

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491419 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.10

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.28

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ НА ESR1, P13K, HER2 И HER3

(31) 17/537,199

(72) Изобретатель:

(32) 2021.11.29

Ван Натаниэль Стивен, Мияке-
Стоунер Сигеки Джозеф, Алиахмад
Париназ (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/080522

(87) WO 2023/097319 2023.06.01

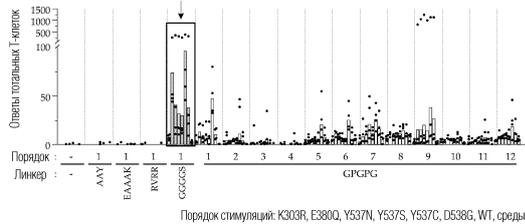
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

РЕПЛИКЕЙТ БАЙОСАЙЕНС, ИНК.
(US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области молекулярной вирусологии, и в частности относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим модифицированную конструкцию вирусного генома или самореплицирующейся РНК (срРНК) вируса энцефалита лошадей, к содержащим их фармацевтическим композициям и к применению таких молекул и композиций нуклеиновых кислот для продукции желательных продуктов в культурах клеток или в живом организме. Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, а также к способам профилактики и/или лечения злокачественной опухоли.



202491419
A1

202491419
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581387EA/061

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ НА ESR1, P13K, HER2 И HER3

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет заявки на патент США серийный №. 17/537199, поданной 29 ноября 2021 г.. Полное содержание процитированной выше заявки явно приведено в настоящем описании в качестве ссылки, включая все чертежи.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Материал сопутствующего списка последовательностей, таким образом, приведен в настоящем описании в качестве ссылки. Файл XML сопутствующего списка последовательностей, названный 058462-505001WO_Sequence Listing_ST26.xml, создан 28 ноября 2022 г. и составляет 101 кБ.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к области молекулярной вирусологии и иммунологии, и в частности, относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим модифицированные вирусный геном или самореплицирующуюся РНК (срРНК) вируса энцефалита лошадей, к содержащим их фармацевтическим композициям и к применению таких молекул и композиций нуклеиновых кислот для продукции желательных продуктов в культурах клеток или в живом организме. Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, а также к способам предотвращения и/или лечения нарушения здоровья.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Возникновение резистентности к противораковым терапевтическим или профилактическим средствам является распространенной проблемой в лечении злокачественной опухоли или предрака, и, в некоторых случаях, механизм резистентности к лекарственному средству известен. Резистентность часто является результатом экспрессии гена (сверхэкспрессии или блокированной экспрессии белка), изменения в гене посредством мутации, или изменения последовательностей посредством измененного сплайсинга или транслокации, или измененной активации белка в клетках (сверхактивации или блокированной активации белка).

[0005] Одним из способов работы с теми злокачественными опухолями, в которых возникают такие изменения экспрессии гена, изменение и мутация, являлась разработка противораковых вакцин. Противораковые вакцины нацелены на антигены, экспрессируемые опухолями, но применение этих вакцин было не настолько эффективным, как надеялись, из-за индукции иммунной толерантности посредством хронической сверхэкспрессии подвергаемого нацеливанию белка в отсутствие костимулирующих молекул и индукции иммуномодулирующего окружения. Профилактические противораковые вакцины могут являться более многообещающими, но злокачественные опухоли являются высоко изменчивыми, с множественными

генетическими изменениями, но с немногими действительно универсальными изменениями. Таким образом, сложно прогнозировать, какие антигены могут являться сверхэкспрессированными на какой-либо конкретной злокачественной опухоли, или следует ли вакцинировать индивидуума, и если да, какими антигенами.

[0006] Изобретение, представленное в настоящем описании, предоставляет решения проблем, существующих для предшествующих попыток получения противораковых вакцин и потенциально предлагает улучшенные способы лечения и предотвращения злокачественных опухолей.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение относится, главным образом, к разработке иммунотерапевтических средств, таких как рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот и включающие их фармацевтические композиции, для применения в профилактике и лечении различных нарушений здоровья, таких как злокачественная опухоль. В частности, как более подробно описано ниже, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конструкциям нуклеиновых кислот, содержащим последовательности, кодирующие модифицированные геном или самореплицирующуюся РНК (срРНК) альфавируса вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), где по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного генома или срРНК EEEV, была заменена на кодирующую последовательность для полипептидной конструкции, содержащей а) кодирующую последовательность для рецептора эстрогенов 1 (ESR1) или его варианта; б) кодирующую последовательность для РІЗК или его варианта; с) кодирующую последовательность для HER2 или его варианта и d) кодирующую последовательность для HER3 или его варианта. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам, которые были сконструированы для включения одной или более из конструкций нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, к способам получения представляющей интерес молекулы, и к фармацевтическим композициям, включающим одно или более из следующего: (а) конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, (б) рекомбинантной клетки по настоящему изобретению или (с) фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Кроме того, в конкретных аспектах, настоящее изобретение относится к композициям и способам для индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, и/или для профилактики и/или лечения различных нарушений здоровья, включая злокачественные опухоли. Вышеприведенное краткое изложение сущности изобретения является только иллюстративным и не предназначено, чтобы являться ограничивающим каким-либо образом. В дополнение к иллюстративным вариантам осуществления и признакам, описанным в настоящем описании, дополнительные аспекты, варианты осуществления, объекты и признаки настоящего изобретения станут полностью очевидными из чертежей и подробного описания, и формулы изобретения.

[0008] В одном аспекте, настоящее изобретение относится к конструкциям

нуклеиновых кислот, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированные геном или сРНК вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), где по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного генома или сРНК EEEV, была заменена на кодирующую последовательность для полипептидной конструкции, содержащей а) кодирующую последовательность для рецептора эстрогенов 1 (ESR1) или его варианта; б) кодирующую последовательность для PI3K или его варианта; в) кодирующую последовательность для HER2 или его варианта, и д) кодирующую последовательность для HER3 или его варианта.

[0009] В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или сРНК EEEV не содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вирусные структурные белки.

[0010] В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая модифицированные EEEV или сРНК, является функционально связанной с промоторной последовательностью.

[0011] В некоторых вариантах осуществления, кодирующие последовательности из (а) - (d) являются функционально связанными друг с другом в пределах одной открытой рамки считывания (например, в полицистронной ORF). В некоторых вариантах осуществления, каждый антиген находится под контролем отдельного промотора. В некоторых других вариантах осуществления, все четыре антигена находятся под контролем одного промотора, например, субгеномного промотора S26.

[0012] В некоторых вариантах осуществления, кодирующие последовательности являются функционально связанными друг с другом посредством кодирующей последовательности для аутопротеолитического пептида или внутреннего участка связывания рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления, аутопротеолитический пептид содержит одну или более последовательностей аутопротеолитического расщепления, происходящих из кальций-зависимой сериновой эндопротеазы (фурина), 2A тешовируса-1 свиней (P2A), 2A вируса ящура (FMDV) (F2A), 2A вируса ринита А лошадей (ERAV) (E2A), 2A вируса *Thosea asigna* (T2A), 2A вируса цитоплазматического полиэдроза (BmCPV2A), 2A вируса фляшерии (BmIFV2A), или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, IRES происходит из IRES ассоциированного с саркомой Капоши вируса герпеса (KSHV), IRES вируса гепатита, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса черемуховой тли, IRES фактора роста фибробластов, IRES фактора роста тромбоцитов, IRES фактора роста эндотелия сосудов, IRES инсулиноподобного фактора роста, IRES пикорнавируса, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), IRES Pim-1, IRES p53, IRES Araf-1, IRES TDP2, IRES L-тис и IRES с-тис.

[0013] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из кодирующих последовательностей из (а) - (d) содержит одно или более молекулярных изменений. В некоторых вариантах осуществления, одно или более молекулярных

изменений введены в конфигурацию множества изменяющих кассет, аранжированных в тандеме вдоль длины кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления, множество изменяющих кассет являются функционально связанными друг с другом посредством одного или более линкеров.

[0014] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для варианта ESR1 в (a) содержит одно или более молекулярных изменений, стимулирующих независимые от лиганда виды активности рецептора. В некоторых вариантах осуществления, одно или более молекулярных изменений содержит активирующую мутацию, выбранную из группы, состоящей из K303R, E380Q, Y537C, Y537S, Y537N и D538G.

[0015] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для варианта PI3K в (b) содержит одно или более молекулярных изменений, стимулирующих независимые от лиганда виды активности рецептора. В некоторых вариантах осуществления, одно или более молекулярных изменений содержит активирующую мутацию, выбранную из группы, состоящей из E542K, E545K, H1047L и H1047R.

[0016] В некоторых вариантах осуществления, вариант HER2 в (c) содержит кодирующую последовательность для внеклеточного домена и трансмембранного домена.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, вариант HER3 в (d) содержит кодирующую последовательность для неактивного в качестве киназы HER3.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-10.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции содержит, в направлении от 5'- до 3'-: а) кодирующую последовательность для варианта PI3K, содержащего одно или более активирующих молекулярных изменений, выбранных из E542K, H1047L, E545K и H1047R; б) кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида P2A; с) кодирующую последовательность для варианта HER2, содержащего внеклеточный домен и трансмембранный домен; d) кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида P2A; e) кодирующую последовательность для неактивного в качестве киназы варианта HER3; f) кодирующую последовательность для внутреннего участка связывания рибосомы (IRES); и g) кодирующую последовательность для варианта ESR1, содержащего одно или более активирующих молекулярных изменений, выбранных из Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G и Y537N.

[0020] В одном аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем

описании. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего или клетку насекомого.

[0021] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим фармацевтически приемлемый эксципиент и конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

[0022] В некоторых вариантах осуществления, композицию составляют с носителем для доставки в систему доставки, где система доставки содержит липосому, частицу вирусного репликаона (VRP), наночастицу на основе липидов (LNP), полимерную наночастицу, физиологический буфер, микросферу, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), конъюгат биоактивного лиганда или комбинацию любых из них. В некоторых вариантах осуществления, липид присутствует в массовом соотношении липида к РНК от приблизительно 100:1 до приблизительно 4:1. В некоторых вариантах осуществления, наночастицы на основе липидов имеют средний диаметр от приблизительно 25 нм до приблизительно 1000 нм. В некоторых вариантах осуществления, композицию формулируют в качестве вакцины.

[0023] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа или лечения нарушения здоровья у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, способ представляет собой способ индукции иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления, способ представляет собой способ лечения злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в комбинации с по меньшей мере одним из видов дополнительной терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0024] Признаки настоящего изобретения подробно указаны в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения можно получить со ссылкой на следующее подробное описание, в котором указаны иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы принципы изобретения, и сопутствующие чертежи, в которых:

[0025] **ФИГ. 1** является графическим представлением иммуногенности у мышей, используемой для оптимизации дизайна кассеты мутантного антигена ESR1. На X-оси перечислен порядок молекулярных изменений ESR1 K303R, E380Q, Y537C, Y537S, Y537N и D538G в кассете гена, и использование линкеров, соединяющих эти молекулярные изменения. На Y-оси показаны ответы тотальных Т-клеток с использованием пептидов, кодирующих последовательности ESR1, в анализе ELISpot.

[0026] **ФИГ. 2A-2G** представляют собой фигуры, показывающие экспрессию белка из клеток ВНК-21, трансфицированных моногенными, бигенными или тетрагенными сРНК, кодирующими ESR1, PI3K, HER2 и HER3, из панели конструкций, имеющих

различные молекулярные конфигурации, и их сравнение с моногенными конструкциями. Уровням экспрессии белка с моногенных конструкций приписывают значение «1», и относительную экспрессию каждого гена в бигенных или тетрагенных конфигурациях сравнивают с уровнями экспрессии белка с моногенной конструкции. **ФИГ. 2А** представляет собой иммуноблот для экспрессии белка ESR1. **ФИГ. 2В** представляет собой график, показывающий относительную экспрессию ESR1, на основании интенсивности сигнала полос иммуноблота. **ФИГ. 2С** представляет собой иммуноблот для экспрессии белка PI3K. **ФИГ. 2D** представляет собой график, показывающий относительную экспрессию PI3K, на основании интенсивности сигнала полос иммуноблота. **ФИГ. 2Е** представляет собой график, показывающий относительную экспрессию HER2 на основании средней интенсивности флуоресценции (MFI), количественно оцененной посредством флуоресцентной проточной цитометрии (FFC) после окрашивания с использованием меченого Alexa Fluor® 488 (AF488), специфического для HER2 антитела. **ФИГ. 2F** представляет собой график, показывающий относительную экспрессию HER3 на основании MFI, количественно оцененной посредством FFC после окрашивания с использованием меченого аллофикоцианином (APC), специфического для HER3 антитела. **ФИГ. 2G** представляет собой радиальную диаграмму, обобщающую считывание экспрессии белка для ESR1, PI3K, HER2 и HER3 в панели конструкций.

