,0 до концентрации 172 мкг/мл и перемешивали при скорости потока 3:1 (вода:органика). Для L2 РНК суспендировали в 250 мМ NaOAc, рН 4,0, в концентрации 82 мкг/мл и перемешивали при скорости потока 3:1 (вода:органика).

[0238] ELISA. Для измерения концентраций IL-12 и IL-1RA в сыворотке проводили анализ ELISA с использованием набора ELISA Human IL-12 p70 DuoSet ELISA (RnD Systems cat# DY1270) и набора ELISA Human IL-1ra (Abcam, ab211650) в соответствии с

протоколом производителя.

#### Оценка структуры генов и препарата липидов

[0239] Две лучшие мультигенные конфигурации, полученные в анализах *in vitro*, затем были протестированы в шести различных векторах *srRNA in vivo* на предмет экспрессии белка в сыворотке мыши. Результаты показаны на фиг. 14A и 14B. Было замечено, что IL-1RA не обнаруживался в некоторых случаях, возможно, из-за короткого периода полужизни белка.

[0240] Затем мультигенные конфигурации тестировали в различных препаратах и анализировали экспрессию белка *in vivo* с помощью ELISA. Результаты показаны на фиг. 15A и 15B.

#### Пример 8

Оценка *in vivo* модифицированных векторов *srRNA* с гетерологичными генами неструктурных белков

[0241] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vivo*, проведенных для оценки дифференциальной функциональности представляющей интерес полипептидной конструкции (PCI), экспрессируемой из множества конструкций экспрессии *srRNA*, составленных с помощью LNP, для вызова иммунного ответа и установления иммунной защиты после вакцинации.

[0242] В этих экспериментах были разработаны и впоследствии оценены синтетические конструкции *srRNA*, полученные из вируса венесуэльского лошадиного энцефалита (VEE.TC83), штаммов вируса Chikungunya S27 (CHIK.S27) и DRDE-06 (CHIK.DRDE), штаммов Girdwood вируса Sindbis (SIN.GW) и AR86-Girdwood гибрида 1 (SIN.AR86) и вируса восточного лошадиного энцефалита (EEE.FL93).

[0243] Мыши и инъекции. Самок мышей BALB/c приобретали у Charles River Labs или Jackson Laboratories. В день введения 0,15-1,5 мкг материала вводили внутримышечно в дробном виде в обе четырехглавые мышцы. Векторы были составлены с помощью LNP. За животными следили по массе тела и другим общим наблюдениям на протяжении всего исследования. Для исследований иммуногенности животным вводили дозу в день 0 и день 21. Селезенку собирали на день 14 и/или 35, а сыворотку выделяли на день 14 и/или 35.

[0244] Препарат LNP. *srRNA* получали в липидных наночастицах (LNP) с использованием микрофлюидного смесителя, и проанализирован размер частиц, полидисперсность с использованием динамического светорассеяния и эффективность инкапсуляции. LNP состоят из ионизируемых липидов, холестерина, PEG-2K и DOPE.

[0245] ELISpot. Для измерения величины антигенспецифических ответов Т-клеток проводили анализ ELISpot IFN $\gamma$  с использованием набора ELISpot PLUS для IFN $\gamma$  мыши (HRP) (MabTech) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, спленоциты выделяли и ресуспендировали до концентрации  $1-5 \times 10^6$  клеток/мл в среде, содержащей либо пулы пептидов, соответствующие гликопротеину G вируса бешенства, РМА/иономицин в качестве положительного контроля, либо DMSO в качестве имитации стимуляции.

[0246] Антитела. Реакции нейтрализующих антител на вирус бешенства измеряли с использованием быстрого теста на ингибирование флуоресцентного свечения. Вкратце, разведения сыворотки смешивали со стандартным количеством живого вируса бешенства и инкубировали. Если присутствуют нейтрализующие антирабические антитела, они нейтрализуют вирус. Затем добавляли культивированные клетки, и инкубировали сыворотку/вирус/клетки вместе. Непокрытый вирус бешенства (т.е. не нейтрализованный антителами) будет инфицировать клетки, и это можно визуализировать с помощью микроскопии. Расчет конечного титра производили по проценту инфицированных вирусом клеток, наблюдаемых на предметном стекле.

[0247] Иммуногенность *in vivo* множества srRNA, кодирующих вирусный антиген, гликопротеин G вируса бешенства, оценивали путем оценки антигенспецифических ответов Т-клеток селезенки с помощью ELISpot (фиг. 16A) и титров антирабических нейтрализующих антител из сывороток (фиг. 16B) после двух иммунизаций. Все группы, иммунизированные srRNA, демонстрировали устойчивые Т-клеточные ответы по сравнению с контролем с физиологическим раствором (фиг. 16A), но между вакцинами srRNA наблюдались дифференциальные ответы. Аналогичным образом, все группы, иммунизированные srRNA, демонстрировали титры защитных нейтрализующих антител с некоторыми различиями между вакцинами srRNA (фиг. 16B).

[0248] Хотя были раскрыты конкретные альтернативы настоящему изобретению, следует понимать, что возможны и предполагаются различные модификации и комбинации в пределах истинной сущности и объема прилагаемой формулы изобретения. Таким образом, нет намерения точного ограничения рефератом и раскрытием, представленными в настоящем документе.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ идентификации и/или характеристики конструкции самореплицирующейся РНК (srRNA), включающий:

а) предоставление множества конструкций экспрессии srRNA, каждая из которых содержит кодирующую последовательность представляющей интерес полипептидной конструкции (PCI), функционально встроенную в вектор srRNA альфавируса, причем по меньшей мере часть кодирующей последовательности структурных белков альфавируса заменена кодирующей последовательностью PCI;

б) анализ уровня и/или функциональности PCI, которые экспрессируются из множества конструкций экспрессии srRNA, для идентификации одного или более кандидатов PCI, имеющих определенное свойство;

в) включение конструкций экспрессии srRNA, способных экспрессировать кандидаты PCI, идентифицированные на этапе (б), по меньшей мере, с одним средством доставки для получения комбинаторной коллекции систем доставки; и

г) анализ систем доставки на предмет их способности оказывать по меньшей мере один фармакодинамический эффект у субъекта для идентификации конструкции экспрессии srRNA, способной оказывать нужный фармакодинамический эффект.

2. Способ по п. 1, в котором кодирующая последовательность PCI содержит последовательность, кодирующую один полипептид, или последовательности, кодирующие множество полипептидов.

3. Способ по п. 2, в котором последовательности, кодирующие множество полипептидов, функционально связаны друг с другом внутри одной открытой рамки считывания (т.е. в полицистронной ORF).

4. Способ по п. 2, в котором множество полипептидов функционально связаны друг с другом посредством одной или более соединительных последовательностей.

5. Способ по п. 4, в котором соединительная последовательность из множества соединительных последовательностей содержит аутопротеолитическую пептидную последовательность.

6. Способ по п. 5, в котором аутопротеолитическая пептидная последовательность содержит одну или несколько последовательностей аутопротеолитического расщепления, полученных из кальцийзависимой сериновой эндопротеазы (фурина), свиного тековируса-1 2A (P2A), вируса ящура (FMDV) 2A (F2A), вируса ринита лошадей А (ERAV) 2A (E2A), вируса *Thea asigna* 2A (T2A), вируса цитоплазматического полиэдроза 2A (BmCPV2A), вируса Flacherie 2A (BmIFV2A) или их комбинации.

7. Способ по любому из пп. 4-6, в котором последовательности, кодирующие множество полипептидов, функционально связаны друг с другом посредством одного или более внутренних сайтов связывания рибосомы (IRES).

8. Способ по п. 7, в котором один или несколько IRES выбирают из вирусного IRES, клеточного IRES и искусственного IRES.

9. Способ по любому из пп. 7-8, в котором один или несколько IRES выбирают из

IRES вируса герпеса, ассоциированного с герпесвирусом саркомы Капоши (KSHV), IRES вируса гепатита, IRES Pestivirus, IRES Crivavirus, IRES вируса *Rhopalosiphum padi*, IRES фактора роста фибробластов, IRES фактора роста тромбоцитов, IRES фактора роста эндотелия сосудов, IRES инсулиноподобного фактора роста, IRES picornavirus, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), IRES Pim-1, IRES p53, IRES Apaf-1, IRES TDP2, IRES L-мус и IRES с-мус.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором PCI содержит один или несколько полипептидов, выбранных из микробных белков, белков вирусов, белков бактерий, белков грибов, белков млекопитающих и комбинаций любых из них.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором PCI содержит один или несколько полипептидов, выбранных из молекул антигена, биотерапевтических молекул или комбинаций любых из них.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором PCI содержит один или несколько антигенных полипептидов, выбранных из опухолеассоциированных антигенов, опухолеспецифических антигенов, неоантигенов и комбинаций любых из них.

13. Способ по п. 12, в котором один или несколько антигенных полипептидов содержат рецепторы эстрогена, ферменты-преобразователи внутриклеточных сигналов и эпидермальные рецепторы роста человека.

14. Способ по любому из пп. 10-13, в котором один или несколько антигенных полипептидов выбирают из ESR1, PI3K, HER2, HER3, вариантов любого из них и комбинаций любых из них.

15. Способ по любому из пп. 1-11, в котором PCI содержит один или несколько биотерапевтических полипептидов, выбранных из иммуномодуляторов, модуляторов ангиогенеза, модуляторов внеклеточного матрикса, модуляторов метаболизма, неврологических модуляторов и комбинаций любых из них.

16. Способ по п. 15, в котором PCI содержит один или несколько цитокинов, выбранных из хемокинов, интерферонов, интерлейкинов, лимфокинов и факторов некроза опухоли.

17. Способ по п. 16, в котором PCI содержит один или несколько интерлейкинов, выбранных из IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, IL-35, IFN $\gamma$  и любых их субъединиц.

18. Способ по любому из пп. 10-17, в котором один или несколько биотерапевтических полипептидов выбирают из IL-12A, IL-12B, IL-1RA и комбинаций любых из них.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором этап (а) включает предоставление множества конструкций экспрессии srRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI.

20. Способ по п. 19, в котором предоставление в (а) включает:

i) получение вектора экспрессии srRNA альфавируса, в котором по меньшей мере часть кодирующей последовательности структурных белков альфавируса заменена

кодирующей последовательностью интересующей полипептидной конструкции (PCI); и

ii) получение множества экспрессирующих sgRNA конструкций, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI.

21. Способ по п. 19, в котором предоставление в (а) включает:

i) получение кодирующих последовательностей для множества вариантов интересующей полипептидной конструкции (PCI); и

ii) получение множества конструкций экспрессии sgRNA, каждая из которых содержит последовательность, кодирующую вариант PCI из множества вариантов PCI из (а), функционально встроенных в вектор sgRNA альфавируса, причем по меньшей мере часть кодирующей последовательности для структурных белков альфавируса была заменена последовательностью, кодирующей вариант PCI.

22. Способ по любому из пп. 20-21, в котором вариант PCI из множества вариантов PCI содержит одно или несколько молекулярных изменений.

23. Способ по п. 22, в котором одно или несколько молекулярных изменений в варианте PCI выбрано из группы, состоящей из делеций, замен, вставок, дупликаций, мутаций, вариантов сдвига рамки считывания, вариантов сплайсинга и комбинаций любых из них.

24. Способ по любому из пп. 22-23, в котором одно или несколько молекулярных изменений образуют множество кассет изменений, расположенных тандемно по длине антигенной последовательности.

25. Способ по п. 24, в котором кассета изменений из множества кассет изменений содержит одно, два, три, четыре, пять или более молекулярных изменений.

26. Способ по любому из пп. 24-25, в котором множество кассет изменений функционально связаны друг с другом посредством одного или более линкеров.

27. Способ по п. 26, в котором линкер из одного или более линкеров представляет собой синтетический соединительный линкер или пептидный линкер.

28. Способ по п. 27, в котором пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AAY, EAAAK (SEQ ID NO: 1), RVRR (SEQ ID NO: 2), GGGGS (SEQ ID NO: 3) и GPGPG (SEQ ID NO: 4).

29. Способ по любому из пп. 1-28, в котором анализ уровня и/или функциональности PCI на этапе (b) проводят *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

30. Способ по п. 29, в котором анализ уровня и/или функциональности PCI представляет собой анализ иммуноблоттинга, анализ флуоресцентной проточной цитометрии, иммуноферментный анализ, анализ иммуногенности, анализ биоактивности и/или эффективности на модели заболевания.

31. Способ по любому из пп. 1-29, в котором анализ систем доставки на предмет их способности оказывать по меньшей мере один фармакодинамический эффект на этапе (d) проводят *in vivo* или *ex vivo*.

32. Способ по любому из пп. 1-31, в котором по меньшей мере один фармакодинамический эффект включает в себя один или несколько из следующих:

эффект иммуногенности, ответ биомаркера, терапевтический эффект, профилактический эффект, нужный эффект, нежелательный эффект, неблагоприятный эффект и эффект в модели заболевания.

33. Способ по п. 32 в котором по меньшей мере один фармакодинамический эффект предусматривает вызов иммунного ответа.

34. Способ по любому из пп. 1-33, в котором системы доставки представляют собой физиологический буфер, липосому, наночастицу на основе липидов (LNP), полимерную наночастицу, частицу вирусного репликона (VRP), микросферу, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), конъюгат биоактивного лиганда или их комбинацию.

35. Способ по п. 34, в котором система доставки LNP содержит катионный липид, ионизируемый катионный липид, анионный липид или нейтральный липид.