[0027] **ФИГ. 3** является графическим представлением ответов Т-клеток у мышей, подвергнутых введению конструкций, имеющих различные молекулярные конфигурации. На х-оси показаны различные конструкции, в моногенной, бигенной или тетрагенной форме, имеющие различные порядки ESR1, PI3K, HER2 и HER3. На Y-оси показаны ответы тотальных Т-клеток на пептиды, кодирующие последовательности, происходящие из молекулярных изменений ESR1, HER2 и HER3, в анализе ELISpot. Ответы на PI3K не измеряли в этом эксперименте, поскольку он не вызывает ответов у мышей BALB/c.

[0028] **ФИГ. 4** представляет собой схему иллюстративной кассеты неоантигена. Пептиды, содержащие молекулярные изменения, разделены линкерами для получения одной кассеты.

[0029] **ФИГ. 5** является графическим представлением ответов Т-клеток у мышей, подвергнутых введению конструкций, имеющих различные срРНК-векторы и сформулированных в две различные липидные наночастицы, отличающиеся катионным липидом либо LNP1 («L1»), либо LNP2 («L2») в составе.

[0030] **ФИГ. 6** представляет собой схему, описывающую два типа (т.е., терапевтическое и профилактическое) исследований эффективности при положительном по рецептору эстрогенов раке молочной железы для моделирования заболевания человека.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0031] Настоящее изобретение относится, главным образом, к конструкциям нуклеиновых кислот, экспрессирующим варианты ESR1, PI3K, HER2 и HER3, для целей как профилактического, так и терапевтического лечения заболевания человека, например, такого как рак молочной железы. Эти конструкции направлены на решение проблемы с

вариантами лечения, такими как противораковые вакцины, обусловленной сложностью прогнозирования, какие антигены могут являться сверхэкспрессированными на какой-либо конкретной злокачественной опухоли, или следует ли вакцинировать индивидуума, и если да, какими антигенами. Настоящее изобретение относится, среди прочего, к системам экспрессии генов с превосходным потенциалом экспрессии, которые являются пригодными для экспрессии кодирующей последовательности для рецептора эстрогенов 1 (ESR1) или его варианта, кодирующей последовательности для PI3K или его варианта, кодирующей последовательности для HER2 или его варианта и кодирующей последовательности для HER3 или его варианта, в рекомбинантных клетках. Например, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конструкциям нуклеиновых кислот например, таким как экспрессирующие конструкции и векторы, содержащие модифицированные геном или сРНК вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), в которых по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного генома или сРНК EEEV, была заменена на кодирующую последовательность для полипептидной конструкции, содержащей кодирующую последовательность для рецептора эстрогенов 1 (ESR1) или его варианта, кодирующую последовательность для PI3K или его варианта, кодирующую последовательность для HER2 или его варианта и кодирующую последовательность для HER3 или его варианта. Кроме того, настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, подвергнутым генной инженерии для включения одной или более из молекул нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании. Биологические материалы и рекомбинантные продукты, происходящие из таких рекомбинантных клеток, также включены в объем настоящего изобретения. Настоящее изобретение также относится к композициям и способам, которые можно использовать для индукции иммунного ответа или лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта.

[0032] Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, приведены только с целью организации, и их не следует рассматривать как ограничивающие описанный объект изобретения.

[0033] Несмотря на то, что различные признаки настоящего изобретения могут быть описаны в контексте одного варианта осуществления, признаки могут быть также представлены по отдельности или в любой подходящей комбинации. И наоборот, несмотря на то, что настоящее изобретение может быть описано в настоящем описании в контексте отдельных вариантов осуществления, для ясности, настоящее изобретение может быть также воплощено в одном варианте осуществления.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0034] Если не определено иное, все термины в данной области, условные сокращения и другие научные термины или терминология, используемые в настоящем описании, предназначены, чтобы иметь значения, являющиеся общепринятыми для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях,

термины с общепринятыми значениями определены в настоящем описании для ясности и/или для быстрой ссылки, и включение таких определений в настоящее описание не следует обязательно рассматривать как представляющее значительное различие с общепринятыми в данной области. Многие из способов и процедур, которые описаны или на которые ссылаются в настоящем описании, являются хорошо известными и общеупотребительными, с использованием общепринятых способов, для специалиста в данной области.

[0035] Формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного. Например, термин «клетка» включает одну или более клеток, содержащие их смеси. «А и/или В» используют в настоящем описании для включения всех из следующих альтернатив: «А», «В», «А или В», и «А и В».

[0036] Термины «введение» и «осуществление введения», в рамках изобретения, относятся к доставке биоактивных композиции или состава посредством способа введения, включающего, но без ограничения, интраназальное, чрескожное, внутривенное, внутриартериальное, внутримышечное, внутриузловое, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное, пероральное, интравагинальное и местное введение или их комбинации. Термин включает, но без ограничения, введение медицинским работником и самостоятельное введение.

[0037] Термины «клетка», «культура клеток» и «линия клеток» относится не только к конкретной рассматриваемой клетке, культуре клеток или линии клеток, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки, культуры клеток или линии клеток, независимо от количества переносов или пассажей в культуре. Следует понимать, что не все потомство является точно идентичным родительской клетке. Это происходит из-за того, что конкретные модификации могут возникать в последующих поколениях, либо из-за мутации (например, преднамеренных или самопроизвольных мутаций), либо из-за влияний внешней среды (например, метилирования или других эпигенетических модификаций), так что потомство может, фактически, не являться идентичным родительской клетке, но все еще включено в объем термина, в рамках изобретения, при условии, что потомство сохраняет такую же функциональность, что и исходная клетка, культура клеток или линия клеток.

[0038] Термин «конструкция» относится к рекомбинантной молекуле, например, рекомбинантным нуклеиновой кислоте или полипептиду, включающей одну или более последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей из гетерологичных источников. Например, полипептидные конструкции могут представлять собой химерные полипептидные молекулы, в которых две или более аминокислотных последовательности различного происхождения являются функционально связанными друг с другом в одиночной полипептидной конструкции. Подобным образом, конструкции нуклеиновых кислот могут представлять собой химерные молекулы нуклеиновых кислот, в которых две или более последовательности нуклеиновых кислот различного происхождения собраны в одиночную молекулу нуклеиновой кислоты. Репрезентативные

конструкции нуклеиновых кислот могут включать любые молекулы рекомбинантных нуклеиновых кислот, линейные или кольцевые, одноцепочечные или двухцепочечные молекулы нуклеиновых кислот ДНК или РНК, происходящие из любого источника, такого как плазида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся молекула полинуклеотида, фаг, способные к геномной интеграции или автономной репликации, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, где одна или несколько последовательностей нуклеиновых кислот были функционально связаны. Две или более конструкции нуклеиновых кислот могут содержаться в одной молекуле нуклеиновой кислоты, такой как одиночный вектор, или могут содержаться в двух или более отдельных молекулах нуклеиновых кислот, таких как два или более отдельных вектора.

[0039] Термин «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество» композиции по настоящему изобретению, например, конструкций нуклеиновых кислот, срРНК, рекомбинантных клеток, и/или фармацевтических композиций, в общем, относится к количеству, достаточному для осуществления композицией указанной цели, относительно отсутствия композиции (например, достижения эффекта, ради которого ее вводят, стимуляции иммунного ответа, предотвращения или лечения заболевания, или уменьшения одного или более симптомов заболевания, нарушения, инфекции или нарушения здоровья). Примером «эффективного количества» является количество, достаточное для внесения вклада в лечение, предотвращение, или уменьшение симптома или симптомов заболевания, которое также может быть обозначено как «терапевтически эффективное количество». «Уменьшение» симптома означает уменьшение тяжести или частоты симптома(ов), или прекращение симптома(ов). Точное количество композиции, включающее «терапевтически эффективное количество», зависит от цели лечения, и его может определить специалист в данной области с использованием известных способов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[0040] Термин «голые» в рамках изобретения, упоминают в отношении нуклеиновых кислот, которые являются в основном свободными от других макромолекул, таких как липиды, полимеры и белки. «Голую» нуклеиновую кислоту, такую как самореплицирующаяся РНК, не формулируют с другими макромолекулами для улучшения клеточного поглощения. Соответственно, голая нуклеиновая кислота не является инкапсулированной в липосоме, микрочастице, наночастице, катионной эмульсии, абсорбированной на них или связанной с ними, и т.п.

[0041] Термин «функционально связанные», в рамках изобретения, обозначает физическую или функциональную связь между двумя или более элементами, например, полипептидными последовательностями или полинуклеотидными последовательностями, которая позволяет им функционировать предназначенным для них образом. Например,

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

[0042] Термин «порция», в рамках изобретения, относится к части. Применительно к конкретной структуре, такой как полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность, или белок, термин ее «порция» может обозначать непрерывную или прерывистую часть указанной структуры. Например, порция аминокислотной последовательности содержит по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% и по меньшей мере 90% аминокислот указанной аминокислотной последовательности. Дополнительно или альтернативно, если порция представляет собой прерывистую часть, указанная прерывистая часть состоит из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более частей структуры (например, доменов белка), где каждая часть представляет собой непрерывный элемент структуры. Например, прерывистая часть аминокислотной последовательности может состоять из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более, например, не более, чем 4 частей указанной аминокислотной последовательности, где каждая часть содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 непрерывных аминокислот, по меньшей мере 10 непрерывных аминокислот, по меньшей мере 20 непрерывных аминокислот или по меньшей мере 30 непрерывных аминокислот аминокислотной последовательности.

[0043] Когда представлен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение, до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не требует иного, между верхним и нижним пределами этого диапазона, и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне, включено в настоящее изобретение. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть, независимо, включены в меньшие диапазоны, и также включены в настоящее

изобретение, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

[0044] Конкретные диапазоны представлены в настоящем описании с использованием числовых значений, которым предшествует термин «приблизительно». Термин «приблизительно» используют в настоящем описании для обеспечения буквального обоснования точного количества, которому он предшествует, так же как количества, которое составляет около или приблизительно количества, которому термин предшествует. При определении того, составляет ли количество около или приблизительно конкретно перечисленного количества, непечисленное количество около или приблизительно может представлять собой количество, которое, в контексте, в котором оно представлено, обеспечивает существенный эквивалент конкретно перечисленного количества. Если степень приближения не ясна иным образом из контекста, «приблизительно» означает либо в пределах плюс или минус 10% от представленного значения, либо округленное до ближайшей значащей цифры, во всех случаях включая представленное значение. В некоторых вариантах осуществления, термин «приблизительно» указывает на обозначенное значение \pm вплоть до 10%, вплоть до $\pm 5\%$ или вплоть до $\pm 1\%$.

[0045] Термин «процент идентичности», в рамках изобретения, в контексте двух или более нуклеиновых кислот или белков, относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент нуклеотидов или аминокислот, которые являются одинаковыми (например, приблизительно 60% идентичность последовательности, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более высокая идентичность на протяжении указанной области, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения или обозначенной области), как измерено с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0, с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или посредством выравнивания вручную и визуальной проверки. См., например, веб-сайт NCBI на ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Тогда говорят, что такие последовательности являются «по существу идентичными». Это определение также относится к, или может является применимым к последовательности, комплементарной последовательности. Это определение также включает последовательности, которые имеют делеции и/или добавления, так же как те, которые имеют замены. Идентичность последовательности можно рассчитывать с использованием опубликованных способов и широкодоступных компьютерных программ, таких как пакет программного обеспечения GCS (Devereux et al, *Nucleic Acids Res.* 12:387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul *et al.*, *J Mol Biol* 215:403, 1990). Идентичность последовательности можно измерять с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей, такого как пакет программного обеспечения для анализа последовательностей от Genetics Computer Group

at the University of Wisconsin Biotechnology Center (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), с его параметрами по умолчанию.

[0046] Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент», в рамках изобретения, относится к любому подходящему веществу, обеспечивающему фармацевтически приемлемый носитель, добавку или разбавитель для введения представляющего интерес соединения(й) субъекту. Таким образом, «фармацевтически приемлемый эксципиент» может охватывать вещества, обозначаемые как фармацевтически приемлемые разбавители, фармацевтически приемлемые добавки и фармацевтически приемлемые носители. В рамках изобретения, термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает, но без ограничения, солевой раствор, растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Вспомогательные активные соединения (например, антибиотики и дополнительные лекарственные средства) также можно включать в композиции.

[0047] В рамках изобретения, «субъект» или «индивидуум» включает животных, таких как человек (например, индивидуумы-люди) и не относящихся к человеку животных. В некоторых вариантах осуществления, «субъект» или «индивидуум» представляет собой пациента под наблюдением терапевта. Таким образом, субъект может представлять собой пациента- или индивидуума-человека, который имеет, подвержен риску иметь или, как подозревают, имеет представляющее интерес нарушение здоровья (например, злокачественную опухоль) и/или один или более симптомов нарушения здоровья. Субъект может также представлять собой индивидуума, у которого диагностирован риск развития представляющего интерес нарушения здоровья на время диагностики или позже. Термин «не относящиеся к человеку животные» включает всех позвоночных, например, млекопитающих, например, грызунов, например, мышей, нечеловекообразных приматов и других млекопитающих, например, таких как овцы, собаки, коровы, кур, и не млекопитающих, таких как амфибии, рептилии и т.д.