36. Способ по п. 34, в котором система доставки LNP содержит ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, состоящей из ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102 и их комбинации.

37. Способ по п. 34, в котором LNP содержит катионный липид, выбранный из группы, состоящей из 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1, 7C1 и любой их комбинации.

38. Способ по п. 34, в котором LNP содержит нейтральный липид, выбранный из группы, состоящей из DPSC, DPPC, POPC, DOPE, SM и любой их комбинации.

39. Способ по п. 34, в котором LNP содержит липид, выбранный из группы, состоящей из C12-200, C14-PEG2000, DOPE, DMG-PEG2000, DSPC, DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерина, DOTAP-холестерина, GAP-DMORIE-DPUPe и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоля (PEG).

40. Способ по любому из пп.34 до 39, в котором массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 100:1 до примерно 3:1, от примерно 70:1 до 10:1 или от 16:1 до 4:1.

41. Способ по п. 40, в котором массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 16:1 до 4:1.

42. Способ по любому из пп. 40-41, в котором массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 20:1.

43. Способ по любому из пп. 40-41, в котором массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 8:1.

44. Способ по любому из пп. 34-43, в котором наночастицы на основе липидов (LNP) имеют средний диаметр менее примерно 1000 нм, примерно 500 нм, примерно 250 нм, примерно 200 нм, примерно 150 нм, примерно 100 нм., примерно 75 нм, примерно 50 нм или примерно 25 нм.

45. Способ по п. 44, в котором LNP имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 70 нм до 100 нм.

46. Способ по п. 45, в котором LNP имеют средний диаметр в диапазоне от

примерно 88 нм до примерно 92 нм, от примерно 82 нм до примерно 86 нм или от примерно 80 нм до примерно 95 нм.

47. Способ по любому из пп. 1-46, в котором рекомбинантная srRNA альфавируса представляет собой вирус, принадлежащий к роду *Alphavirus* семейства *Togaviridae*.

48. Способ по п. 47, в котором рекомбинантная srRNA альфавируса представляет собой альфавирус, принадлежащий группе VEEV/EEEV, или группе SFV, или группе SINV.

49. Способ по п. 48, в котором альфавирус представляет собой вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV), вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV), вирус Everglades (EVEV), вирус Mucambo (MUCV), вирус Pixuna (PIXV), вирус Middleburg (MIDV), вирус Chikungunya (CHIKV), вирус O'Nyong-Nyong (ONNV), вирус Ross River (RRV), вирус Barmah Forest (BF), вирус Getah (GET), вирус Sagiyama (SAGV), вирус Bebaru (BEBV), вирус Mayaro (MAYV), вирус Una (UNAV), вирус Sindbis (SINV), вирус Aura (AURAV), вирус Whataroa (WHAIV), вирус Babanki (BABV), вирус Kuzylagach (KYZV), вирус западного лошадиного энцефалита (WEEV), вирус Highland J (HJV), вирус Fort Morgana (FMV), вирус Ndumu (NDUV), вирус Madariaga (MADV) или вирус Buggy Creek.

50. Способ по п. 49, в котором альфавирус представляет собой вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV), вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV), вирус Chikungunya (CHIKV) или вирус Sindbis (SINV).

51. Способ по любому из пп. 1-50, в котором вектор экспрессии srRNA идентифицирован как обладающий иммуноиндуцирующей функцией, подходящей для профилактического применения и/или терапевтического применения.

52. Конструкция самореплицирующейся РНК (srRNA), идентифицированная в соответствии со способом по пп. 1-51.

53. Нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию srRNA по п. 52.

54. Рекомбинантная клетка, содержащая:

а) конструкцию самореплицирующейся РНК по п.52; и/или

б) нуклеиновую кислоту по п.53.

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

56. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 54-55, причем рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного.

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

58. Рекомбинантная клетка по п. 56, причем клетка животного представляет собой клетку млекопитающего.

59. Рекомбинантная клетка по п. 56, причем клетка животного представляет собой клетку насекомого.

60. Рекомбинантная клетка по п. 59, причем клетка насекомого представляет собой

клетку комара.

61. Рекомбинантная клетка по п. 56, причем клетка животного представляет собой иммунную клетку.

62. Рекомбинантная клетка по п. 61, причем иммунная клетка представляет собой В-клетку, моноцит, естественную клетку-киллер (NK), естественную Т-клетку киллер (NKT), базофил, эозинофил, нейтрофил, дендритную клетку (DC), макрофаг, регуляторную Т-клетку, хелперную Т-клетку (TH), цитотоксическую Т-клетку (TCTL), Т-клетку памяти, гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клетку, гемопоэтическую стволовую клетку или предшественник гемопоэтических стволовых клеток.

63. Рекомбинантная клетка по п. 62, причем иммунная клетка представляет собой В-клетку, Т-клетку или дендритную клетку (DC).

64. Культура клеток, содержащая по меньшей мере одну рекомбинантную клетку по любому из пп. 54-63, и среду для культуры клеток.

65. Композиция, содержащая терапевтически приемлемый наполнитель и:

- а) конструкцию самореплицирующейся РНК по п.52;
- б) нуклеиновую кислоту по п.53; и/или
- в) рекомбинантную клетку по любому из пп.54-63.

66. Композиция по п. 65, причем композиция составлена в виде вакцины.

67. Композиция по п. 66, причем вакцина представляет собой терапевтическую вакцину.

68. Композиция по любому из пп. 65-67, причем композиция составлена как иммуногенная композиция.

69. Композиция по любому из пп. 65-66, причем композиция составлена как биотерапевтическое средство.

70. Композиция по любому из пп. 65-69, причем композиция составлена со средством доставки в систему доставки.

71. Композиция по п. 70, причем система доставки содержит физиологический буфер, липосому, наночастицу на основе липидов (LNP), полимерную наночастицу, частицу вирусного репликона (VRP), микросферу, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), конъюгат биоактивного лиганда или их комбинацию.

72. Композиция по п. 71, причем система доставки LNP содержит катионный липид, ионизируемый катионный липид, анионный липид или нейтральный липид.

73. Композиция по п. 71, причем LNP содержит ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, состоящей из ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102 и их комбинации.

74. Композиция по п. 71, причем LNP содержит катионный липид, выбранный из группы, состоящей из 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1, 7C1 и любой их комбинации.

75. Композиция по п. 71, причем LNP содержит нейтральный липид, выбранный из группы, состоящей из DPSC, DPPC, POPC, DOPE, SM и любой их комбинации.

76. Композиция по п. 71, причем LNP содержит липид, выбранный из группы, состоящей из C12-200, C14-PEG2000, DOPE, DMG-PEG2000, DSPC, DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерина, DOTAP-холестерина, GAP-DMORIE-DPUPe, GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоля (PEG) и любой их комбинации.

77. Композиция по любому из пп. 71-76, причем массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 100:1 до примерно 3:1, от примерно 70:1 до 10:1 или от 16:1 до 4:1.

78. Композиция по п. 77, причем массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет от примерно 16:1 до 4:1.

79. Композиция по п. 78, причем массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 20:1.

80. Композиция по п. 78, причем массовое соотношение липида и нуклеиновой кислоты в системе доставки LNP составляет примерно 8:1.

81. Композиция по любому из пп. 71-80, причем наночастицы на основе липидов (LNP) имеют средний диаметр менее примерно 1000 нм, примерно 500 нм, примерно 250 нм, примерно 200 нм, примерно 150 нм, примерно 100 нм., примерно 75 нм, примерно 50 нм или примерно 25 нм.

82. Композиция по п. 81, причем LNP имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 70 нм до 100 нм.

83. Композиция по п. 82, причем LNP имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 88 нм до примерно 92 нм, от примерно 82 нм до примерно 86 нм или от примерно 80 нм до примерно 95 нм.

84. Способ вызова фармакодинамического эффекта у субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей;

- a) конструкцию самореплицирующейся РНК по п.52;
- b) нуклеиновую кислоту по п.53;
- c) рекомбинантную клетку по любому из пп.54-63; и/или
- d) фармацевтическую композицию по любому из пп.65-83.

85. Способ по п. 84, в котором фармакодинамический эффект предусматривает вызов иммунного ответа у субъекта.

86. Способ предотвращения или лечения заболевания у субъекта, при этом способ предусматривает профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, содержащей;

- a) конструкцию самореплицирующейся РНК по п.52;
- b) нуклеиновую кислоту по п.53;
- c) рекомбинантную клетку по любому из пп.54-63; и/или
- d) фармацевтическую композицию по любому из пп.65-83.

87. Способ по п. 86, в котором введенная композиция вызывает иммунный ответ у субъекта.

88. Способ по любому из пп. 84-87, в котором введенная композиция вызывает

выработку одной или более провоспалительных молекул у субъекта.

89. Способ по п. 88, в котором одна или несколько провоспалительных молекул содержат гамма-интерферон (IFN $\gamma$ ), цитокины, TNF- $\alpha$ , GM-CSF и MIP1 $\alpha$ , гранзим В, гранзим А, перфорин или комбинацию любых из них.

90. Способ по любому из пп. 84-89, в котором субъект ранее лечился одним или несколькими видами терапии, и у него развилась по меньшей мере частичная резистентность к указанному одному или нескольким видам лечения.

91. Способ по п. 90, в котором по меньшей мере один из одного или более способов лечения предусматривает малую молекулу.

92. Способ по любому из пп. 84-91, в котором заболевание представляет собой пролиферативное заболевание, воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или микробную инфекцию.

93. Способ по любому из пп. 84-92, в котором у субъекта имеется или подозревается наличие заболевания, связанного с пролиферативным расстройством, воспалительным заболеванием, аутоиммунным заболеванием или микробной инфекцией.

94. Способ по любому из пп. 92-93, в котором пролиферативное заболевание представляет собой рак.

95. Способ по п. 94, в котором рак представляет собой рак молочной железы.

96. Способ по любому из пп. 84-95, в котором композицию вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в сочетании по меньшей мере с одним дополнительным способом терапии.

97. Способ по п. 96, в котором по меньшей мере один дополнительный способ лечения выбирают из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсинотерапии, таргетной терапии и хирургического вмешательства.

98. Набор для вызова фармакодинамического эффекта, вызова иммунного ответа и/или для профилактики и/или лечения заболевания, причем набор содержит одно или несколько из следующего:

a) конструкцию самоамплифицирующейся РНК по п.52;

b) нуклеиновую кислоту по п.53;

c) рекомбинантную клетку по любому из пп. 54-63; и

d) фармацевтическую композицию по любому из пп.65-83.

ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ МНОЖЕСТВА КОНСТРУКЦИЙ ЭКСПРЕССИИ SRRNA, КАЖДАЯ ИЗ КОТОРЫХ СОДЕРЖИТ КОДИРУЮЩУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ИНТЕРЕСУЮЩЕЙ ПОЛИПЕПТИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ (РС), ФУНКЦИОНАЛЬНО ВСТРОЕННУЮ В АЛЬФАВИРУСНЫЙ ВЕКТОР SRRNA, ПРИЧЕМ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ЧАСТЬ КОДИРУЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ АЛЬФАВИРУСНЫХ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ЗАМЕНЕНА КОДИРУЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ РС



АНАЛИЗ УРОВНЯ ИЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ РС, КОТОРЫЕ ЭКСПРЕССИРУЮТ ВО МНОЖЕСТВЕ КОНСТРУКЦИЙ ЭКСПРЕССИИ SRRNA, ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОДНОГО ИЛИ БОЛЕЕ КАНДИДАТОВ РС, ИМЕЮЩИХ ОПРЕДЕЛЕННОЕ СВОЙСТВО

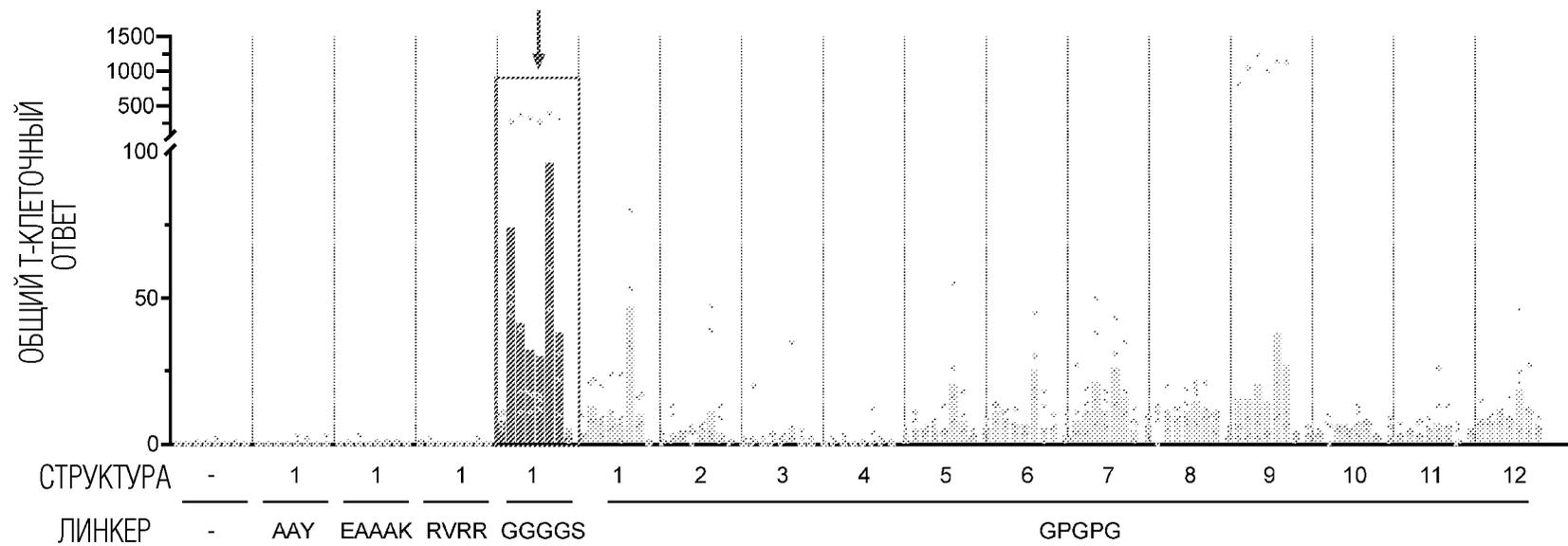


ОБЪЕДИНЕНИЕ КОНСТРУКЦИЙ ЭКСПРЕССИИ SRRNA, СПОСОБНЫХ ЭКСПРЕССИРОВАТЬ КАНДИДАТЫ РС, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ НА ЭТАПЕ (В), ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ, С ОДНИМ СРЕДСТВОМ ДОСТАВКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМБИНАТОРНОЙ КОЛЛЕКЦИИ СИСТЕМ ДОСТАВКИ