[0048] Понятно, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем описании, включают «содержащие», «состоящие из» и «в основном состоящие из» аспекты и варианты осуществления. В рамках изобретения, «содержащий» является синонимичным с «включающий», «вмещающий» или «отличающийся», и является включительным или неограничивающим, и не исключает дополнительные, не перечисленные элементы или стадии способов. В рамках изобретения, «состоящие из» исключает любые элементы, стадии или ингредиенты, не указанные в заявленных композиции или способе. В рамках изобретения, «в основном состоящие из» не исключает материалов или стадий, не оказывающих существенного влияния на основные и новые характеристики заявленных композиции или способа. Любое упоминание в настоящем описании термина «содержащие», в частности, в описании компонентов композиции или в описании стадий способа, понимают как охватывающее композиции и способы, в основном состоящие из и состоящие из

перечисленных компонентов или стадий.

[0049] Все гены, наименования генов и продукты генов, описанные в настоящем описании, предназначены, чтобы соответствовать гомологам из любого вида, для которого применимы композиции и способы, описанные в настоящем описании. Таким образом, термины включают, но без ограничения, гены и продукты генов из человека и мышей. Понятно, что когда описан ген или продукт гена из конкретного вида, это описание предназначено, чтобы являться только иллюстративным, и не должно быть интерпретировано как ограничение, если на это явно не указывает контекст, в котором оно встречается. Таким образом, например, для генов или продуктов генов, описанных в настоящем описании, которые, в некоторых вариантах осуществления, относятся к последовательностям нуклеиновых кислот и аминокислотным последовательностям млекопитающих, предназначены для включения гомологичных и/или ортологичных генов и продуктов генов из других животных, включая, но без ограничения, других млекопитающих, рыб, амфибий, рептилий и птиц. В некоторых вариантах осуществления, гены, последовательности нуклеиновых кислот, аминокислотные последовательности, пептиды, полипептиды и белки являются человеческими. Термин «ген» также предназначен для включения его вариантов.

[0050] Понятно, что конкретные признаки настоящего изобретения, которые, для ясности, описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, могут быть также представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки настоящего изобретения, которые, для краткости, описаны в контексте одного варианта осуществления, могут быть также представлены по отдельности или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к изобретению, конкретно включены в настоящее изобретение и описаны в настоящем описании, точно также, как если бы все без исключения комбинации были индивидуально и явно описаны. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов также конкретно включены в настоящее изобретение и описаны в настоящем описании, точно также, как если бы все без исключения подкомбинации были индивидуально и явно описаны в настоящем описании.

Самореплицирующаяся РНК

[0051] Как станет понятно специалисту в данной области, термин «самореплицирующаяся РНК» относится к молекуле РНК, которая содержит всю генетическую информацию, необходимую для управления своей собственной самоамплификацией или саморепликацией внутри перmissive клетки. Для управления своей собственной репликацией, срРНК, как правило, (1) кодирует полимеразу, репликазу или другие белки, которые могут взаимодействовать с вирусными или происходящими из клетки-хозяина белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами для катализа процесса амплификации РНК; и (2) содержит цис-действующие последовательности РНК, необходимые для репликации и транскрипции кодированной субгеномным репликоном РНК. Эти последовательности могут подвергаться связыванию,

в ходе процесса репликации, с кодированными ею самой белками, или не кодированными ею самой происходящими из клетки белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, или комплексами между любыми из этих компонентов. В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению, конструкция альфавирусной срРНК, в общем, содержит следующие элементы: 5'-последовательность(и) вирусной или дефектной-интерферирующей РНК, необходимые в цис-положении для репликации, последовательности, кодирующие биологически активные альфавирусные неструктурные белки (например, nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4), субгеномный промотор (сг) для субгеномной РНК (сгРНК), 3'-вирусные последовательности, необходимые в цис-положении для репликации, и необязательно, полиаденилатный хвост (поли(A)). В некоторых случаях, субгеномный промотор (сг), управляющий экспрессией гетерологичной последовательности, можно включать в конструкцию срРНК по настоящему изобретению.

[0052] Кроме того, термин срРНК, как правило, относится к молекуле положительной полярности, или «матричной» смысловой, и срРНК может иметь длину, отличную от длины любого известного, встречающегося в природе альфавируса. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, срРНК не содержит по меньшей мере часть кодирующей последовательности для одного или более альфавирусных структурных белков; и/или последовательности, кодирующие структурные гены, могут быть заменены на гетерологичные последовательности. В тех случаях, когда срРНК подлежит упаковке в рекомбинантную альфавирусную частицу, она может содержать одну или более последовательностей, так называемых сигналов упаковки, которые служат для инициации взаимодействий с альфавирусными структурными белками, приводящих к формированию частицы.

[0053] Конструкции срРНК по настоящему изобретению, как правило, имеют длину по меньшей мере приблизительно 2 т.п.о. Например, срРНК могут иметь длину по меньшей мере приблизительно 2 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 3 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 4 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 5 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 6 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 7 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 8 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 9 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 10 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 11 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 12 т.п.о. или более чем 12 т.п.о. В некоторых вариантах осуществления, срРНК могут иметь длину от приблизительно 4 т.п.о. до приблизительно 20 т.п.о., от приблизительно 4 т.п.о. до приблизительно 18 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 16 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 14 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 12 т.п.о., от приблизительно 8 т.п.о. до приблизительно 16 т.п.о., от приблизительно 9 т.п.о. до приблизительно 14 т.п.о., от приблизительно 10 т.п.о. до приблизительно 18 т.п.о., от приблизительно 11 т.п.о. до приблизительно 16 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 18 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 20 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до

приблизительно 10 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 8 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 7 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 6 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 12 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 9 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 8 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 7 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 9 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 8 т.п.о., от приблизительно 8 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о., от приблизительно 8 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о., от приблизительно 8 т.п.о. до приблизительно 9 т.п.о., от приблизительно 9 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о., от приблизительно 9 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о. или от приблизительно 10 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о. В некоторых вариантах осуществления, срРНК могут иметь длину от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 14 т.п.о. В некоторых вариантах осуществления, срРНК могут иметь длину приблизительно от 6 т.п.о. до приблизительно 16 т.п.о.

Вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV)

[0054] Вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV) представляет собой переносимый комарами вирус, принадлежащий к роду *Alphavirus*, который включает группу генетически, структурно и серологически родственных вирусов семейства *Togaviridae*. В настоящее время, род альфавирусов включает, среди прочих, вирус Синдбис (SINV), вирус леса Семлики (SFV), вирус реки Росс (RRV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) и вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), которые все являются близко родственными и являются способными инфицировать различных позвоночных, таких как млекопитающие, грызуны, рыбы, виды птиц и более крупные млекопитающие, такие как человек и лошади, так же как беспозвоночных, таких как насекомые. В частности, EEEV были широко исследованы, и жизненный цикл, способ репликации и т.д., этих вирусов хорошо охарактеризованы. Больше информации в этом отношении можно обнаружить, например, в Corrin T. et al., *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, Vol. 21, No. 5, 2021. Кроме того, показано, что альфавирусы реплицируются очень эффективно в клетках животных, что делает их ценными в качестве векторов для продукции белков и нуклеиновых кислот в таких клетках. Перенос между видами и индивидуумами происходит в основном через комаров, что делает альфавирусы вносящими вклад в коллекцию арбовирусов - или переносимых членистоногими вирусов.

[0055] Каждый из этих альфавирусов имеет одноцепочечный РНК-геном положительной полярности, заключенный в нуклеокапсид, окруженный оболочкой, содержащей вирусные белки шипика. Частицы *Alphavirus* являются оболочечными, проявляют тенденцию являться сферическими (хотя немного плеоморфными) и имеют изометрический нуклеокапсид. Геном *Alphavirus* представляет собой одноцепочечную РНК положительной полярности длиной приблизительно 11-12 т.п.о., содержащую 5'-кэп,

3'-поли-А-хвост, и две открытые рамки считывания, где первая рамка кодирует неструктурные белки с ферментной функцией, и вторая рамка кодирует вирусные структурные белки (например, капсидный белок СР, гликопротеин Е1, гликопротеин Е2, белок Е3 и белок 6К). Например, EEEV имеет одноцепочный, положительный смысловой РНК-геном приблизительно 11,7 т.п.о., который является кэпированным на 5'-конце и полиаденилированным на 3'-конце. EEEV переносится посредством укуса инфицированного комара, и наиболее обширный перенос происходит в низинных участках с деревьями с твердой древесиной и заболачиваниями, благоприятных для развития личинок комаров. Как можно предположить по его названию, EEEV может инфицировать лошадей, вызывая лихорадку, изменения поведения и другие симптомы энцефалита. Дикие птицы являются основным резервуаром для EEEV. Однако, инфекция часто является смертельной для лошадей.

[0056] Две трети с 5'-конца генома альфавируса кодируют ряд неструктурных белков, необходимых для транскрипции и репликации вирусной РНК. Эти белки транслируются напрямую с РНК и совместно с клеточными белками формируют РНК-зависимую РНК-полимеразу, необходимую для репликации вирусного генома и транскрипции субгеномной РНК. Четыре неструктурных белка (nsP1-4) продуцируются в форме одного полибелка и составляют аппарат репликации вируса. Процессинг полибелка происходит строго регулируемым образом, где расщепление на стыке P2/3 влияет на использование РНК-матрицы в ходе репликации генома. Этот участок локализован в основании узкой щели и не является легко доступным. После расщепления, nsP3 образует кольцевую структуру, которая окружает nsP2. Эти два белка имеют обширную поверхность контакта. Мутации в nsP2, образующие нецитопатические вирусы или термочувствительные фенотипы, кластеризуются в области поверхности контакта P2/P3. Мутации P3 напротив локализации нецитопатических мутаций nsP2 предотвращают эффективное расщепление P2/3. Это, в свою очередь, может влиять на инфекционность РНК, изменяя уровни продукции вирусной РНК.

[0057] Треть с 3'-конца генома содержит субгеномную РНК, которая служит в качестве матрицы для трансляции всех структурных белков, необходимых для формирования вирусных частиц: корового нуклеокапсидного белка С, и оболочечных белков Р62 и Е1, которые ассоциируют в форме гетеродимера. Заякоренные в вирусной мембране поверхностные гликопротеины являются ответственными за узнавание рецептором и вход в клетки-мишени посредством слияния мембран. Субгеномная РНК транскрибируется с субгеномного промотора р26S, присутствующего на 3'-конце последовательности РНК, кодирующей белок nsP4. Протеолитическое созревание Р62 до Е2 и Е3 вызывает изменение вирусной поверхности. Совместно, гликопротеиновые «шипики» Е1, Е2, и иногда Е3, формируют димер Е1/Е2 или тример Е1/Е2/Е3, где Е2 простирается от центра к вершинам, Е1 заполняет пространство между вершинами, и Е3, если присутствует, находится на дистальном конце шипика. При подвергании вируса воздействию кислотности эндосомы, Е1 диссоциирует от Е2 с формированием

гомотримера E1, который является необходимым для стадии слияния, чтобы свести вместе клеточные и вирусные мембраны. Альфавирусный гликопротеин E1 представляет собой вирусный белок слияния класса II, который является структурно отличным от белков слияния класса I, обнаруженных в вирусе гриппа и HIV. Гликопротеин E2 функционирует для взаимодействия с нуклеокапсидом через свой цитоплазматический домен, в то время как его эктодомен является ответственным за связывание с клеточным рецептором. Большинство альфавирусов теряют периферический белок E3, в то время как у вирусов Семлики он остается ассоциированным с вирусной поверхностью.

[0058] Опубликовано, что репликация альфавируса происходит на мембранных поверхностях внутри клетки-хозяина. На первой стадии инфекционного цикла, 5'-конец геномной РНК транслируется в полибелок (nsP1-4) с активностью РНК-полимеразы, образующий отрицательную цепь, комплементарную геномной РНК. На второй стадии, отрицательную цепь используют в качестве матрицы для продукции двух РНК, соответственно: (1) положительной геномной РНК, соответствующей геному вторичных вирусов, образующей, посредством трансляции, другие белки nsP и действующей в качестве генома для вируса; и (2) субгеномной РНК, кодирующей структурные белки вируса, формирующие инфекционные частицы. Соотношение положительной геномной РНК/субгеномной РНК регулируется посредством протеолитического ауторасщепления полибелка до nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4. На практике, экспрессия вирусных генов происходит в двух фазах. В первой фазе, в основном происходит синтез положительных геномных цепей и отрицательных цепей. В ходе второй фазы, синтез субгеномной РНК является практически исключительным, таким образом, приводя к продукции большого количества структурного белка.