АНАЛИЗ СИСТЕМ ДОСТАВКИ НА ПРЕДМЕТ ИХ СПОСОБНОСТИ ОКАЗЫВАТЬ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДИН ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ У СУБЪЕКТА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОНСТРУКЦИИ ЭКСПРЕССИИ SRRNA, СПОСОБНОЙ ОКАЗЫВАТЬ НУЖНЫЙ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ

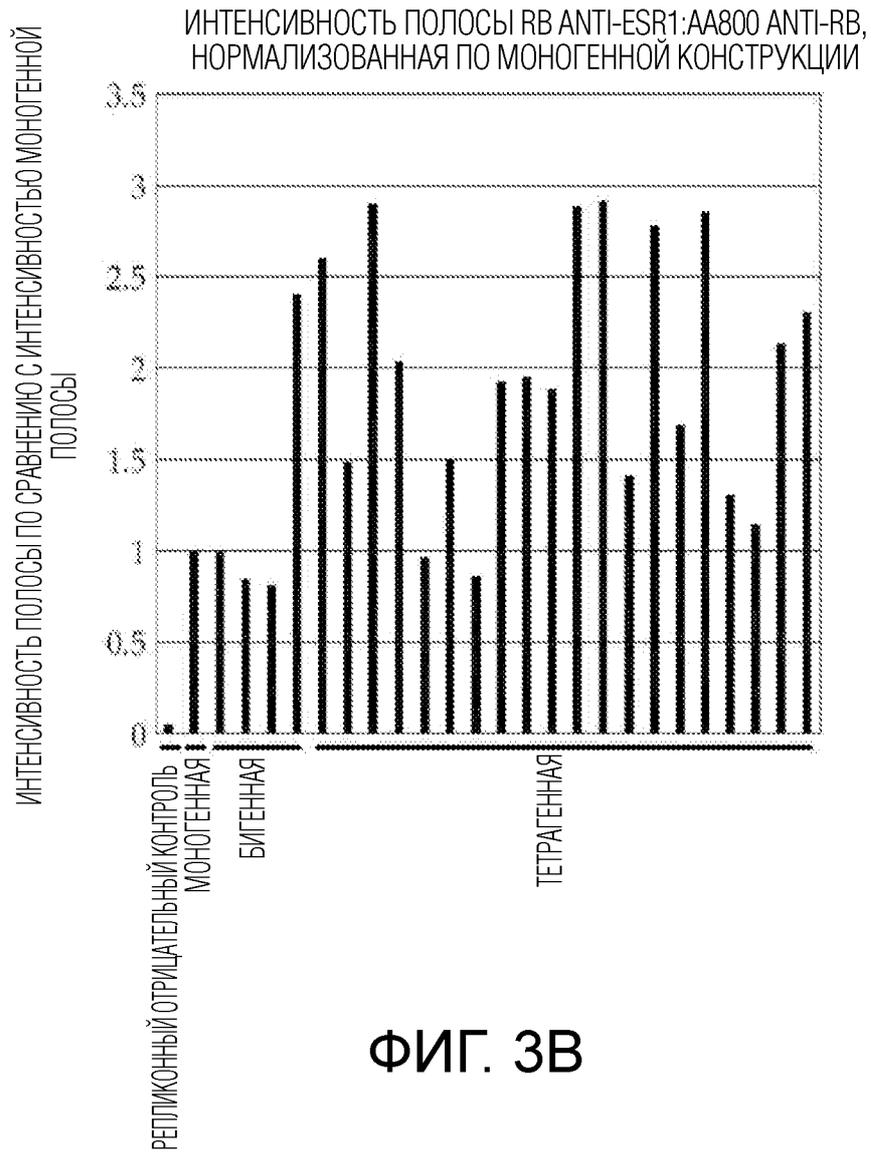
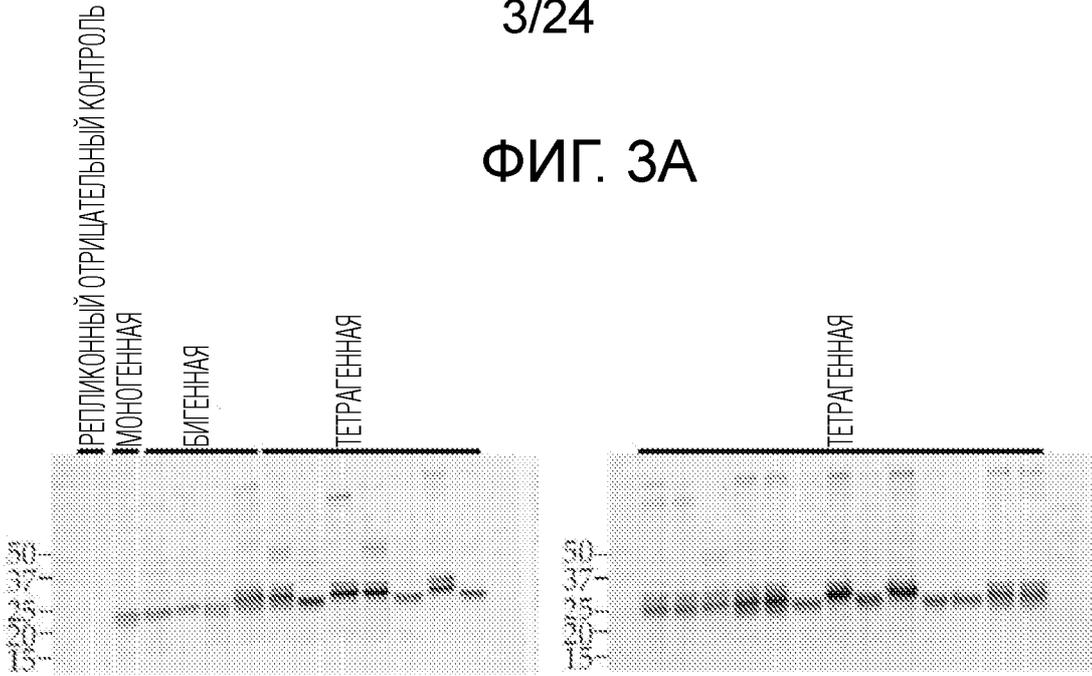
ФИГ. 1



порядок стимулирования: K303R, E380Q, Y537N, Y537S, Y537C, D538G, WT, среда

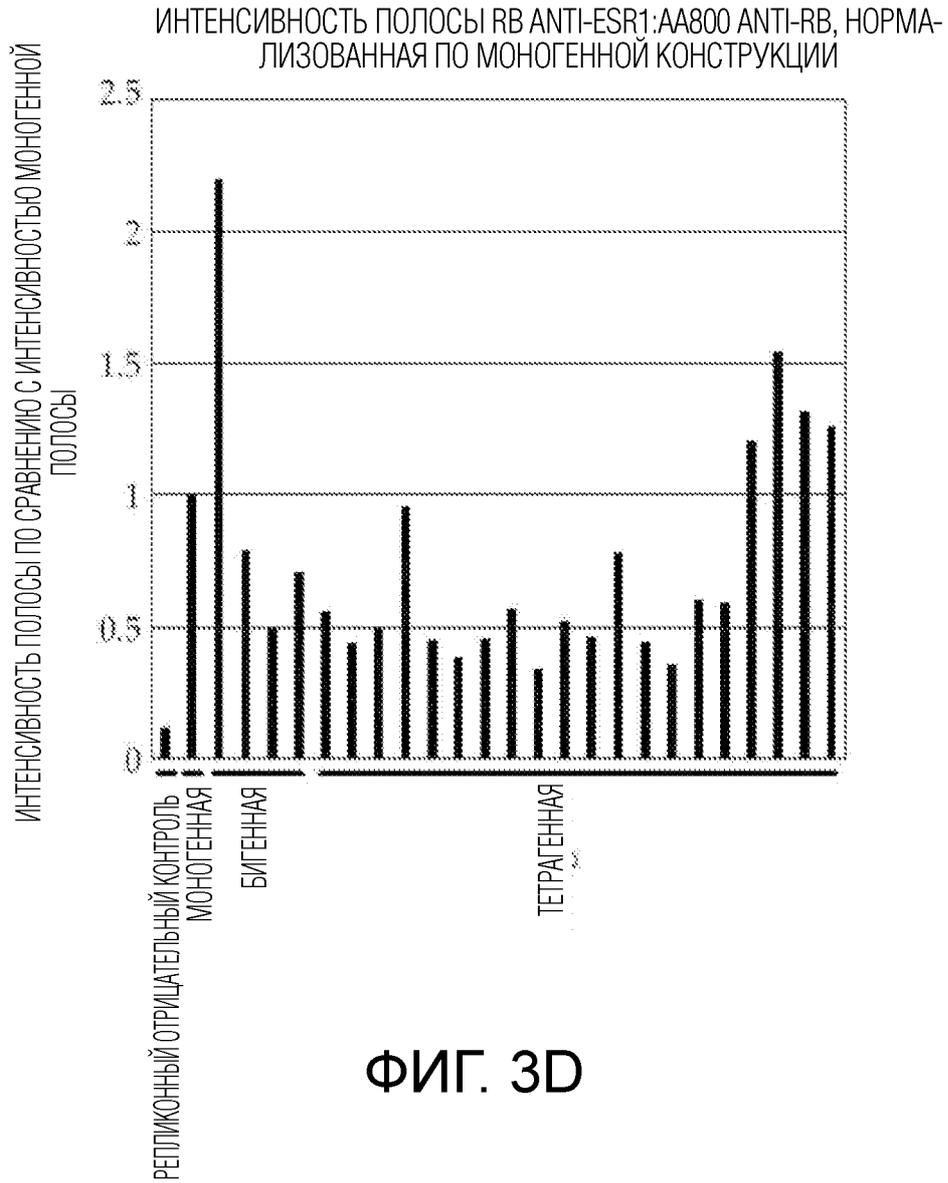
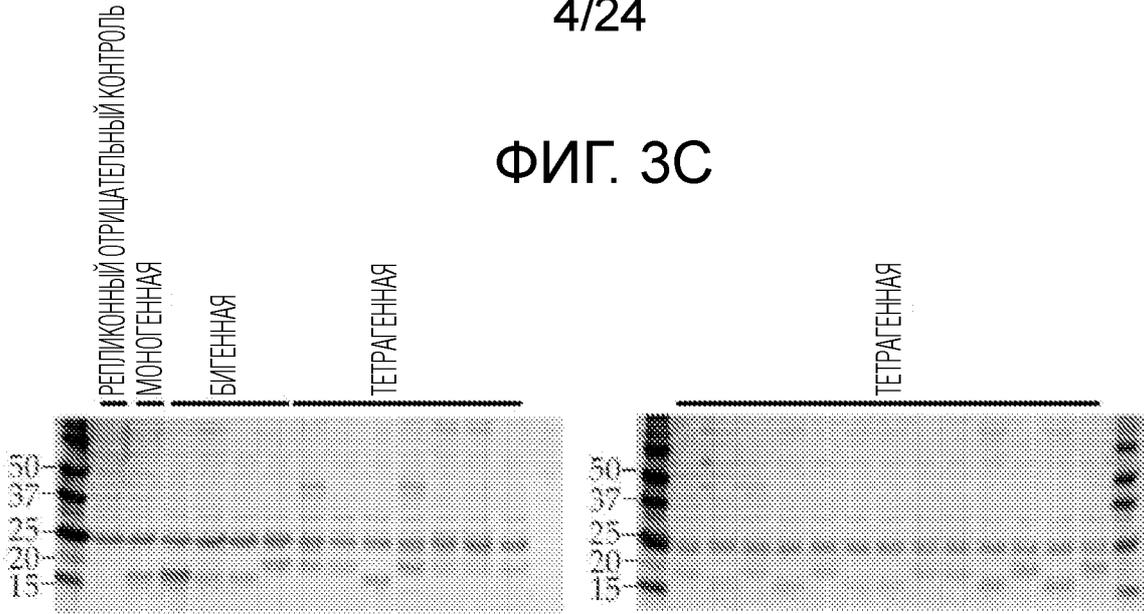
ФИГ. 2

ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

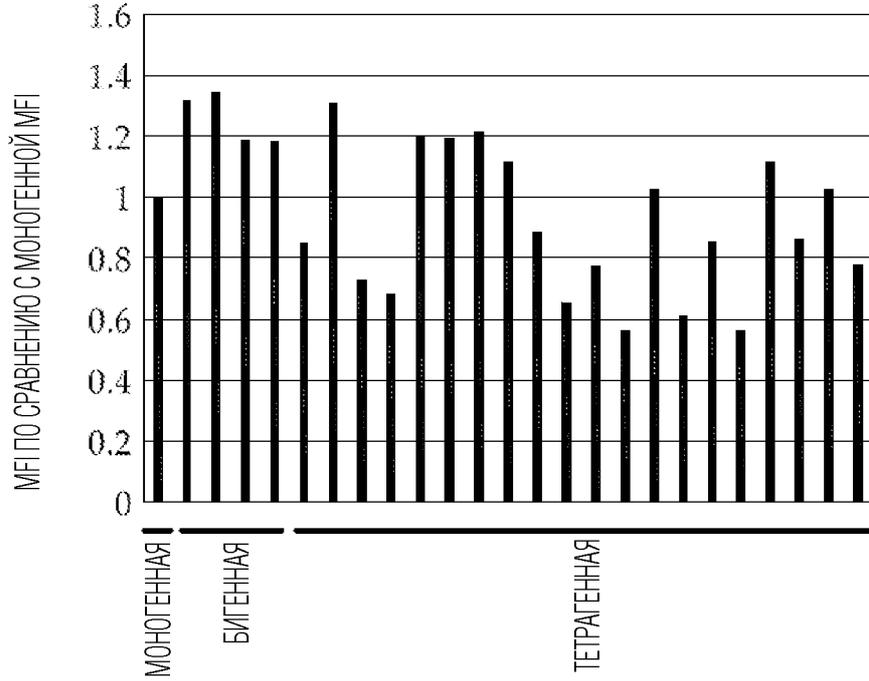
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D