Рецептор эстрогенов 1 (ESR1)

[0059] Эстрогены представляют собой стероидные гормоны, функционирующие в качестве первичного женского полового гормона. Рецептор эстрогенов 1 (ESR1) кодирует рецептор эстрогенов альфа (ER α), и рецептор эстрогенов 2 (ESR2) кодирует рецептор эстрогенов бета (ER β). Биологические эффекты эстрогена по большей части опосредованы его связыванием и активацией ER α и ER β , которые являются членами суперсемейства ядерных рецепторов факторов транскрипции, характеризующихся высоко консервативными ДНК- и лигандсвязывающими доменами. Предшествующие исследования позволяют предполагать, что эстроген является ассоциированным с образованием опухолей молочной железы, онкогенезом яичников и эндометрия. Приблизительно 70% из всех случаев рака молочной железы классифицируют как положительный по рецептору эстрогенов (ER+); зависимый от конститутивной передачи сигналов рецептора эстрогенов. Несмотря на то, что различные классы эндокринной (антиэстрогенной) терапии (включая избирательные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERMS), средства для понижающей регуляции и ингибиторы ароматазы (AI)) являются эффективными видами лечения для этих злокачественных опухолей в условиях вспомогательной терапии, приблизительно 50% женщин могут, в конечном счете,

испытывать рецидив и умирать от метастазирующего ER+ заболевания. Таким образом, несмотря на появление новых видов терапии (таких как AI), остается неизменной частота рецидивов при ER+ раке молочной железы, в частности, в случаях, когда возникло метастазирование. Важно, что у всех пациентов, у которых развивается метастазирующее ER+ заболевание, может происходить прогрессирование до устойчивого к эндокринной терапии заболевания. На этой стадии, не существует излечивающего лечения для ER+ рака молочной железы.

Эпидермальный фактор роста 2 человека (HER2)

[0060] Семейство рецепторов эпидермального фактора роста человека (HER), состоящее из HER1 (также известного как EGFR), HER2, HER3 и HER4, управляет прогрессированием многих эпителиальных злокачественных новообразований (Roskoski R., Jr The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 2014; 79:34-74). HER2, известный как Erb-B2 (гомолог 2 эритробластического онкогена B), CD340 или p185, представляет собой онкобелок 185 кДа, кодируемый геном ERBB2. Он состоит из трех доменов, включая внутриклеточный домен со свойством тирозинкиназы, трансмембранный домен и внеклеточный домен. HER2 является предпочтительным партнером для димеризации для других белков HER, таких как HER3, с которым он гетеродимеризуется. Димеризация с HER2 приводит к аутофосфорилированию остатков тирозина в цитоплазматическом домене рецепторов и запускает разнообразное множество путей передачи сигналов. HER2 имеет функции стимуляции опухолей при некоторых злокачественных опухолях, и амплификация или сверхэкспрессия HER2 является ассоциированной с увеличением количества рецидивов заболевания и плохим прогнозом. Лечение случаев рака молочной железы с амплификацией HER2 с использованием нацеленных на HER2 ингибиторов тирозинкиназы (TKI) приводит к увеличению экспрессии HER3 и нижестоящей передачи сигналов, что приводит к терапевтической устойчивости.

Эпидермальный фактор роста 3 человека (HER3)

[0061] HER3, сверхэкспрессированный при раке молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, и яичника, и меланоме, является ассоциированным с плохим прогнозом (Takikita M et al., Membranous expression of Her3 is associated with a decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 2011; 9:126; Chiu et al, HER-3 overexpression is prognostic of reduced breast cancer survival: A study of 4046 patients. *Ann Surg* 2010; 251(6):1107-16; Hayashi et al., Hayashi et al., High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(23):7843-9; Giltnane et al, Quantitative multiplexed analysis of ErbB family coexpression for primary breast cancer prognosis in a large retrospective cohort. *Cancer* 2009; Begnami et al., Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *J Clin Oncol* 2011; 29(22):3030-6; Reschke et al., HER3 is a determinant for poor prognosis in melanoma, *Clin Cancer Res* 2008; 14(16):5188-97; Lee et al., Assessment of Her-1, Her-2, and Her-3 expression and Her-2 amplification in

advanced stage ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2005), однако, не был признанной терапевтической мишенью, поскольку он лишен каталитической активности киназы и не является трансформирующим сам по себе. Однако, считают, что HER3 функционирует как передающий сигналы субстрат для других белков HER, с которыми он гетеродимеризуется (Musgrove et al., Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(9):631-43; Tovey et al., Can molecular markers predict when to implement treatment with aromatase inhibitors in invasive breast cancer? *Clin Cancer Res* 2005; 11(13):4835-42.

PIK3CA

[0062] Патологическая активация пути PI3K присутствует среди наиболее частых событий передачи сигналов, ассоциированных с клеточной трансформацией, злокачественной опухолью и метастазированием (Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; Mollon L, Aguilar A, Anderson E, et al. A systematic literature review of the prevalence of PIK3CA mutations and mutation hotspots in HR+/HER2-metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2018;78:Suppl 13:1207-1207. Abstract; Goncalves MD, Hopkins BD, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-kinase, growth disorders, and cancer. *N Engl J Med* 2018;379:2052-2062). Примером этого являются частые активирующие мутации в *PIK3CA* и потеря функциональности *PTEN* в распространенных злокачественных опухолях, таких как злокачественные опухоли молочной железы, ободочной кишки и яичников. Приблизительно 40% пациентов с положительным по HR, отрицательным по HER2 раком молочной железы имеют активирующие мутации в гене *PIK3CA*, индуцирующие гиперактивацию изоформы альфа (p110 α) фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K).

КОМПОЗИЦИИ ПО НАСТОЯЩЕМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

[0063] Как более подробно описано ниже, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, содержащим последовательности, кодирующие модифицированные геном или срРНК альфавируса вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), где по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного генома или срРНК EEEV, была заменена на кодирующую последовательность для полипептидной конструкции, содержащей а) кодирующую последовательность для рецептора эстрогенов 1 (ESR1) или его варианта; б) кодирующую последовательность для PI3K или его варианта; в) кодирующую последовательность для HER2 или его варианта и д) кодирующую последовательность для HER3 или его варианта. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам и культурам клеток, которые были сконструированы для включения конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании.

Конструкции нуклеиновых кислот

[0064] Как более подробно описано ниже, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, включающим последовательность

нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированные геном или срРНК вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), где по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного генома или срРНК EEEV, была заменена на кодирующую последовательность для полипептидной конструкции, содержащей а) кодирующую последовательность для ESR1 или его варианта; б) кодирующую последовательность для P13K или его варианта; в) кодирующую последовательность для HER2 или его варианта и d) кодирующую последовательность для HER3 или его варианта. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая конструкцию нуклеиновой кислоты, может являться функционально связанной с элементами, например, помещенной под контроль элементов, необходимых для экспрессии (например, промоторных последовательностей), которые позволяют экспрессию конструкции срРНК в клетке-хозяине, у субъекта или в бесклеточной системе экспрессии *ex-vivo*.

[0065] Термины «молекула нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» использованы взаимозаменяемо в настоящем описании, и относятся к молекулам как РНК, так и ДНК, включая молекулы нуклеиновых кислот, содержащие кДНК, геномную ДНК, синтетическую ДНК, и молекулы ДНК или РНК, содержащие аналоги нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты может являться двухцепочечной или одноцепочечной (например, представлять собой смысловую цепь или антисмысловую цепь). Молекула нуклеиновой кислоты может содержать редкие или модифицированные нуклеотиды. Термины «полинуклеотидная последовательность» и «последовательность нуклеиновой кислоты», в рамках изобретения, взаимозаменяемо относятся к последовательности полинуклеотида. Номенклатура для нуклеотидных оснований, как указано в 37 CFR §1.822, использована в настоящем описании.

[0066] Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут иметь любую длину, включая, например, между приблизительно 1,5 т.п.о. и приблизительно 50 т.п.о., между приблизительно 5 т.п.о. и приблизительно 40 т.п.о., между приблизительно 5 т.п.о. и приблизительно 30 т.п.о., между приблизительно 5 т.п.о. и приблизительно 20 т.п.о., или между приблизительно 10 т.п.о. и приблизительно 50 т.п.о., например, между приблизительно 15 т.п.о. и 30 т.п.о., между приблизительно 20 т.п.о. и приблизительно 50 т.п.о., между приблизительно 20 т.п.о. и приблизительно 40 т.п.о., приблизительно 5 т.п.о. и приблизительно 25 т.п.о., или приблизительно 30 т.п.о. и приблизительно 50 т.п.о.

[0067] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированные геном или срРНК EEEV, где модифицированные геном или срРНК EEEV лишены по меньшей мере части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более структурных белков, из немодифицированного генома или срРНК EEEV, например, модифицированные геном или срРНК EEEV не включают по

меньшей мере часть кодирующей последовательности для одного или более из структурных белков CP, E1, E2, E3 и 6K EEEV. Как вирулентные, так и невирулентные штаммы EEEV являются подходящими. Неограничивающие примеры штаммов EEEV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают EEEV 792138, 783372, BeAn5122, BeAr300851, BeAr436087, C-49, FL91-4679, FL93-939, GML903836, MP-9, PE6 и V105-00210. Дополнительные подходящие штаммы EEEV включают, но без ограничения, штаммы, описанные на веб-сайте Virus Pathogen Resource (ViPR; который является публично доступным на www.viprbrc.org/brc/vipr_genome_search.spg?method=SubmitForm&blockId=868&decorator=toga). В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV происходят из EEEV штамма FL93-939.

[0068] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV лишены по меньшей мере части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков CP, E1, E2, E3 и 6K, из немодифицированного генома или срРНК EEEV. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV лишены части или полной последовательности, кодирующей CP. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV лишены части или полной последовательности, кодирующей E1. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV лишены части или полной последовательности, кодирующей E2. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV лишены части или полной последовательности, кодирующей E3. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV лишены части или полной последовательности, кодирующей 6K. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV лишены части или полной последовательности, кодирующей комбинацию CP, E1, E2, E3 и 6K. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным геному или срРНК EEEV, в которых кодирующая последовательность для неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, из немодифицированного генома или срРНК EEEV присутствует, однако, по меньшей мере часть последовательности или полная последовательность, кодирующая один или более структурных белков (например, CP, E1, E2, E3 и 6K), из генома или срРНК EEEV отсутствует. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным геному или срРНК EEEV, в которых кодирующая последовательность для неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 из немодифицированного генома или срРНК EEEV присутствует, однако по меньшей мере часть последовательности или полная последовательность, кодирующая один или более структурных белков (например, CP, E1, E2, E3, и 6K) из генома или срРНК EEEV

отсутствует.

[0069] В некоторых вариантах осуществления, модифицированные вирусный геном или срРНК лишены значительной части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков. Специалисту в данной области понятно, что значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующая вирусный структурный полипептид, может включать достаточную часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный структурный полипептид, чтобы позволять предположительную идентификацию этого полипептида, либо посредством оценки последовательности вручную специалистом в данной области, либо посредством компьютерно-автоматизированного сравнения и идентификации последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BLAST (см., например, в «Basic Local Alignment Search Tool»; Altschul SF *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1993). Соответственно, значительная часть нуклеотидной последовательности содержит достаточную часть последовательности, чтобы позволять специфическую идентификацию и/или выделение фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащей эту последовательность. Например, значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере приблизительно 20%, например, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты. Как описано выше, настоящее изобретение относится к молекулам и конструкциям нуклеиновых кислот, лишенных частичных или полных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один или более вирусных структурных белков. Специалист в данной области, пользуясь преимуществом последовательностей, как описано в настоящем описании, может легко использовать все или значительную часть описанных последовательностей для композиций и способов по настоящему изобретению. Соответственно, настоящая заявка содержит полные последовательности, как описано в настоящем описании, например, последовательности, приведенные в сопутствующем списке последовательностей, так же как значительные части этих последовательностей, как определено выше.

[0070] В некоторых вариантах осуществления, модифицированные геном или срРНК EEEV лишены полной последовательности, кодирующей вирусные структурные белки, например, модифицированные геном или срРНК EEEV не включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую структурные белки из вирусных немодифицированных генома или срРНК.