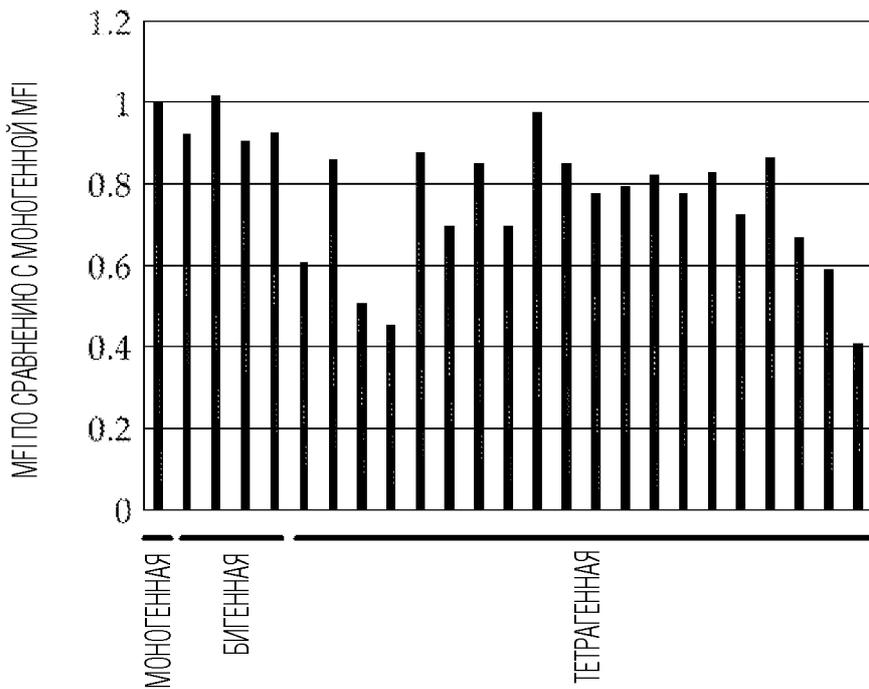
5/24

MFI ANTI-HER2-AF488, НОРМАЛИЗОВАННАЯ ПО МОНОГЕННОЙ КОНСТРУКЦИИ

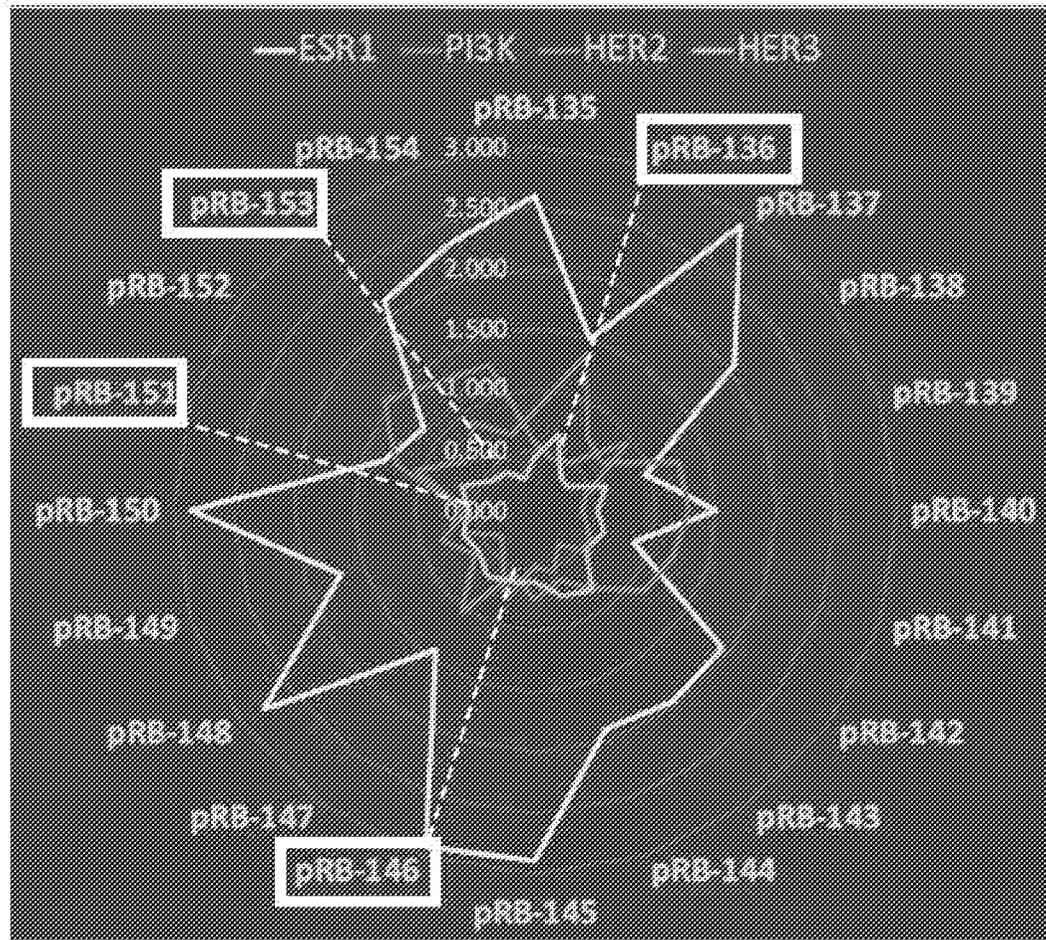


ФИГ. 3Е

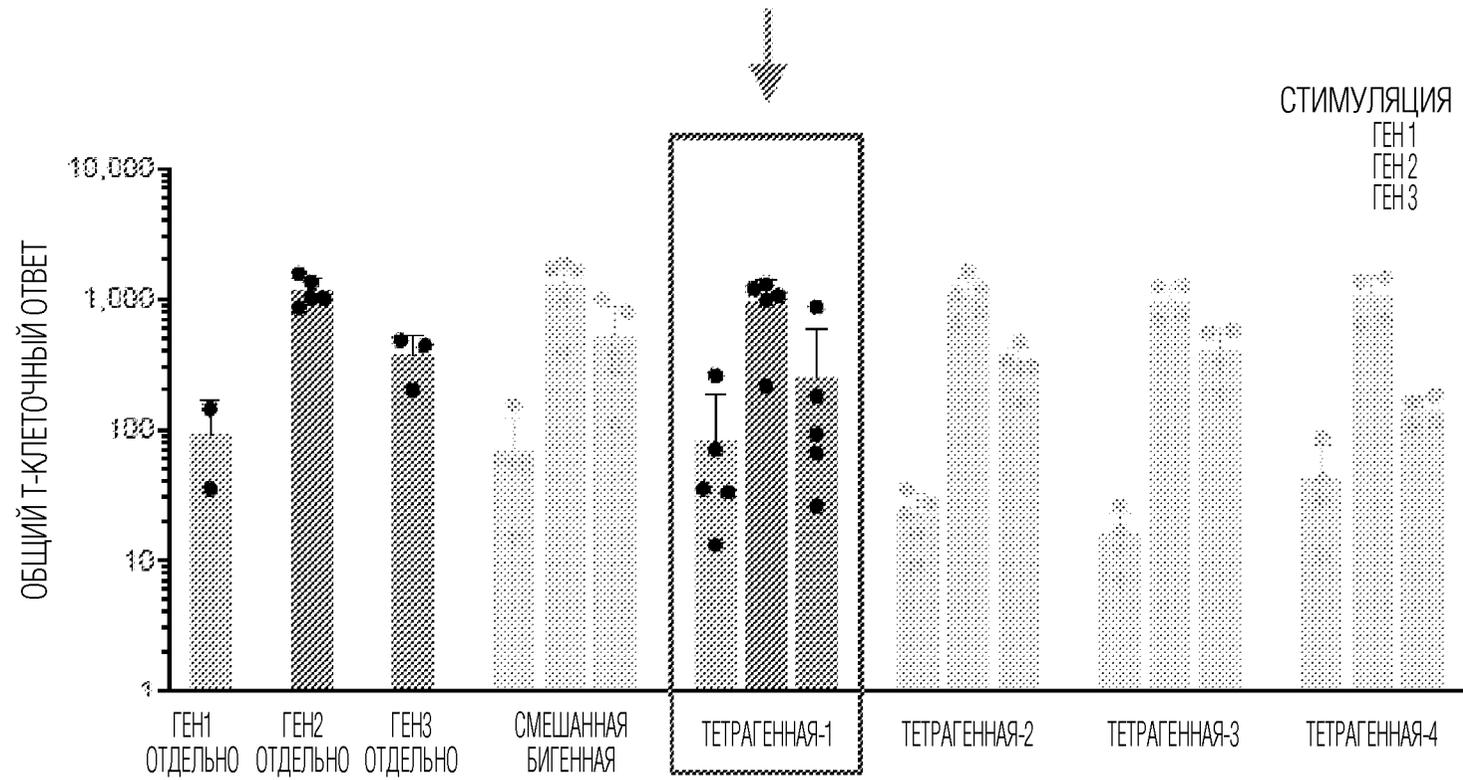
MFI ANTI-HER2-AF488, НОРМАЛИЗОВАННАЯ ПО МОНОГЕННОЙ КОНСТРУКЦИИ



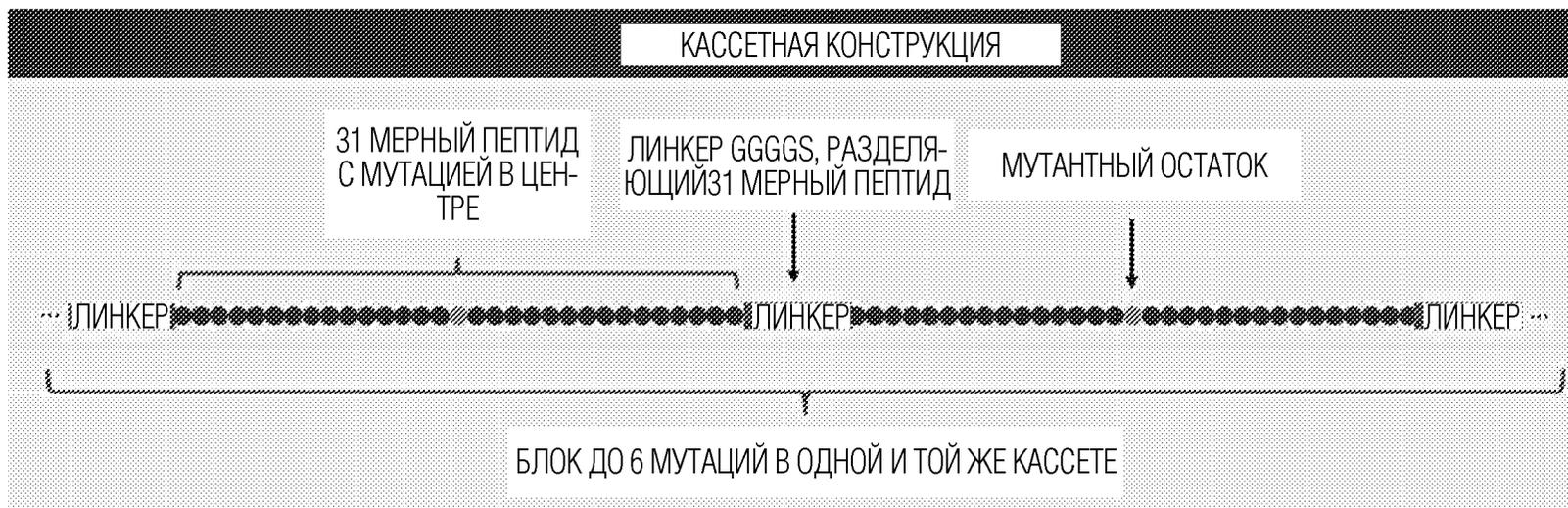
ФИГ. 3Ф



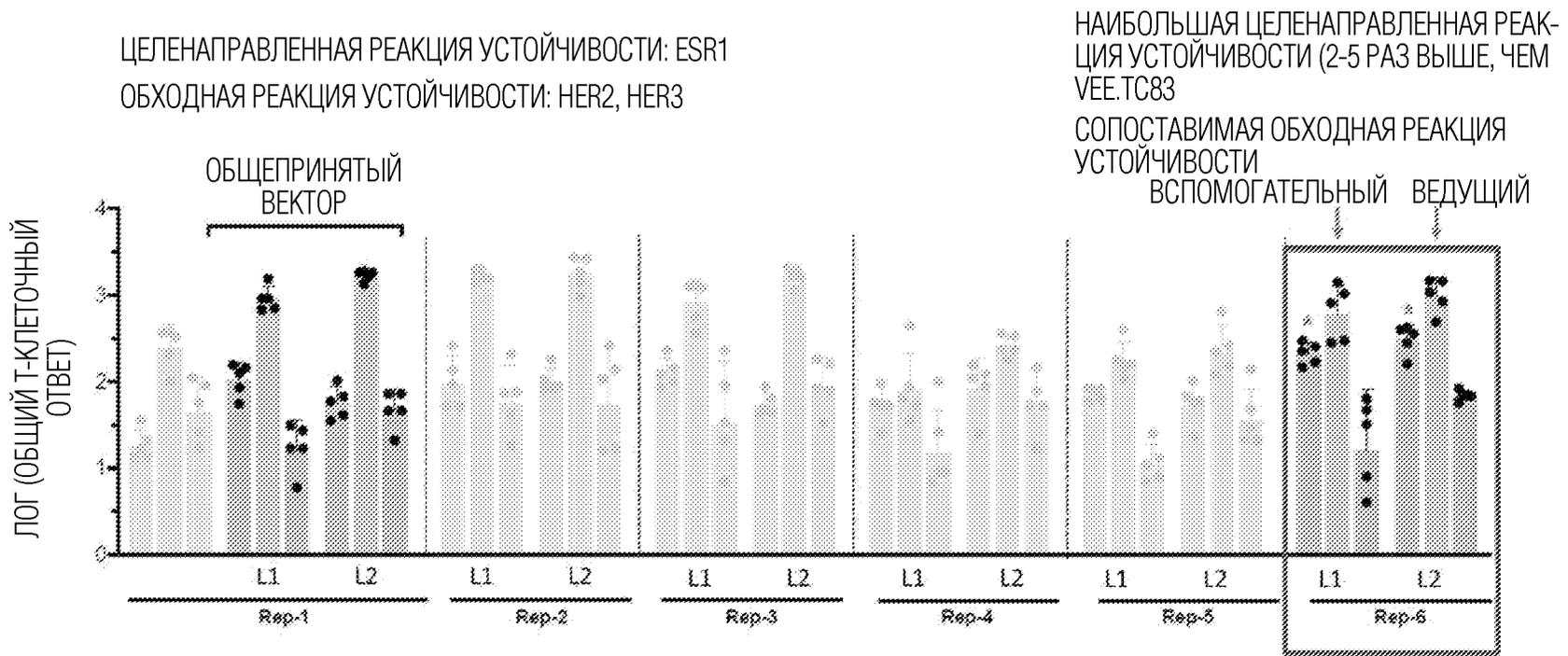
ФИГ. 3G



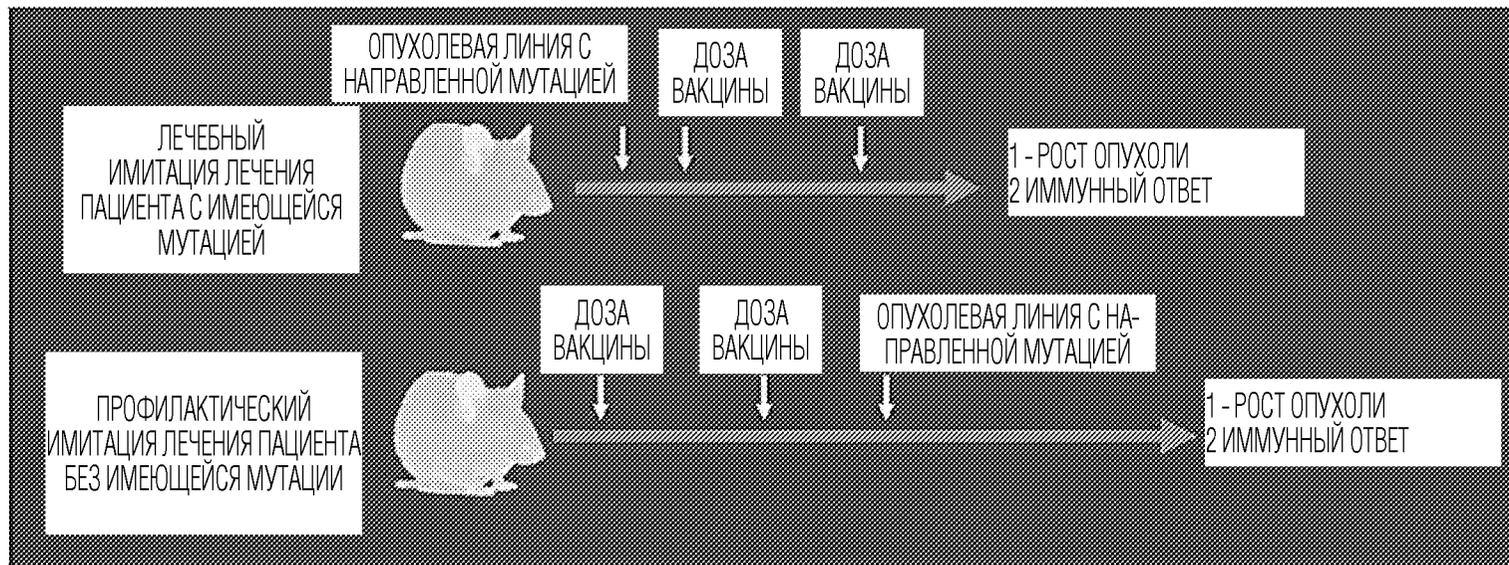
ФИГ. 4



ФИГ. 5

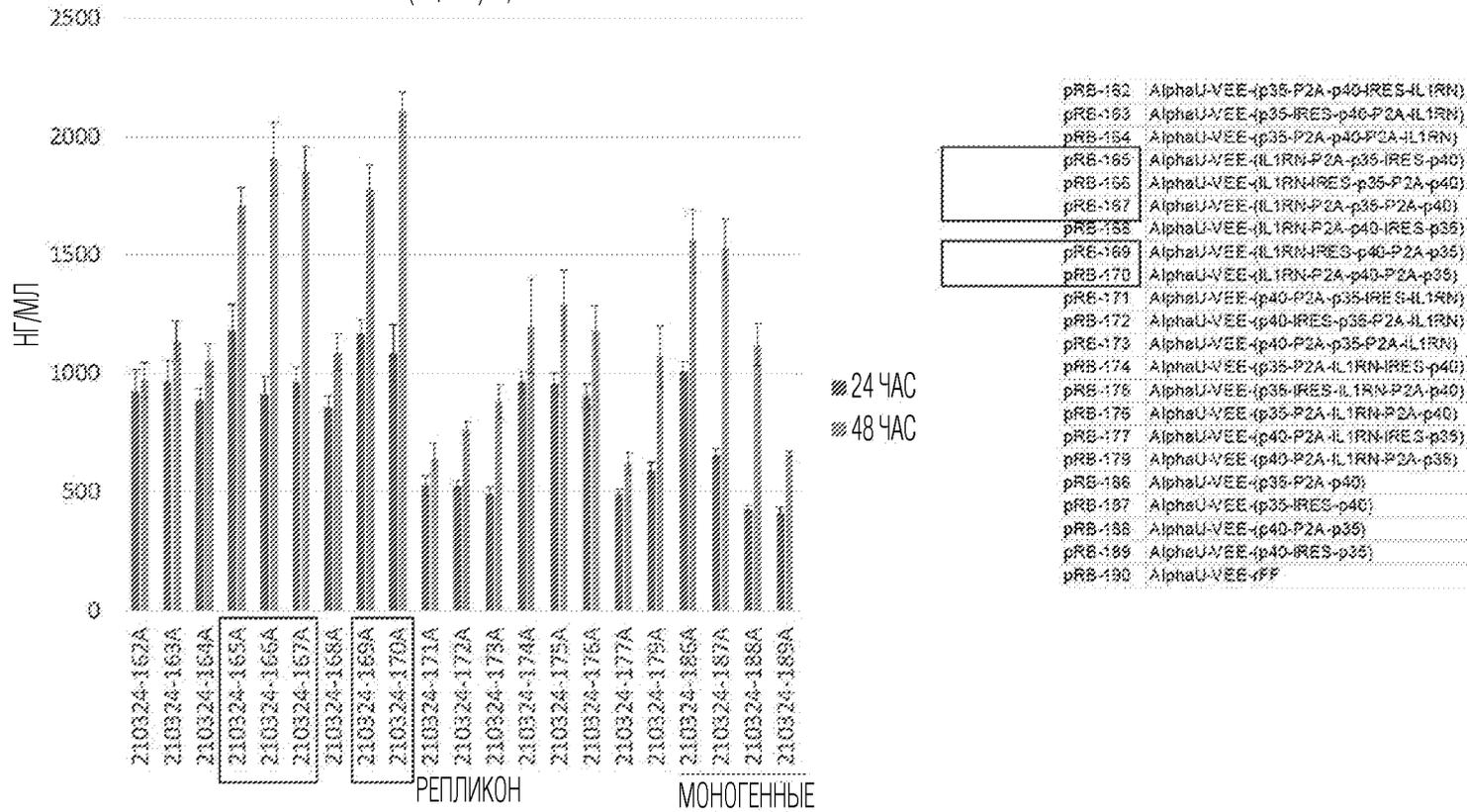


ФИГ. 6



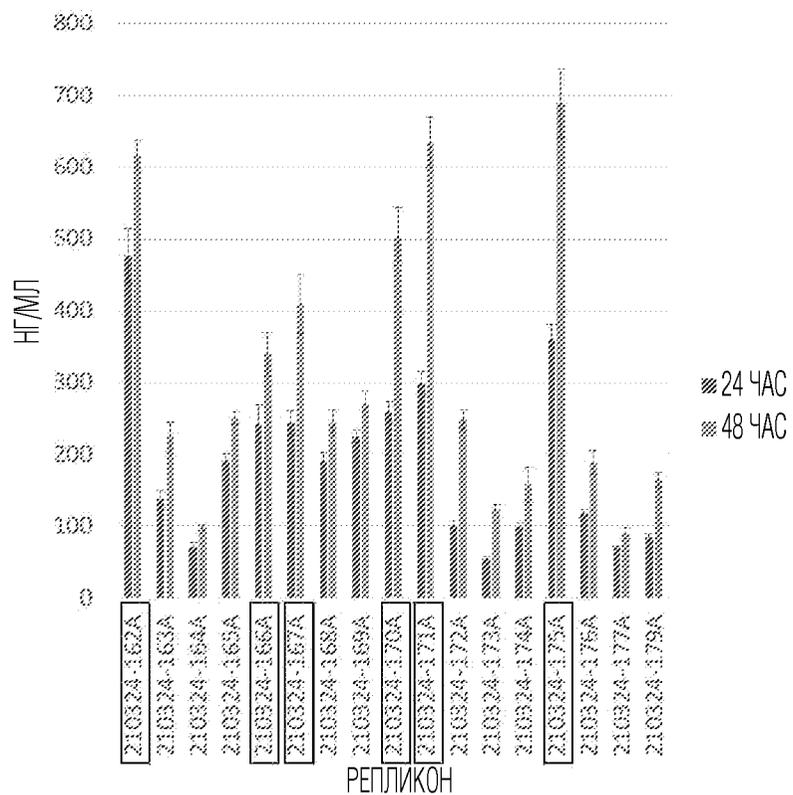
ФИГ. 7

ELISA IL12 (СР. И СТ. ОТКЛ ВСЕХ РАЗБАВЛЕНИЙ С 2,5<ПО-  
Г(ПГ/МЛ)<3,5



ФИГ. 8А

ELISA IL12 (СР. И СТ. ОТКЛ ВСЕХ РАЗБАВЛЕНИЙ С 2,5-ЛОГ(ПГ/  
МЛ)<3,5

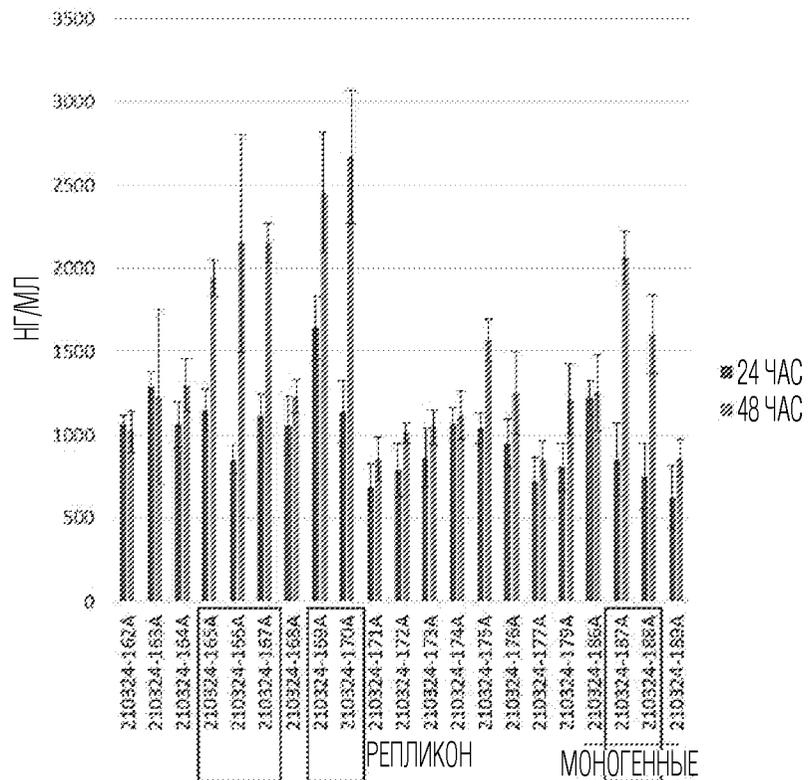


pRB-162	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40-IRES-IL1RN)
pRB-163	AlphaU-VEE-(p35-IRES-p40-P2A-IL1RN)
pRB-164	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40-P2A-IL1RN)
pRB-165	AlphaU-VEE-(IL1RN-P2A-p35-IRES-p40)
pRB-166	AlphaU-VEE-(IL1RN-IRES-p35-P2A-p40)
pRB-167	AlphaU-VEE-(IL1RN-P2A-p35-P2A-p40)
pRB-168	AlphaU-VEE-(IL1RN-P2A-p40-IRES-p35)
pRB-169	AlphaU-VEE-(IL1RN-IRES-p40-P2A-p35)
pRB-170	AlphaU-VEE-(IL1RN-P2A-p40-P2A-p35)
pRB-171	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35-IRES-IL1RN)
pRB-172	AlphaU-VEE-(p40-IRES-p35-P2A-IL1RN)
pRB-173	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35-P2A-IL1RN)
pRB-174	AlphaU-VEE-(p35-P2A-IL1RN-IRES-p40)
pRB-175	AlphaU-VEE-(p35-IRES-IL1RN-P2A-p40)
pRB-176	AlphaU-VEE-(p35-P2A-IL1RN-P2A-p40)
pRB-177	AlphaU-VEE-(p40-P2A-IL1RN-IRES-p35)
pRB-179	AlphaU-VEE-(p40-P2A-IL1RN-P2A-p35)
pRB-186	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40)
pRB-187	AlphaU-VEE-(p35-IRES-p40)
pRB-188	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35)
pRB-189	AlphaU-VEE-(p40-IRES-p35)
pRB-190	AlphaU-VEE-rFF

- IL1RA ПОСЛЕ ЛУЧШЕЙ ЭКСПРЕССИИ IRES

ФИГ. 8В

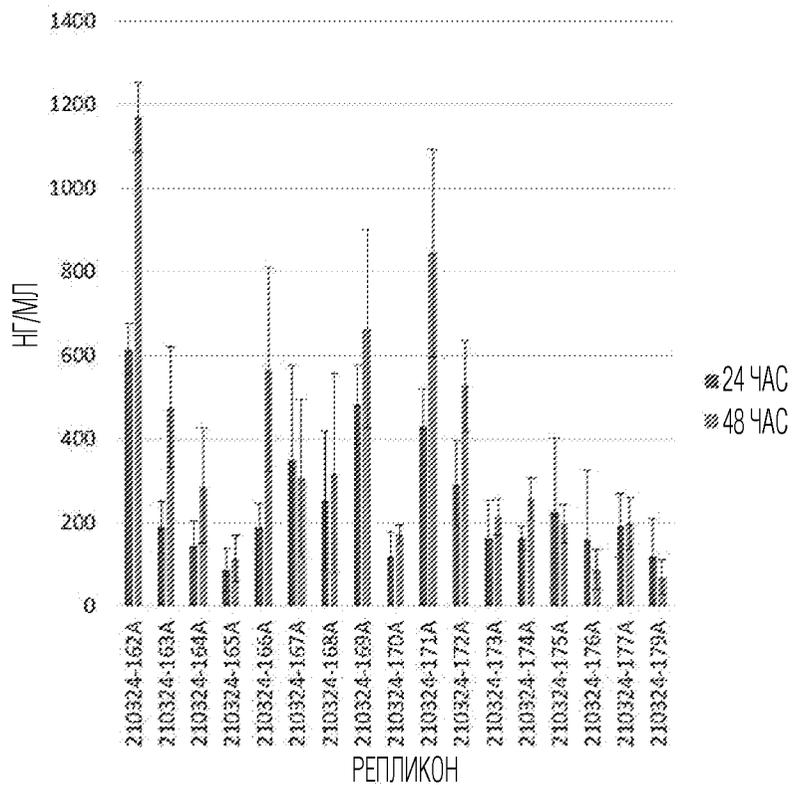
БИОАНАЛИЗ IL12 (СР. И СТ. ОТКЛ ВСЕХ РАЗБАВЛЕНИЙ С  
ЛОГ(ПГ/МЛ)<4,7)



pRB-152	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40-IRES-4L1RN)
pRB-153	AlphaU-VEE-(p35-IRES-p40-P2A-4L1RN)
pRB-164	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40-P2A-4L1RN)
pRB-165	AlphaU-VEE-(4L1RN-P2A-p35-IRES-p40)