[0071] Конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению дополнительно включают кодирующую последовательность для полипептидной конструкции, которая заменяет по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированных генома или срРНК EEEV. В принципе, конструкции нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, могут, в общем, включать любое количество кодирующих последовательностей

для полипептидной конструкции. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, могут включать по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть кодирующих последовательностей для полипептидных конструкций. Кодирующая последовательность для полипептидной конструкции может представлять собой конструкцию генетического материала, которая содержит кодирующие последовательности и достаточно регуляторной информации, чтобы управлять надлежащей транскрипцией и/или трансляцией кодирующих последовательностей в клетке, *in vivo* и/или *ex vivo*. Кодирующая последовательность для полипептидной конструкции может быть вставлена в вектор для нацеливания на желательную клетку-хозяина и/или субъекта. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, термин «кодирующая последовательность для полипептидной конструкции» может быть использован взаимозаменяемо с термином «экспрессирующая конструкция». В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции может представлять собой конструкцию нуклеиновой кислоты, которая включает ген, кодирующий белок или функциональную РНК, функционально связанный с регуляторными элементами, например, такими как промотор и/или сигнал терминации, и необязательно, любую из или комбинацию других последовательностей нуклеиновых кислот, влияющих на транскрипцию или трансляцию гена.

[0072] Конструкции нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, включают кодирующие последовательности для ESR1 или его варианта, кодирующую последовательность для PI3K или его варианта, кодирующую последовательность для HER2 или его варианта и кодирующую последовательность для HER3 или его варианта, которые кодируют полипептиды, содержащие эпитопы, которые являются способными вызывать иммунный ответ. Варианты ESR1, PI3K, HER2 и HER3 могут включать кодирующие последовательности для полипептидов, имеющих аминокислотную последовательность, которая является такой же или в основном такой же, как последовательность эталонного белка (например, ESR1, PI3K, HER2 или HER3), за исключением наличия по меньшей мере одной аминокислоты, модифицированной, например, делетированной, вставленной или замененной, соответственно. Замена аминокислоты может представлять собой консервативную аминокислотную замену, предпочтительно, не являющегося необходимым аминокислотного остатка в белке. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, имеющий сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, известны в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин,

цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Вариант белка может иметь аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95% или 99%, предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 90%, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 95%, идентичную аминокислотной последовательности белка. Предпочтительно, вариант представляет собой функциональный вариант белка, который сохраняет такую же функцию, что и белок. Термин «вариант», при использовании применительно к последовательности нуклеиновой кислоты, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается на один или более нуклеотидов от другой, обычно, родственной последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, термин «вариант» может относиться к изменению одного или более нуклеотидов эталонной нуклеиновой кислоты, которое включает вставку одного или более новых нуклеотидов, делецию одного или более нуклеотидов и замену одного или более существующих нуклеотидов. Вариант может также включать точечную мутацию, множественную мутацию, однонуклеотидный полиморфизм (SNP), делецию, вставку и транслокацию. Таким образом, варианты кодирующих последовательностей, описанных в настоящем описании, включают нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые могут представлять собой, например, полноразмерные, мутантные, укороченные, инактивированные, пептиды/эпитопы или их комбинации из ESR1, PI3K, HER2 и/или HER3.

[0073] Полноразмерная аминокислотная последовательность ESR1 указана в SEQ ID NO: 1, следующим образом:

```
MTMTLHTKASGMALLHQIQGNELEPLNRPQLKIPLERPLGDEVYLDSSKPAVYNY
PEGAAAYEFNAAAAANAQVYGQTGLPYGPGSEAAAFGSNGLGGFPPLNSVSPSPLMLLH
PPPQLSPFLQPHGQQVPYYLENESGYTVREAGPPAFYRPNSDNRRQGGRERLASTNDK
GSMAMESAKETRYCAVCNDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPATNQC
TIDKNRRKSCQACRLRKCYEVGMMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGS
GDMRAANLWPSPLMIKRSKKNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASM
MGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLLECAWLEILMIGLVWRSMENP
GKLLFAPNLLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV
YTFLSSTLKSLEEKDNIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQHQRLAQLLLILSHIRHMS
NKGMEHLYSMKCKNVPLYDLLLEMLDAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSS
HSLQKYIITGAEFGPATV
```

[0074] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для ESR1 в конструкциях нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ESR1, имеющую по меньшей

мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для ESR1 кодирует меньшие части аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Эти меньшие части могут включать по меньшей мере 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30 или более аминокислот из SEQ ID NO: 1. Иллюстративные части ESR1, которые можно использовать в конструкциях, описанных в настоящем описании, включают части в таблице 1 ниже:

Таблица 1.

Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
MEHLYSMKCKNVVPLCDLLEMLDAHRLHAP	11
PGFVDLTLHDQVHLLQCAWLEILMIGLVWRS	12
AANLWPSPLMIKRSKRNSLALSLTADQMVSA	13
MEHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRLHAP	14
MEHLYSMKCKNVVPLYGLLEMLDAHRLHAP	15
MEHLYSMKCKNVVPLNDLLEMLDAHRLHAP	16

[0075] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую часть ESR1, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11-16.

[0076] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции в нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем описании, содержит одно или более молекулярных изменений. Иллюстративные типы молекулярных изменений в кодирующих последовательностях, описанных в настоящем описании, могут представлять собой одно или более из делеций, замен, вставок, дупликаций, мутаций, вариантов сдвига рамки считывания, вариантов сплайсинга и комбинаций любых из них.

[0077] В некоторых вариантах осуществления, одно или более молекулярных изменений введены в конфигурацию множества изменяющих кассет. В некоторых вариантах осуществления, множество изменяющих кассет аранжированы в тандеме вдоль длины кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления, длину и аминокислотный состав изменяющих кассет можно оптимизировать для достижения желательных активности или свойства кодирующей последовательности или ее варианта. В некоторых вариантах осуществления, изменяющая кассета из множества изменяющих кассет включает от приблизительно 2 до приблизительно 50 аминокислотных остатков, например, от приблизительно 5 до приблизительно 45, от приблизительно 10 до

приблизительно 40, от приблизительно 15 до приблизительно 30, от приблизительно 20 до приблизительно 50, от приблизительно 2 до приблизительно 30, от приблизительно 3 до приблизительно 25, от приблизительно 4 до приблизительно 20, от приблизительно 5 до приблизительно 15, от приблизительно 6 до приблизительно 10, от приблизительно 3 до приблизительно 15, от приблизительно 4 до приблизительно 10, от приблизительно 5 до приблизительно 30, от приблизительно 2 до приблизительно 5, от приблизительно 3 до приблизительно 5, от приблизительно 4 до приблизительно 8 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, изменяющая кассета из множества изменяющих кассет включает 31 аминокислотных остатки. В некоторых вариантах осуществления, изменяющая кассета из множества изменяющих кассет включает одно, два, три, четыре, пять или более молекулярных изменений.

[0078] В некоторых вариантах осуществления, вариант ESR1, описанный в настоящем описании, содержит одно или более молекулярных изменений, стимулирующих независимые от лиганда виды активности рецептора. Эти варианты представляют собой активирующие мутации в лигандсвязывающем домене ESR1, которые делают рецептор эстрогенов нечувствительным к гормональной терапии. В некоторых вариантах осуществления, одно или более молекулярных изменений содержит активирующую мутацию, выбранную из группы, состоящей из K303R, E380Q, Y537C, Y537S, Y537N и D538G в положениях, соответствующих аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

[0079] В некоторых вариантах осуществления, одно или более молекулярных изменений являются функционально связанными друг с другом посредством линкера. Линкер может представлять собой пептидный линкер, соединяющий две соседних изменяющих кассеты, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, длину и аминокислотный состав пептидной линкерной последовательности можно оптимизировать для изменения ориентации, гибкости и/или близости изменяющих кассет друг относительно друга для достижения желательных активности или свойства ESR1 или варианта ESR1.

[0080] В некоторых вариантах осуществления, полипептидный линкер включает одноцепочечную полипептидную последовательность, содержащую от приблизительно 1 до приблизительно 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 включает приблизительно 2-30, приблизительно 3-25, приблизительно 4-20, приблизительно 5-15, приблизительно 6-10, приблизительно 3-15, приблизительно 4-10, приблизительно 5-30, приблизительно 2-5, приблизительно 3-5, приблизительно 4-8 аминокислотных остатков.

[0081] В некоторых вариантах осуществления, длину и аминокислотный состав линкерной полипептидной последовательности можно оптимизировать для изменения ориентации, гибкости и/или близости изменяющих кассет друг относительно друга для достижения желательных активности или свойства кодированного полипептида. В

некоторых вариантах осуществления, ориентацию, гибкость и/или близость изменяющих кассет друг относительно друга можно изменять в качестве инструмента «настройки» для достижения эффекта настройки, который может усиливать или уменьшать активность кодированного полипептида или кодированного варианта полипептида. В конкретных вариантах осуществления, линкер содержит только остатки глицина и/или серина (например, линкер глицин-серин). 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 Ser; Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly; (Gly Gly Gly Gly Ser)_n, где n представляет собой целое число один или более; и (Ser Gly Gly Gly Gly)_n, где n представляет собой целое число один или более. В некоторых вариантах осуществления, полипептидные линкеры модифицируют таким образом, чтобы аминокислотная последовательность Gly Ser Gly (GSG) (которая встречается на стыке традиционных линкерных полипептидных повторов Gly/Ser) не присутствовала. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-29.

[0082] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции из конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании, кодирует вариант ESR1, содержащий части аминокислотной последовательности ESR1, функционально связанные с использованием линкеров GGGGS (подчеркнуты). Иллюстративная аминокислотная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 2, следующим образом:

MEHLYSMKCKNVVPLCDLLEMLDAHRLHAPGGGGSPGFVDLTLHDQVHLLQ
 CAWLEILMIGLVWRSGGGGSAANLWPSPLMIKRSKRNSLALSILTADQMVSAGGGGSM
 EHLYSMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRLHAPGGGGSMEHLYSMKCKNVVPLYGLLLEML
 DAHRLHAPGGGGSMEHLYSMKCKNVVPLNDLLEMLDAHRLHAPGGGG

Иллюстративная схема этого типа конфигурации показана на ФИГ. 4.

[0083] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ESR1, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2.

[0084] Как описано выше, конструкции нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, также включают кодирующие последовательности для PI3K или его варианта.

[0085] Полноразмерная аминокислотная последовательность PI3K указана в SEQ ID NO: 3, следующим образом:

MPPRPSSGELWGIHLMPPRILVECLLPNGMIVTLECLREATLITIKHELFKEARKYP
 LHQLLQDESSYIFVSVTQEAEREFFDETRRLCDLRLFQPFVKVIEPVGNREEKILNREIGF

AIGMPVCEFDMVKDPEVQDFRRNILNVCKEAVDLRDLNSPHSRAMYVYPPNVESSELP
 KHIYNKLDKGQIIVVIWVIVSPNNDKQKYTLKINHDCVPEQVIAEAIRKKTRSMLLSSEQ
 LKLCVLEYQGKYILKVCGCDEYFLEKYPLSQYKYIRSCIMLGRMPNMLMAKESLYSQL
 PMDCFTMPYSRRISTATPYMNGETSTKSLWVINSALRIKILCATYVNVNIRDIDKIYVRT
 GIYHGGEPLCDNVNTQRVPCSNPRWNEWLNYDIYIPDLPRAARLCLSICSVKGRKGAKE
 EHCPLAWGNINLFDYTDTLVSGKMALNLWPVPHGLEDLLNPIGVTGSNPNKETPCLELE
 FDFWSSVVKFPDMSVIEEHANWSVSREAGFSYSHAGLSNRLARDNELRENDKEQLKAIS
 TRDPLSEITEQEKDFLWSHRHYCVTIPEILPKLLLSVKWNSRDEVAQMYCLVKDWPPIKP
 EQAMELLDCNYPDPMVIRGFAVRCLEKYLTDDKLSQYLIQLVQVLKYEQYLDNLLVRF
 LKKALTNQRIGHFFFHWHLKSEMHNKTVSQRFGLLLESYCRACGMYLKHLNRQVEAME
 KLINLTDILKQEKKDETQKVQMKFLVEQMRRPDFMDALQGFLSPLNPAHQLGNLRLEE
 CRIMSSAKRPLWLNWENPDIMSELLFQNEIIFKNGDDLQDMLTLQIIRIMENIWQNQG
 LDRMLPYGCLSIGDCVGLIEVVRNSHTIMQIQCKGGLK GALQFNSHTLHQWLKDKNK
 GEIYDAAIDLFRSCAGYCVATFILGIGDRHNSNIMVKDDGQLFHIDFGHFLDHKKKFG
 YKRERVPFVLTQDFLIVISKGAQECTKTREFERFQEMCYKAYLAIRQHANLFINLFSMML
 GSGMPELQSFDDIAYIRKTLALDKTEQEALEYFMKQMNDANHHGGWTTKMDWIFHTIKQ
 HALN

[0086] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для РІЗК в конструкциях нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую РІЗК, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для РІЗК кодирует меньшие части аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3. Эти меньшие части могут включать по меньшей мере 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более аминокислот из SEQ ID NO: 3. Иллюстративные части РІЗК, которые можно использовать в конструкциях, описанных в настоящем описании, включают части в таблице 2 ниже:

Таблица 2.

Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
MDKEQLKAISTRDPLSKITEQEKDFLWSHRHY	17
EQEALEYFMKQMNDALHGGWTTKMDWIFHTIK	18
QLKAISTRDPLSEITKQEKDFLWSHRHYCVT	19
EQEALEYFMKQMNDARHGGWTTKMDWIFHTIK	20

[0087] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую часть РІЗК, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17-20.

[0088] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции в нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем описании, кодирует варианты РІЗК, содержащие одно или более молекулярных изменений, стимулирующих независимые от лиганда виды активности рецептора. Эти варианты представляют собой активирующие мутации в лигандсвязывающем домене РІЗК. В некоторых вариантах осуществления, одно или более молекулярных изменений содержит активирующую мутацию, выбранную из группы, состоящей из E542K, E545K, H1047L и H1047R, из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

[0089] В некоторых вариантах осуществления, одно или более молекулярных изменений являются функционально связанными друг с другом посредством линкера. Линкеры, подходящие для использования в полипептидных конструкциях, описанных в настоящем описании, описаны выше. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-29.

[0090] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции из конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании, кодирует вариант РІЗК, содержащий части аминокислотной последовательности РІЗК, функционально связанные посредством линкеров GGGGS (подчеркнуты). Иллюстративная аминокислотная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 4, следующим образом:

MDKEQLKAISTRDPLSKITEQEKDFLWSHRHYGGGGSEQEALYFMKQMNDAL
HGGWTTKMDWIFHTIKGGGGSQLKAISTRDPLSEITKQEKDFLWSHRHYCVTGGGGSE
QEALYFMKQMNDARHGGWTTKMDWIFHTIKGGGGS

[0091] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую РІЗК, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

[0092] Как описано выше, конструкции нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, также включают кодирующие последовательности для HER2 или его варианта.

[0093] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции в нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем описании, кодирует укороченный вариант HER2, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен HER2, как описано в Crosby et al., «Vaccine-Induced Memory CD8+ T Cells Provide Clinical Benefit in HER2 Expressing Breast Cancer: A Mouse to Human

Translational Study», *Clinical Cancer Research* 25(9):2725-2736 (2019).

[0094] В некоторых вариантах осуществления, укороченный вариант HER2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, следующим образом:

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGC
 QVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTTQLFEDNY
 ALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDI
 FHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGP
 LPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRY
 TFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGM
 EHLREVRVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITG
 YLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIH
 HNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPT
 QCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQC
 VACAHYKDPFCVARCPGKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSPLTSIISAVVGI
 LLVVVLGVVFGILIKRRQKIRK

[0095] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант HER2, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5.

[0096] Как описано выше, конструкции нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, также включают кодирующие последовательности для HER3 или его варианта.

[0097] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции в нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем описании, кодирует неактивный в качестве киназы вариант HER3, как описано в Osada et al., «Vaccination Targeting Human HER3 Alters the Phenotype of Infiltrating T cells and Responses to Immune Checkpoint Inhibition», *Oncoimmunology* 6(6):e1315495 (2017).

[0098] В некоторых вариантах осуществления, неактивный в качестве киназы вариант HER3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, следующим образом:

MRANDALQVLGLLFSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLY
 ERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVY
 DGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDR
 DAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCH
 DECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTQLEPNPHTKYQYGGVC
 VASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTV
 DSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPP
 HMHNFSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYH

HSLNWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDP LCSSGGCWGPGPGQCLSCRNY
 SRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRD
 GPHCVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPELQDCLGQTLVLIGKT
 HLTMAITVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEKANK
 VLARIFKETELRKLKVLGSGVFGTVHKGVWIPPEGESIKIPVCIKVIEDKSGRQSFQAVTDH
 MLAIGSLDHAHIVRLLGLCPGSSLQLVTQYLPLGSLLDHVRQHRGALGPQLLLNWGVQI
 AKGMYYLEEHGMVHRNLAARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPI
 KWMALESIHFGKYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAEPYAGLRLAEVPDLLEKGERLAQ
 PQICTIDVYMVMVKCWMIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPEP
 HGLTNKKLEEVELEPELDDLDDLEAEEDNLATTTLGSALSPLVGT LNRPRGSQSLLSPSS
 GYMPMNQGNLGESCQESAVSGSSERCPRPVSLHPMPRGCLASESSEGHVTGSEAELEK
 VSMCRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSLTPVTPLSPPGLEEEDVNGYVMPDTHLKGTPS
 SREGTLSSVGLSSVLGTEEEDEDEEYEMNRRRRHSPPHPPRPSLEELGYEYMDVGS DL
 SASLGSTQSCPLHPVPIMPTAGTTPDEDYEMNRQRDGGGPGGDYAAMGACPASEQGY
 EEMRAFQGPQHAPHVHYARLKTLSLEATDSAFDNPDYWHSRLFPKANAQRT

[0099] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант HER3, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6.

[0100] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для ESR1 или его варианта, P13K или его варианта, HER2 или его варианта и HER3 или его варианта включает кодирующую последовательность для одиночного полипептида (например, моногенная конструкция). В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для ESR1 или его варианта, P13K или его варианта, HER2 или его варианта и HER3 или его варианта включает кодирующие последовательности для множества полипептидов, например, мультигенные (например, бигенные или триигенные). В некоторых вариантах осуществления, каждая из кодирующих последовательностей ESR1 или его варианта, P13K или его варианта, HER2 или его варианта и HER3 или его варианта является функционально связанной с отдельной промоторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, кодирующие последовательности ESR1 или его варианта, P13K или его варианта, HER2 или его варианта и HER3 или его варианта являются функционально связанными друг с другом в пределах одной открытой рамки считывания (например, в полицистронной ORF). В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность полицистронной ORF является функционально связанной с промоторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из промоторных последовательностей представляет собой субгеномный (сг) промотор. В некоторых вариантах осуществления, сг промотор представляет собой геномный

промотор 26S.

[0101] В некоторых вариантах осуществления, кодирующие последовательности для ESR1 или его варианта, PI3K или его варианта, HER2 или его варианта и HER3 или его варианта, могут являться связанными друг с другом напрямую или опосредованно (например, через одну или более соединительных последовательностей). Например, в некоторых вариантах осуществления, кодирующие последовательности могут являться напрямую связанными друг с другом, например, смежными друг с другом. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере две (например, 2, 3, 4, или 5) из кодирующих последовательностей являются функционально связанными друг с другом посредством одной или более соединительных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, длину и аминокислотный состав последовательностей соединителя можно оптимизировать для изменения ориентации, гибкости и/или близости полипептидов друг относительно друга для достижения желательных активности или свойства кодированного белка. В некоторых вариантах осуществления, соединительная последовательность из множества соединительных последовательностей включает одну или более кодирующих последовательностей для аутопротеолитических пептидных последовательностей. В общем, любой участок протеолитического расщепления, известный в данной области, может быть встроен в молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению и может представлять собой, например, последовательности протеолитического расщепления, которые расщепляются после продукции посредством протеазы. Дополнительные пригодные участки протеолитического расщепления также включают последовательности протеолитического расщепления, которые можно расщеплять после добавления внешней протеазы. в рамках изобретения, термин «аутопротеолитический пептид» относится к «саморасщепляющемуся» пептиду, который имеет аутопротеолитическую активность и является способным к собственному отщеплению от большей полипептидной группы. Впервые идентифицированные в вирусе ящура (FMDV), члене группы пикорнавируса, впоследствии были идентифицированы несколько аутопротеолитических пептидов, например, такие как «2A-подобные» пептиды из вируса ринита А лошадей (E2A), тешовируса-1 свиней (P2A) и вируса *Thosea asigna* (T2A), и их активность в протеолитическом расщеплении показана в различных эукариотических системах *ex vitro*, *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Таким образом, концепция аутопротеолитических пептидов является доступной специалисту в данной области, где были идентифицированы множество природных систем аутопротеаз. Хорошо изученными системами аутопротеаз являются, например, вирусные протеазы, связанные с развитием белки (например, белки HetR, Hedgehog), домен аутопротеазы RumA, UmuD и т.д.). Неограничивающие примеры аутопротеолитических пептидов, пригодных для композиций и способов по настоящему изобретению, включают одну или более последовательностей аутопротеолитического расщепления из кальций-зависимой сериновой эндопротеазы (фурина), 2A тешовируса-1 свиней (P2A), 2A вируса ящура (FMDV) (F2A), 2A вируса ринита А лошадей (ERAV) (E2A), 2A вируса *Thosea asigna*

(T2A), 2A вируса цитоплазматического полиэдроса (BmCPV2A), 2A вируса фляшерии (BmIFV2A) или их комбинацию.

[0102] В некоторых вариантах осуществления, кодирующие последовательности для ESR1 или его варианта, PI3K или его варианта, HER2 или его варианта, и HER3 или его варианта являются функционально связанными друг с другом посредством кодирующей последовательности для одного или более внутренних участков связывания рибосомы (IRES). IRES или «внутренний участок связывания рибосомы» представляет собой последовательность, локализованную между полицистронными генами, которая позволяет продукцию продукта экспрессии, происходящего из второго гена, посредством внутренней инициации трансляции бицистронной мРНК. Он стимулирует прямое связывание рибосомы с иницирующим кодоном, таким как ATG, цистрона (кодирующей белок области), таким образом, приводящее к независимой от кэпирования трансляции гена. См., например, Jackson et al., 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) и Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. В некоторых вариантах осуществления, IRES может представлять собой вирусный IRES, клеточный IRES или искусственный IRES. Примеры IRES, как правило, используемых специалистами в данной области, включают описанные в Патенте США No. 6692736. В некоторых вариантах осуществления, IRES выбран из IRES ассоциированного с саркомой Капоши вируса герпеса (KSHV), IRES вируса гепатита, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса черемуховой тли, IRES фактора роста фибробластов, IRES фактора роста тромбоцитов, IRES фактора роста эндотелия сосудов, IRES инсулиноподобного фактора роста, IRES пикорнавируса, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), IRES Pim-1, IRES p53, IRES Araf-1, IRES TDP2, IRES L-мус и IRES с-мус. В некоторых вариантах осуществления, IRES может быть получен из EMCV.

[0103] Специалисту в данной области понятно, что различные конфигурации кодирующих последовательностей для ESR1 или его варианта, PI3K или его варианта, HER2 или его варианта и HER3 или его варианта, последовательности, кодирующей аутопротеолитический пептид, или IRES можно использовать, при условии, что экспрессия ESR1 или его варианта, PI3K или его варианта, HER2 или его варианта и HER3 или его варианта адекватно поддерживается. Этим последовательностям, можно, как правило, придавать конфигурацию таким образом, чтобы полипептид, кодируемый представляющим интерес геном, можно было освободить от протеазы и другой последовательности после расщепления посредством аутопротеазы.

[0104] Термин «функционально связанные», в рамках изобретения, обозначает функциональную связь между двумя или более последовательностями. Например, функциональное связывание между представляющим интерес полинуклеотидом и регуляторной последовательностью (например, промотором), представляет собой функциональную связь, которая позволяет экспрессию представляющего интерес полинуклеотида. В этом смысле, термин «функционально связанные» относится к расположению регуляторной области и кодирующей последовательности, подлежащей

транскрипции, таким образом, чтобы регуляторная область являлась эффективной для регуляции транскрипции или трансляции представляющей интерес кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, термин «функционально связанные» обозначает конфигурацию, в которой регуляторная последовательность помещена в подходящее положение, относительно последовательности, кодирующей полипептид или функциональную РНК, таким образом, чтобы контрольная последовательность направляла или регулировала экспрессию или клеточную локализацию мРНК, кодирующей полипептид, полипептида и/или функциональной РНК. Таким образом, промотор находится в функциональной связи с последовательностью нуклеиновой кислоты, если он может опосредовать транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты. Функционально связанные элементы могут являться непрерывными или прерывистыми.

[0105] Основные способы функционального связывания вместе двух или более последовательностей ДНК знакомы специалисту в данной области, и такие способы описаны во многих книгах по стандартным молекулярно-биологическим манипуляциям (см., например, Maniatis et al., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; и Gibson et al., Nature Methods 6:343-45, 2009).

[0106] Как показано на ФИГ. 3, измеряли ответы Т-клеток на различные моногенные, бигенные и тетрагенные конструкции, имеющие различные порядки «гена 1», «гена 2», «гена 3» и «гена 4» (не показано на ФИГ. 3, поскольку РІЗК не вызывает ответы у мышей BALB/c). Следует понимать, что, в некоторых вариантах осуществления, «ген 1», «ген 2», «ген 3» или «ген 4» может представлять собой ESR1 или его варианты. Подобным образом, в некоторых вариантах осуществления, «ген 1», «ген 2», «ген 3» или «ген 4» может представлять собой HER2 или его вариант. В других вариантах осуществления, «ген 1», «ген 2», «ген 3» или «ген 4» может представлять собой HER3 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, «ген 1», «ген 2», «ген 3» или «ген 4» может представлять собой РІЗК или его варианты. Иллюстративные конфигурации конструкций нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, показаны в таблице 3 ниже.