pRB-155	AlphaU-VEE-(4L1RN-IRES-p35-P2A-p40)
pRB-167	AlphaU-VEE-(4L1RN-P2A-p35-P2A-p40)
pRB-168	AlphaU-VEE-(4L1RN-P2A-p40-IRES-p35)
pRB-169	AlphaU-VEE-(4L1RN-IRES-p40-P2A-p35)
pRB-170	AlphaU-VEE-(4L1RN-P2A-p40-P2A-p35)
pRB-171	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35-IRES-4L1RN)
pRB-172	AlphaU-VEE-(p40-IRES-p35-P2A-4L1RN)
pRB-173	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35-P2A-4L1RN)
pRB-174	AlphaU-VEE-(p35-P2A-4L1RN-IRES-p40)
pRB-175	AlphaU-VEE-(p35-IRES-4L1RN-P2A-p40)
pRB-176	AlphaU-VEE-(p35-P2A-4L1RN-P2A-p40)
pRB-177	AlphaU-VEE-(p40-P2A-4L1RN-IRES-p35)
pRB-178	AlphaU-VEE-(p40-P2A-4L1RN-P2A-p35)
pRB-186	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40)
pRB-187	AlphaU-VEE-(p35-IRES-p40)
pRB-188	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35)
pRB-189	AlphaU-VEE-(p40-IRES-p35)
pRB-190	AlphaU-VEE-PP

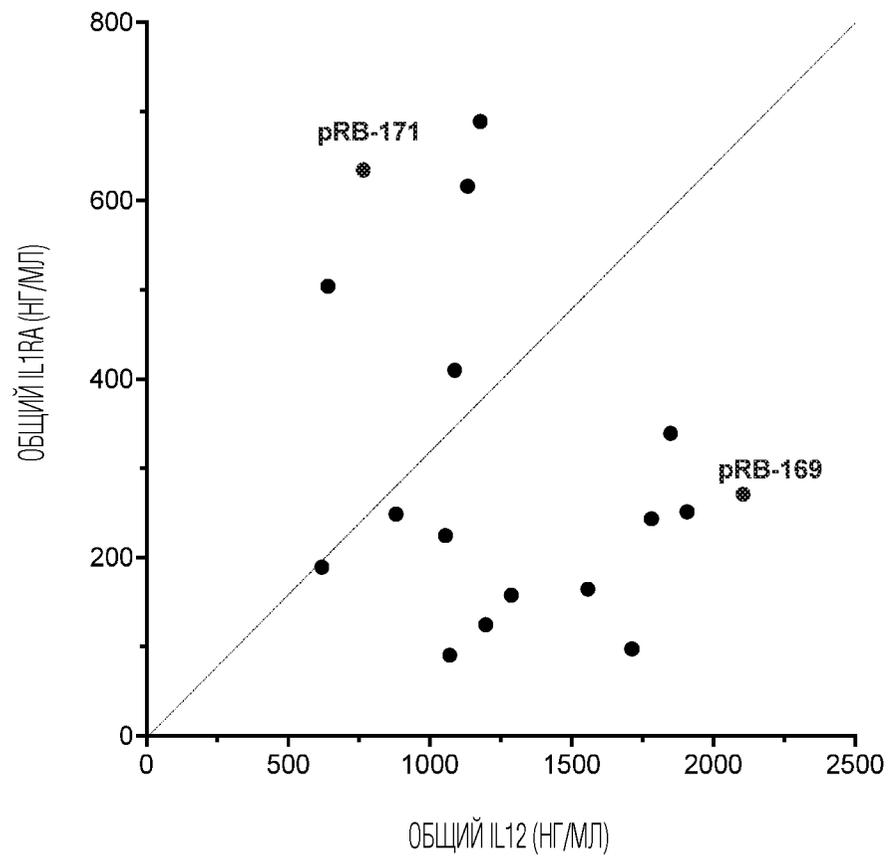
ФИГ. 9А

БИОАКТИВНОСТЬ IL1RA (СР. И СТ. ОТКЛ ВСЕХ РАЗБАВЛЕНИЙ С  
2,5<LOG(ПГ/МЛ)<4,2)

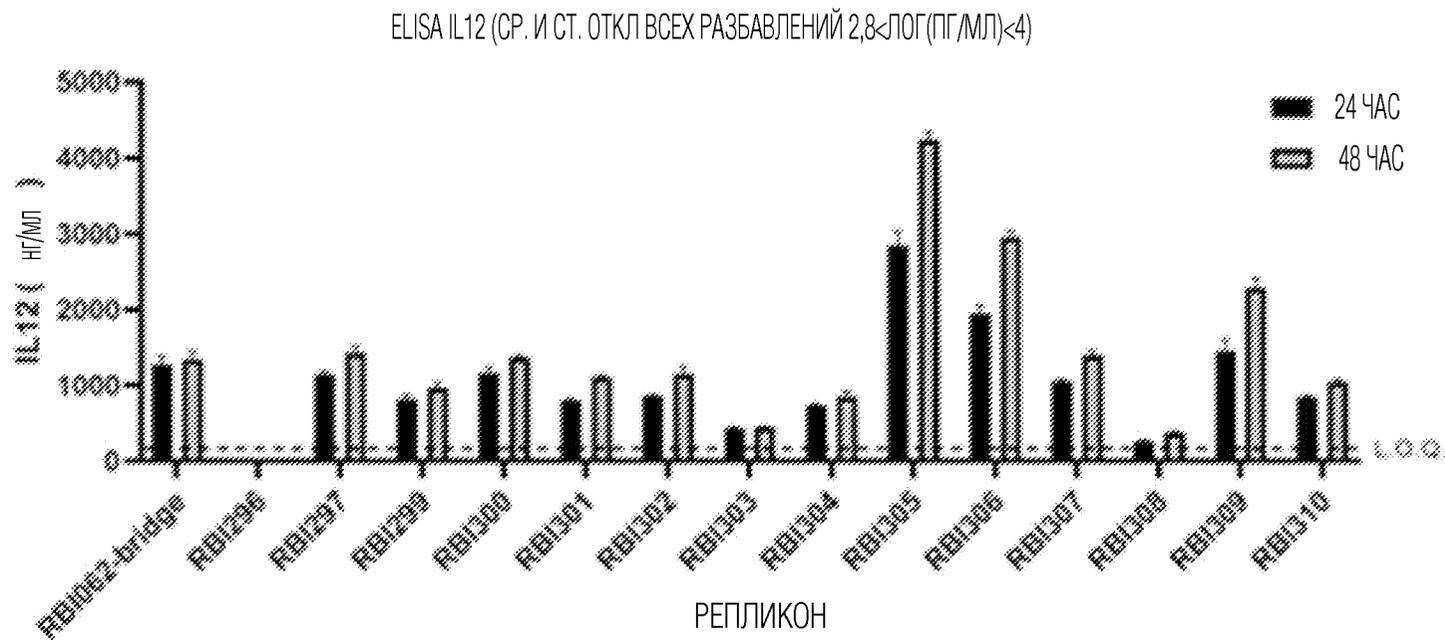


210324-182A AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40-RES-IL1RN)
210324-183A AlphaU-VEE-(p35-RES-p40-P2A-IL1RN)
210324-184A AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40-P2A-IL1RN)
210324-185A AlphaU-VEE-(IL1RN-P2A-p35-RES-p40)
210324-186A AlphaU-VEE-(IL1RN-RES-p35-P2A-p40)
210324-187A AlphaU-VEE-(IL1RN-P2A-p35-P2A-p40)
210324-188A AlphaU-VEE-(IL1RN-P2A-p40-RES-p35)
210324-189A AlphaU-VEE-(IL1RN-RES-p40-P2A-p35)
210324-170A AlphaU-VEE-(IL1RN-P2A-p40-P2A-p35)
210324-171A AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35-RES-IL1RN)
210324-172A AlphaU-VEE-(p40-RES-p35-P2A-IL1RN)
210324-173A AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35-P2A-IL1RN)
210324-174A AlphaU-VEE-(p35-P2A-IL1RN-RES-p40)
210324-175A AlphaU-VEE-(p35-RES-IL1RN-P2A-p40)
210324-176A AlphaU-VEE-(p35-P2A-IL1RN-P2A-p40)
210324-177A AlphaU-VEE-(p40-P2A-IL1RN-RES-p35)
210324-179A AlphaU-VEE-(p40-P2A-IL1RN-P2A-p35)
210324-186A AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40)
210324-187A AlphaU-VEE-(p35-RES-p40)
210324-188A AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35)
210324-189A AlphaU-VEE-(p40-RES-p35)
001 VEE+FF

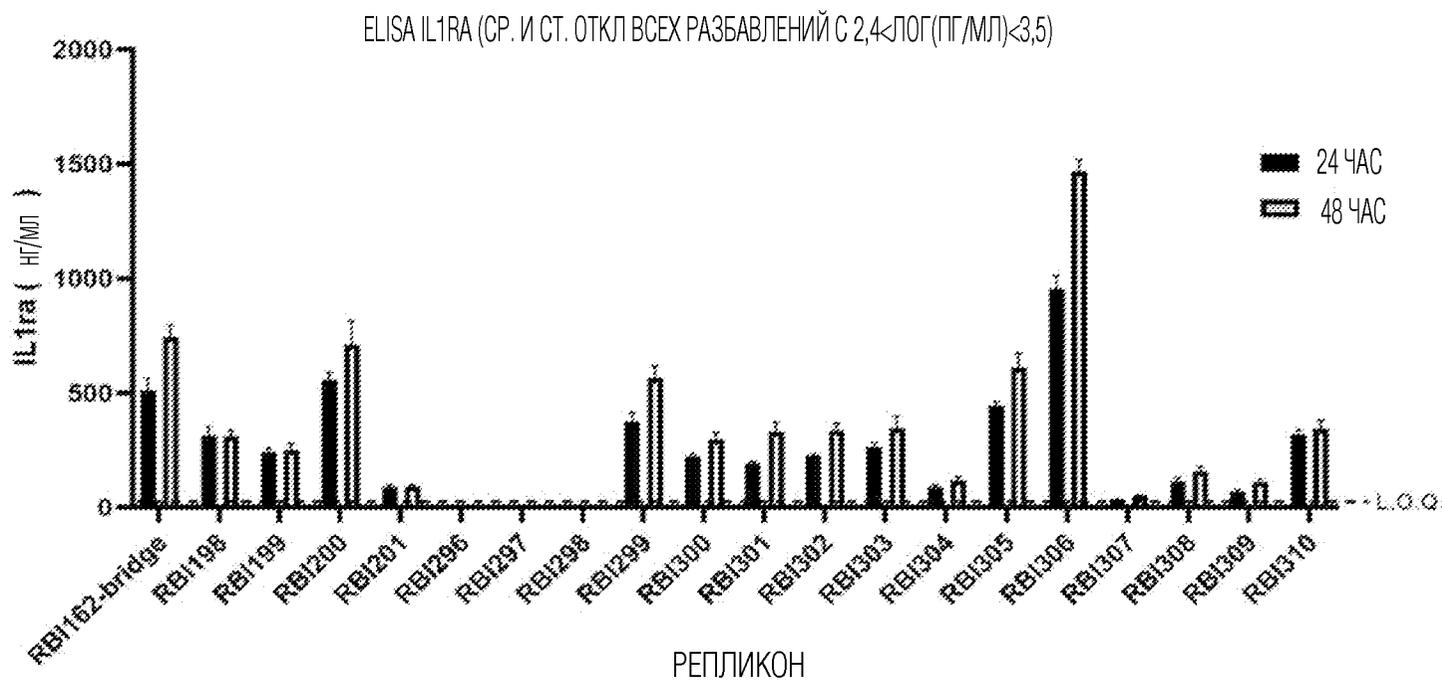
ФИГ. 9В



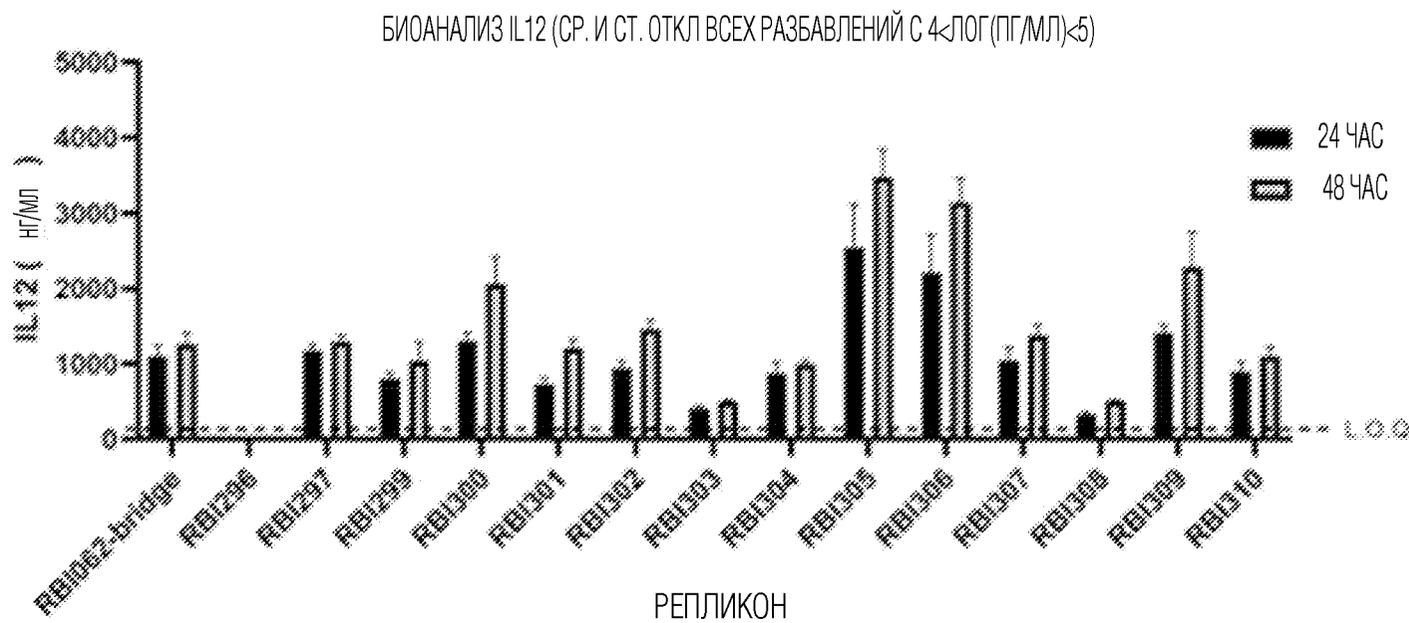
ФИГ. 10



ФИГ. 11А



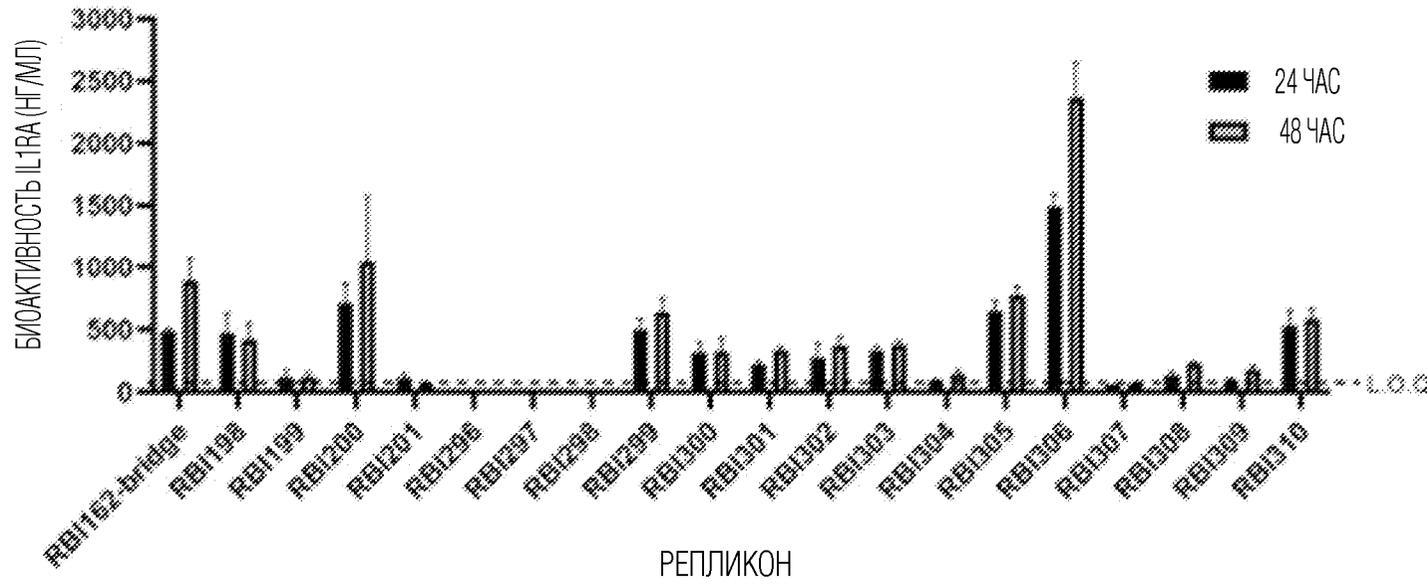
ФИГ. 11В



18/24

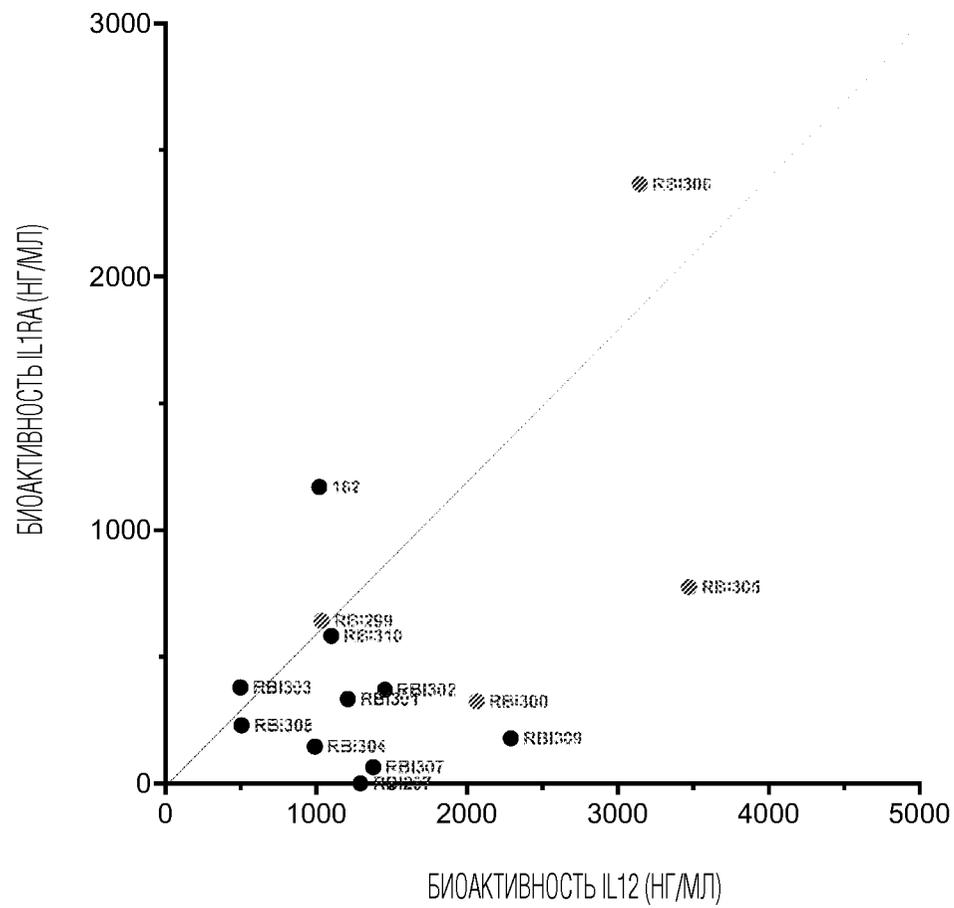
ФИГ. 12А

БИОАНАЛИЗ IL1RA (СР. И СТ. ОТКЛ ВСЕХ РАЗБАВЛЕНИЙ С 3,3<LOG(ПГ/МЛ)<5)