Таблица 3.

ID конструкции	Детали окончательного порядка, включая молекулярные изменения внутри кассет	Порядок кассеты ESR1	Порядок кассеты РІЗК	Ссылка
pRB-136	РІЗК-P2A-HER2-P2A-HER3-IRES-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGGS

pRB-146	ESR1-P2A-HER3-P2A-PI3K-P2A-HER2	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-151	HER3-P2A-ESR1-IRES-HER2-P2A-PI3K	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-153	ESR1-P2A-HER3-IRES-PI3K-P2A-HER2	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-321	PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3-IRES-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-322	PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3-IRES-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-323	PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3-IRES-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-324	PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3-IRES-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-325	PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3-IRES-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-326	PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3-IRES-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-135	ESR1-P2A-PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-137	PI3K-IRES-ESR1-P2A-HER2-P2A-HER3	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S

pRB-138	IRES-ESR1-P2A-PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-139	HER2-P2A-PI3K-P2A-HER3-P2A-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-140	HER2-P2A-PI3K-P2A-ESR1-P2A-HER3	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-141	PI3K-P2A-HER2-P2A-HER3-P2A-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-142	PI3K-P2A-HER2-P2A-ESR1-P2A-HER3	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-143	HER3-P2A-ESR1-P2A-HER2-P2A-PI3K	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-144	HER3-P2A-ESR1-P2A-PI3K-P2A-HER2	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-145	ESR1-P2A-HER3-P2A-HER2-P2A-PI3K	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-146	ESR1-P2A-HER3-P2A-PI3K-P2A-HER2	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-147	HER2-P2A-PI3K-IRES-HER3-P2A-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-148	HER2-P2A-PI3K-IRES-ESR1-P2A-HER3	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S

pRB-149	PI3K-P2A-HER2-IRES-HER3-P2A-ESR1	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-150	PI3K-P2A-HER2-IRES-ESR1-P2A-HER3	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-151	HER3-P2A-ESR1-IRES-HER2-P2A-PI3K	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-152	HER3-P2A-ESR1-IRES-PI3K-P2A-HER2	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-153	ESR1-P2A-HER3-IRES-HER2-P2A-PI3K	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S
pRB-154	ESR1-P2A-HER3-IRES-PI3K-P2A-HER2	Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G, Y537N	E542K, H1047, E545K, H1047R	GGGG S

[0107] В некоторых вариантах осуществления, конфигурация выбрана из группы, состоящей из pRB-136, pRB-146, pRB-151 и pRB-153.

[0108] В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-10.

[0109] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для полипептидной конструкции содержит, в направлении от 5'- до 3'-: а) кодирующую последовательность для варианта PI3K, содержащего одно или более молекулярных изменений, выбранных из E542K, H1047L, E545K, и при этом указанные молекулярные изменения являются функционально связанными друг с другом посредством линкера GGGGS; б) кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида P2A; в) кодирующую последовательность для варианта HER2, содержащего его внеклеточный домен и трансмембранный домен; д) кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида P2A; е) кодирующую последовательность для неактивного в качестве киназы варианта HER3; ф) кодирующую последовательность для внутреннего участка связывания рибосомы (IRES); и г) кодирующую последовательность

для варианта ESR1, содержащего одно или более молекулярных изменений, выбранных из H1047R Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G и Y537N, где указанные молекулярные изменения являются функционально связанными друг с другом посредством линкера GGGGS.

[0110] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность ESR1, PI3K, HER2 и/или HER3 является переконструированной и/или оптимизированной по желательному свойству, такому как увеличенная стабильность, активность и экспрессия (например, эффективность трансляции), что, в свою очередь, может максимизировать вклад продукции, доставки и введения биотерапевтического средства. Например, в некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность является оптимизированной для экспрессии на уровне, более высоком, чем уровень экспрессии эталонной кодирующей последовательности. Применительно к оптимизации последовательности для нуклеотидных последовательностей, вырожденность генетического кода обеспечивает возможность замены по меньшей мере одного основания кодирующей белок последовательности гена на другое основание, не вызывая изменений аминокислотной последовательности полипептида, продуцированного с гена. Таким образом, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут также иметь любую последовательность оснований, которая была изменена из любой полинуклеотидной последовательности, описанной в настоящем описании, посредством замены, в соответствии с вырожденностью генетического кода. Ссылки, описывающие использование кодонов, являются легко доступными публично. В некоторых вариантах осуществления, варианты полинуклеотидной последовательности можно получать по множеству причин, например, для оптимизации экспрессии для конкретного хозяина (например, изменения использования кодонов в мРНК альфавируса на кодоны, предпочтительные для других организмов, таких как человек, нечеловекообразные приматы, хомяк, мыши или обезьяна). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность является оптимизированной для экспрессии в намеренной клетке-хозяине посредством использования кодонов, оптимизированных для экспрессии. Способы конструирования синтетических последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих гены, с использованием предпочтительных кодонов, оптимальных для экспрессии в клетке-хозяине, можно определять посредством вычислительных способов, анализирующих общность использования кодонов для кодирования нативных белков для генома клетки-хозяина и их относительную распространенность, посредством способов, хорошо известных в данной области. Базу данных использования кодонов (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) можно использовать для получения оптимизированных по кодонному составу последовательностей в окружении клеток млекопитающих. Кроме того, являются доступными множество инструментов программного обеспечения для перевода последовательностей из одного организма к оптимальному использованию кодонов для другого организма-хозяина, такие как JCat Codon Optimization Tool (www.jcat.de),

Integrated DNA Technologies (IDT) Codon Optimization Tool (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) или Optimizer online codon optimization tool (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>). Такие синтетические последовательности могут быть сконструированы посредством способов, известных в данной области для конструирования синтетических молекул нуклеиновых кислот, и могут быть получены от множества коммерческих поставщиков.

[0111] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность является оптимизированной для увеличенной стабильности и/или экспрессии РНК. Стабильность РНК, как правило, относится к «времени полужизни» РНК. «Время полужизни» относится к периоду времени, необходимому для уничтожения половины активности, уровня или количества молекул. В контексте настоящего описания, время полужизни РНК является показателем стабильности указанной РНК. Время полужизни РНК может влиять на «длительность экспрессии» РНК. Дополнительную информацию, применительно к принципам, стратегиям и способам использования для улучшения стабильности РНК, можно обнаружить, 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.

Рекомбинантные клетки

[0112] Конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно вводить в клетку-хозяина для получения рекомбинантной клетки, содержащей молекулы нуклеиновой кислоты. Соответственно, прокариотические или эукариотические клетки, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном EEEV, как описано в настоящем описании, также представляют собой признаки настоящего изобретения. В родственном аспекте, некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем описании, относятся к способам трансформации клетки, включающим введение в клетку-хозяина, такую как клетка животного, конструкции нуклеиновой кислоты, в рамках изобретения, и затем отбор или скрининг трансформированной клетки. Введение конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению в клетки можно осуществлять посредством способов, известных специалисту в данной области, например, таких как вирусная инфекция, трансфекция, конъюгация, слияние протопластов, липофекция, электропорация, нуклеофекция, преципитация фосфатом кальция, опосредованная полиэтиленимином (PEI) трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном трансфекция, опосредованная липосомами трансфекция, технология пушки для частиц, прямая микроинъекция, опосредованная наночастицами доставка нуклеиновых кислот и т.п.

[0113] В одном аспекте, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к рекомбинантным клеткам, например, рекомбинантным эукариотическим клеткам, например, рекомбинантным клеткам животных, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании. Конструкция нуклеиновой кислоты может являться стабильно интегрированной в геном хозяина, или

может являться эписомно реплицирующейся, или присутствующей в рекомбинантной клетке-хозяине в форме миникольцевого экспрессирующего вектора для стабильной или временной экспрессии. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты поддерживается и реплицируется в рекомбинантной клетке-хозяине в форме эписомной единицы. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты является стабильно интегрированной в геном рекомбинантной клетки. Стабильную интеграцию можно осуществлять с использованием классических способов случайной геномной рекомбинации или с использованием способов более точного геномного редактирования, таких как использование геномного редактирования посредством управляемой направляющей РНК CRISPR/Cas9 или посредством TALEN. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты присутствует в рекомбинантной клетке-хозяине в форме миникольцевого экспрессирующего вектора для стабильной или временной экспрессии.

[0114] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой прокариотическую клетку, такую как бактерия *E. coli*, или эукариотическую клетку, такую как клетка насекомого (например, клетка комара или клетка Sf21), или клетки млекопитающих (например, клетки COS, клетки NIH 3T3 или клетки HeLa). В некоторых вариантах осуществления, клетка присутствует *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, клетка присутствует *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления, клетка присутствует *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления, клетка животного представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки CV1 почки обезьяны, трансформированной SV40 (COS-7), клетки эмбриональной почки человека (например, НЕК 293 или клетки НЕК 293), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки Сертоли мыши (например, клеток TM4), клетки почки обезьяны (CV1), клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени крысы Буффало (BRL 3A), клетки легкого человека (W138), клетки печени человека (Hep G2), клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562), клетки TRI, клетки FS4, клетки яичника китайского хомяка (клетки CHO), клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero), клетки A549 человека, клетки шейки матки человека, клетки CHME5 человека, клетки PER.C6 человека, клетки миеломы мыши NS0, эпидермоидной клетки гортани человека, клетки фибробласта человека, клетки HUH-7 человека, клетки MRC-5 человека, мышечной клетки человека, эндотелиальной клетки человека, клетки астроцита человека, клетки макрофага человека, клетки RAW 264.7 человека, клетки 3T3 мыши, клетки L929 мыши, клетки

соединительной ткани мышцы, мышечной клетки мышцы и клетки почки кролика.

[0115] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку насекомого, например, клетку из линии клеток насекомого. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку Sf21. Дополнительные подходящие линии клеток насекомых включают, но без ограничения, линии клеток, полученные от насекомых отрядов *Diptera*, *Lepidoptera* и *Hemiptera*, и могут происходить из различных источников ткани. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку из линии клеток чешуекрылого насекомого. В прошедшие несколько десятилетий, доступность линий клеток чешуекрылых насекомых увеличилась приблизительно на 50 линий за десятилетие. Больше информации, относительно доступных линий клеток чешуекрылых насекомых, можно обнаружить, например, в Lynn D.E., *Available lepidopteran insect cell lines*. *Methods Mol Biol.* 2007;388:117-38, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку комара, например, клетку из видов комаров внутри родов *Anopheles* (*An.*), *Culex* (*Cx.*) и *Aedes* (*Stegomyia*) (*Ae.*). Иллюстративные линии клеток комаров, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем описании, включают линии клеток из следующих видов комаров: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes pseudoscutellaris*, *Aedes triseriatus*, *Aedes vexans*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex theileri*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex bitaeniorhynchus* и *Toxorhynchites amboinensis*. Подходящие линии клеток комаров включают, но без ограничения, CCL-125, Aag-2, RML-12, C6/26, C6/36, C7-10, AP-61, A.t. GRIP-1, A.t. GRIP-2, UM-AVE1, Mos.55, Sua1B, 4a-3B, Mos.43, MSQ43 и LSB-AA695BB. В некоторых вариантах осуществления, клетка комара представляет собой клетку из линии клеток C6/26.

[0116] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к культурам клеток, включающим по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, как описано в настоящем описании, и культуральную среду. Как правило, культуральная среда может представлять собой любую подходящую культуральную среду для культивирования клеток, описанных в настоящем описании. Способы трансформации широкого множества вышеупомянутых клеток и видов - хозяев известны в данной области и описаны в технической и научной литературе. Соответственно, культуры клеток, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, как описано в настоящем описании, также включены в объем настоящего изобретения. Способы и системы, подходящие для получения и поддержания культур клеток, известны в данной области.

[0117] Рекомбинантные полипептиды, полученные способом, описанным в настоящем описании, также входят в объем настоящего изобретения.

[0118] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления описанных способов получения рекомбинантного полипептида могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, способы получения

рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению дополнительно включают выделение и/или очистку продуцированного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способы получения полипептида по настоящему изобретению дополнительно включают структурную модификацию продуцированного полипептида для увеличения времени полужизни.

Фармацевтические композиции

[0119] Конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды по настоящему изобретению можно включать в композиции, включая фармацевтические композиции. Такие композиции, как правило, включают одно или более из конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов, описанных и представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, например, носитель. В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению составляют для профилактики, лечения или терапии нарушения здоровья, такого как злокачественная опухоль. Например, композиции по настоящему изобретению можно составлять в качестве профилактической композиции, терапевтической композиции или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый эксципиент или их смесь. В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению составляют для применения в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления, композиции настоящей заявки составляют для применения в качестве адъюванта.