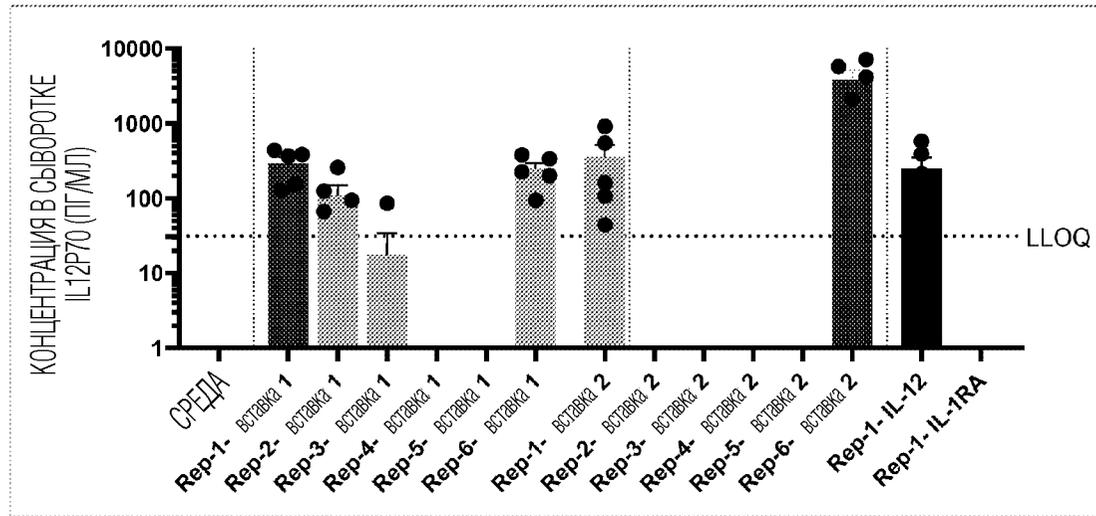
19/24

ФИГ. 12В

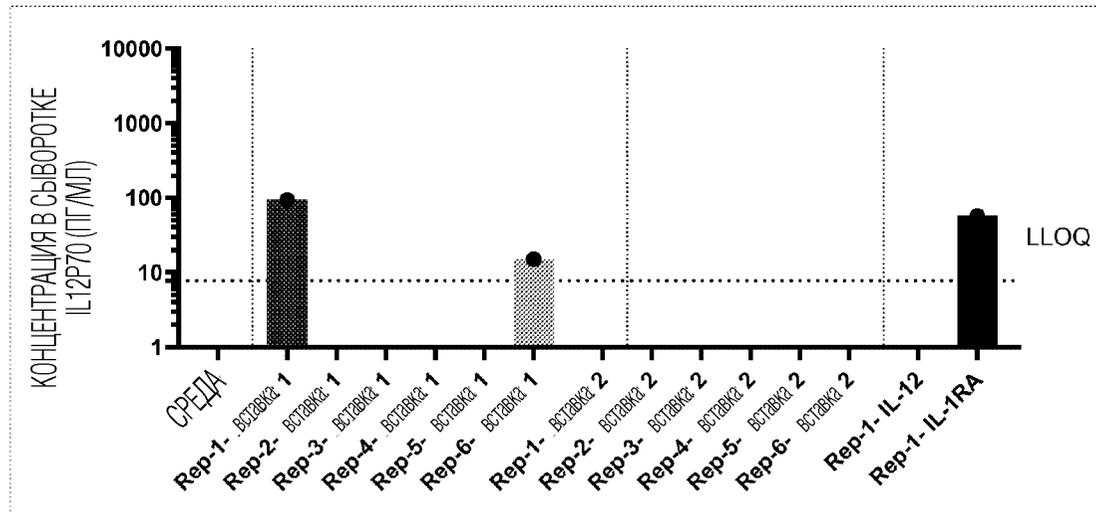


ФИГ. 13

ФИГ. 14А

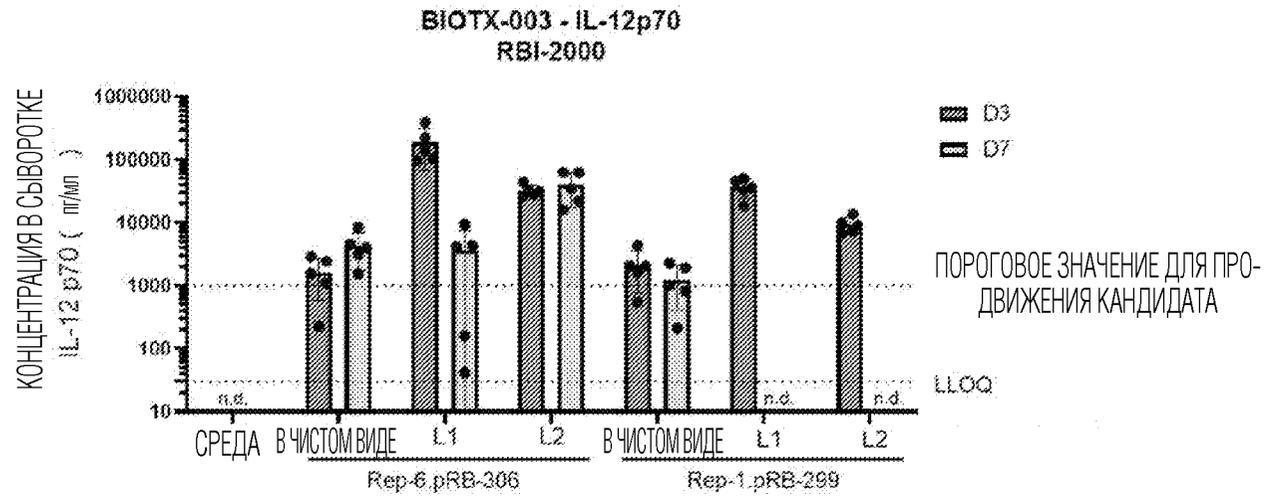


ФИГ. 14В

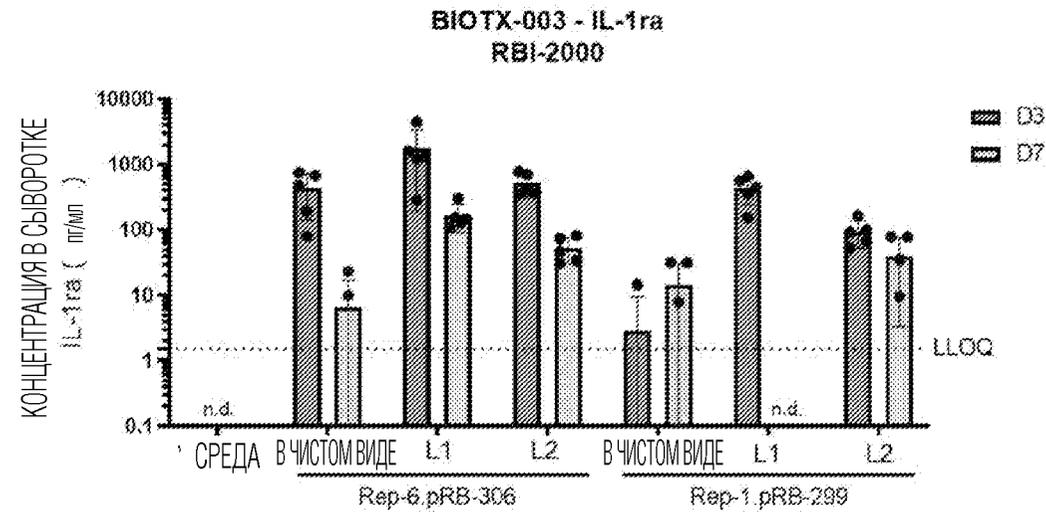


БИОАКТИВНОСТЬ IL12 (НГ/МЛ)

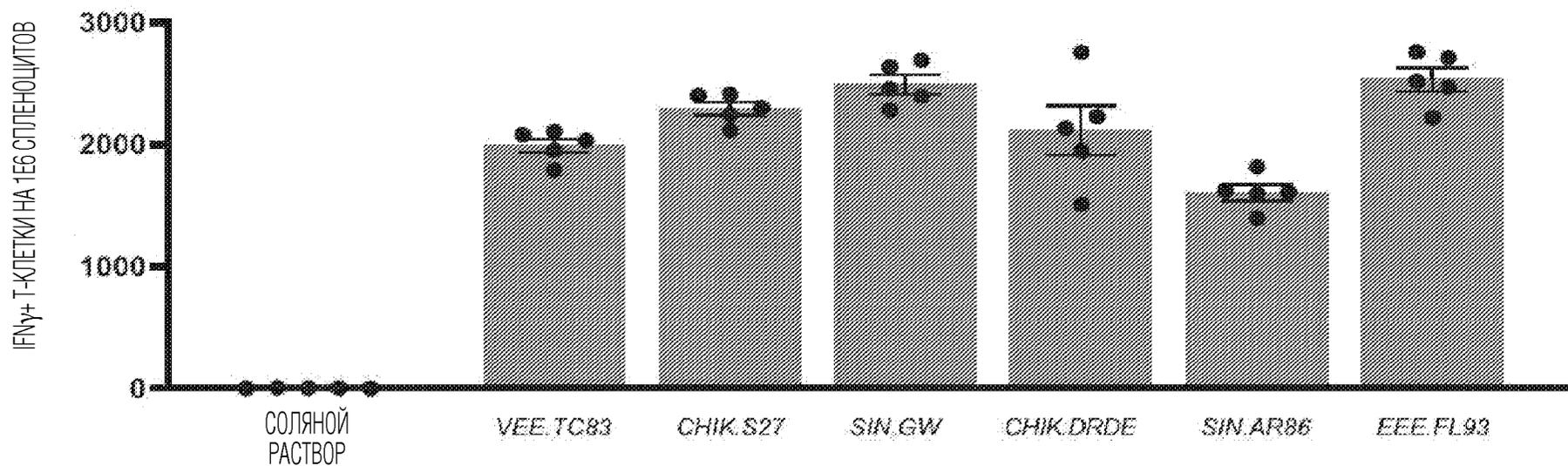
ФИГ. 15А



ФИГ. 15В



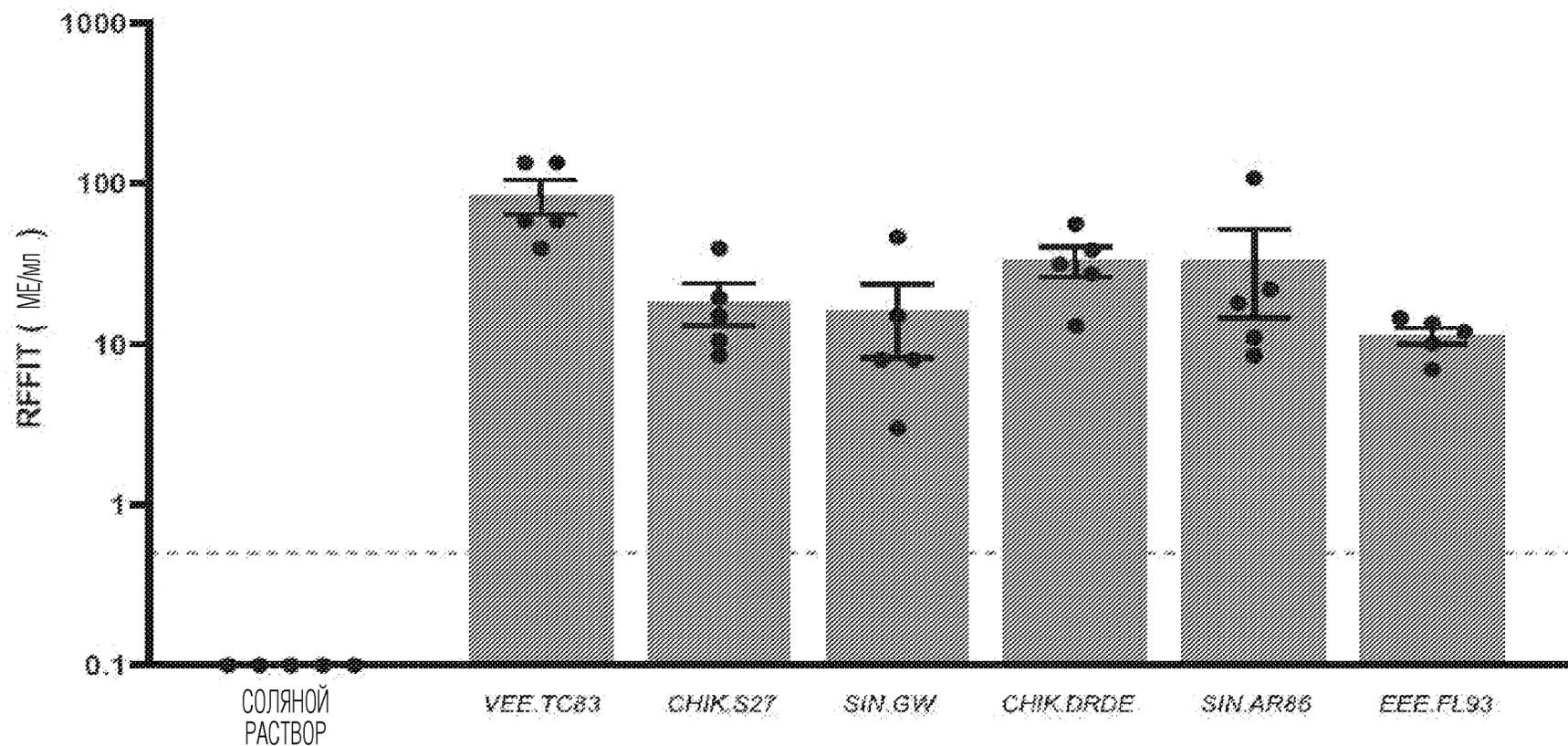
ИММУНОГЕННОСТЬ РАЗНЫХ ВЕКТОРОВ SRRNA К ВИРУСНЫМ АНТИГЕНАМ



ПУЛ СТИМУЛЯЦИИ ПЕПТИДОВ: ГЛИКОПРОТЕИН G БЕШЕНСТВА  
ОТображение: СИМВОЛЫ ОТОбраЖАЮТ ОТДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, СТОЛБИКИ ОТОбраЖАЮТ СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ СО СТ. ОТКЛ

ФИГ. 16А

ИММУНОГЕННОСТЬ РАЗНЫХ ВЕКТОРОВ SRRNA К ВИРУСНЫМ АНТИГЕНАМ



ПУНКТИРНАЯ ЛИНИЯ ОТОБРАЖАЕТ ЗАЩИТНЫЙ ТИТР 0,5 МЕ/МЛ  
ОТОБРАЖЕНИЕ: СИМВОЛЫ ОТОБРАЖАЮТ ОТДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, СТОЛБИКИ ОТОБРАЖАЮТ ГЕОМЕТРИЧЕСКОЕ СРЕДНЕЕ С ГЕОМЕТРИЧЕСКИМ СТ.ОТКЛ.

ФИГ. 16В