[0120] Соответственно, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим фармацевтически приемлемый эксципиент и: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; и/или с) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению.

[0121] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления фармацевтических композиций по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. Конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно использовать в голой форме или формулированными с носителем для доставки. Иллюстративные способы, либо использование в свободной форме, либо, например, вставленной в нуклеиновую кислоту, например, вектор. Например, как более подробно описано ниже, конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, можно использовать в качестве вакцины.

[0122] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, включающим рекомбинантную клетку, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления, композиции включают рекомбинантный полипептид, как описано в настоящем описании, и фармацевтически

приемлемый эксципиент.

[0123] В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению составляют для профилактики, лечения или терапии нарушения здоровья, такого как злокачественная опухоль. Например, композиции по настоящему изобретению можно составлять в качестве профилактической композиции, терапевтической композиции или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый эксципиент или их смесь.

[0124] Для использования в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту или рекомбинантную клетку, как описано в настоящем описании, можно составлять в носители для доставки или с носителями для доставки. Иллюстративные носители для доставки, пригодные для композиций и способов по настоящему изобретению включают, но без ограничения, липосомы (например, нейтральные или анионные липосомы), микросферы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), наночастицы на основе липидов (LNP), полимерные наночастицы, частицы вирусных репликонов (VRP) или конъюгированные с биоактивными лигандами, которые могут способствовать доставке и/или усиливать иммунный ответ. Эти соединения являются легко доступными специалисту в данной области; например, см. *Liposomes: A Practical Approach*, RCP New Ed, IRL press (1990). Адьюванты, отличные от липосом и т.п., также используют, и они известны в данной области. Адьюванты могут защищать антиген (например, конструкцию сРНК) от быстрого распространения посредством их секвестрирования в локальном хранилище, или они могут содержать вещества, стимулирующие у хозяина секрецию факторов, которые являются хемотаксическими для макрофагов и других компонентов иммунной системы. Специалист в данной области может сделать подходящий выбор, например, из описанного ниже.

[0125] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, композиция по настоящему изобретению может включать одно или более из следующего: физиологического буфера, липосомы, наночастицы на основе липидов (LNP), полимерной наночастицы, частицы вирусного репликона (VRP), микросферы, иммуностимулирующего комплекса (ISCOM), конъюгата биоактивного лиганда или комбинации любых из них.

[0126] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно доставлять в клетку или субъекту посредством наночастицы на основе липидов (LNP). LNP являются, как правило, менее иммуногенными, чем вирусные частицы. В то время как многие люди имеют предрасполагающий иммунитет к вирусным частицам, не присутствует предрасполагающий иммунитет к LNP. Кроме того, маловероятно возникновение адаптивного иммунного ответа против LNP, что позволяет повторяющееся дозирование LNP.

[0127] Липиды, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем описании, могут представлять собой катионные липиды, ионизируемые катионные

липиды, анионные липиды или нейтральные липиды.

[0128] В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению может включать один или более ионизируемых липидов. В рамках изобретения, термин «ионизируемый липид» относится к липиду, который является катионным или становится ионизируемым (протонированным), по мере того, как pH снижается ниже pKa ионизируемой группы липида, но является более нейтральным при более высоких значениях pH. При значениях pH ниже pKa, липид затем является способным вступать в ассоциацию с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами (например, олигонуклеотидами). В рамках изобретения, термин «ионизируемый липид» включает липиды, которые приобретают положительный заряд при уменьшении pH ниже физиологического pH, и любой из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд при селективном pH, таком как физиологический pH. Доказано, что постоянно катионные липиды, такие как DOTMA, являются слишком токсичными для клинического применения. Ионизируемый липид может присутствовать в липидных составах, в соответствии с другими вариантами осуществления, предпочтительно, в соотношении от приблизительно 30 до приблизительно 70 моль%, в некоторых вариантах осуществления, приблизительно 30 моль%, в других вариантах осуществления, приблизительно 40 моль%, в других вариантах осуществления, приблизительно 45 моль% в других вариантах осуществления, приблизительно 47,5 моль% в других вариантах осуществления, приблизительно 50 моль%, в других вариантах осуществления и приблизительно 60 моль% в других («моль%» обозначает процент от общего количества молей, который составляет конкретный компонент). Термин «приблизительно» в этом абзаце обозначает диапазон плюс или минус 5 моль%. DODMA, или 1,2-диолеилокси-3-диметиламинопропан, представляет собой ионизируемый липид, как и DLin-MC3-DMA или 0-(Z, Z,Z, Z-гептатриаконта-6,9,26,29-тетраен-19-ил)-4-(N, N-диметиламино) («MC3»).

[0129] Иллюстративные ионизируемые липиды, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают липиды, описанные в Публикациях РСТ WO2020252589A1 и WO2021000041A1, Патентах США No. 8450298 и 10844028, и Love K.T. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, Feb. 2, 2010 107 (5) 1864-1869, полное содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает одно или более липидных соединений, описанных в Love K.T. *et al.*, 2010 выше, таких как C16-96, C14-110 и C12-200. В некоторых вариантах осуществления, LNP включает ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, состоящей из ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102 и комбинации любых из них. В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает C12-200. Структура C12-200 липида известна в данной области и описана, например, в Патентах США No. 8450298 и 10844028, полное содержание которых, таким образом, приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, C12-200 комбинируют с холестерином, C14-PEG2000 и DOPE. В некоторых вариантах осуществления, C12-200

комбинируют с DSPC и DMG-PEG2000.

[0130] В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает один или более катионных липидов. Подходящие катионные липиды включают, но без ограничения, 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 и 7C1. В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает один или более нейтральных липидов. Неограничивающие нейтральные липиды, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает одно или более ионизируемых липидных соединений, описанных в Публикациях PCT WO2020252589A1 и WO2021000041A1, полное содержание которых, таким образом, приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0131] Ряд других липидов или комбинацию липидов, известных в данной области, можно использовать для получения LNP. Неограничивающие примеры липидов, подходящих для применения для получения LNP, включают DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерин, DOTAP-холестерин, GAP-DMORIE-DPyPE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоль (PEG). Неограничивающие примеры катионных липидов включают 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1, 7C1 и комбинацию любых из них. Неограничивающие примеры нейтральных липидов включают DPSC, DPPC, POPC, DOPE, и SM. Неограничивающие примеры модифицированных посредством PEG липидов включают PEG-DMG, PEG-CerC14 и PEG-CerC20.

[0132] В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает 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). 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.

[0133] В некоторых вариантах осуществления, массовое соотношение липида к нуклеиновой кислоте в системе доставки на основе LNP составляет от приблизительно 100:1 до приблизительно 3:1, от приблизительно 70:1 до 10:1 или от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления, массовое соотношение липида к нуклеиновой кислоте в системе доставки на основе LNP составляет приблизительно 16:1-4:1. В некоторых вариантах осуществления, массовое соотношение липида к нуклеиновой кислоте в системе доставки на основе LNP составляет приблизительно 20:1. В некоторых вариантах осуществления, массовое соотношение липида к нуклеиновой кислоте в системе доставки на основе LNP составляет приблизительно 8:1. В некоторых вариантах осуществления, наночастицы на основе липидов имеют средний диаметр менее чем приблизительно 1000 нм, приблизительно 500 нм, приблизительно 250 нм,

приблизительно 200 нм, приблизительно 150 нм, приблизительно 100 нм, приблизительно 75 нм, приблизительно 50 нм, или приблизительно 25 нм. В некоторых вариантах осуществления, LNP имеют средний диаметр, лежащий в диапазоне от приблизительно 70 нм до 100 нм. В некоторых вариантах осуществления, LNP имеют средний диаметр, лежащий в диапазоне от приблизительно 88 нм до приблизительно 92 нм, от 82 нм до приблизительно 86 нм или от приблизительно 80 нм до приблизительно 95 нм.

[0134] В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению формулируют в липосоме. В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению формулируют в наночастице на основе липидов (LNP). В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению формулируют в полимерной наночастице.

[0135] Как описано выше, нейтральные липиды, также известные как «структурные липиды» или «липиды-помощники», можно также включать в липидные составы и липидные частицы в некоторых вариантах осуществления. Липидные составы и липидные частицы могут включать один или более структурных липидов при приблизительно 10-40 моль% от композиции. Пригодные структурные липиды поддерживают формирование частиц в ходе изготовления. Структурные липиды относятся к любому из ряда видов липидов, которые существуют в анионной, незаряженной или нейтральной цвиттер-ионной форме при физиологическом pH. Репрезентативные структурные липиды включают диацилфосфатидилхолины, диацилфосфатидилэтаноламины, диацилфосфатидилглицерины, церамиды, сфингомиелины, дигидросфингомиелины, цефалины и цереброзиды.

[0136] Иллюстративные структурные липиды включают цвиттер-ионные 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-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE), и 1,2-диэлаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (транс-DOPE).

[0137] В другом варианте осуществления, структурный липид может представлять собой любой липид, который является отрицательно заряженным при физиологическом pH. Эти липиды включают фосфатидилглицерины, такие как диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG), кардиолипин, фосфатидилинозитол, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидная кислота, и другие анионные модифицирующие группы, присоединенные к нейтральным липидам. Другие пригодные структурные липиды включают гликолипиды (например, моносиалоганглиозид GM1).

[0138] Стабилизаторы можно включать в варианты осуществления липидных составов, чтобы гарантировать целостность смесей. Стабилизаторы представляют собой класс молекул, которые способствуют разрушению или формированию гидрофобных-гидрофильных взаимодействий среди молекул. Пригодные стабилизаторы включают, но без ограничения, полисорбат 80 (также известный как Tween 80, наименование IUPAC 2-[2-[3,4-бис(2-гидроксиэтокси)оксолан-2-ил]-2-(2-гидроксиэтокси)этокси]этилоктадец-9-еноат), Муџ52 (стеарат полиоксиэтилена (40)) и Вгij™ S10 (стеариловый эфир полиоксиэтилена (10)). Можно также использовать конъюгированные с полиэтиленгликолем липиды. Стабилизаторы можно использовать отдельно или в комбинациях друг с другом.

[0139] В некоторых вариантах осуществления, стабилизаторы составляют приблизительно 0,1-3 моль% от общей смеси липидов. В некоторых вариантах осуществления, стабилизаторы составляют приблизительно 0,5-2,5 моль% от общей смеси липидов. В некоторых вариантах осуществления, стабилизатор присутствует при более чем 2,5 моль%. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор присутствует при 5 моль%. В некоторых вариантах осуществления, стабилизатор присутствует при 10 моль%. В некоторых вариантах осуществления, стабилизатор составляет приблизительно 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 т.д. В других вариантах осуществления, стабилизатор составляет 2,6-10 моль% от смеси липидов. В других вариантах осуществления, стабилизаторы присутствуют при более чем 10 моль% от смеси липидов.

[0140] Стероиды также можно включать в липидные композиции для конкретных применений, и липидные частицы, полученные из них, включают стеролы, такие как холестерин и фитостерол.

[0141] В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции, описанные в настоящем описании, например, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, включают в терапевтические композиции для применения в способах предотвращения или лечения для субъекта, который имеет, который, как подозревают, имеет, или который может быть подвержен высокому риску развития злокачественной опухоли.

[0142] В некоторых вариантах осуществления, композиции представляют собой иммуногенные композиции, например, композицию, которая может стимулировать иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, иммуногенные композиции составляют в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции составляют в качестве адъюванта. В некоторых вариантах осуществления, иммуногенные композиции составляют в качестве биотерапевтического средства, например, переносчика для генной доставки различных молекул с биоактивностью. Неограничивающие примеры биотерапевтических средств включают цитокины, хемокины и другие растворимые иммуномодуляторы, ферменты, агонисты

пептидов и белков, антагонисты пептидов и белков, гормоны, рецепторы, антитела и производные антител, факторы роста, факторы транскрипции, и молекулы для выключения/редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции составляют в качестве адьюванта.

[0143] В некоторых вариантах осуществления, иммуногенные композиции являются по существу неиммуногенными или минимально иммуногенными (например, композиции, которые минимально стимулируют иммунный ответ у субъекта). В некоторых вариантах осуществления, неиммуногенные или минимально иммуногенные композиции составляют в качестве биотерапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции составляют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутривентриального введения, внутримышечного введения, внутриузловое введение, внутриопухолевого введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения и перорального введения.

[0144] Фармацевтические композиции, подходящие для применения для инъекции, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных пригодных для инъекций растворов или дисперсий. Для внутривенного введения, подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор EL™. (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS), трис (триметамин) и HEPES. В этих случаях, композиция должна являться стерильной и должна являться текучей до той степени, чтобы существовала возможность простого введения через шприц. Она может являться стабильной в условиях изготовления и хранения, и может быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), и их пригодные смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ, например, додецилсульфата натрия. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях, является обычным включать изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, сахароза, трегалоза, и/или хлорид натрия, в композицию. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит трис и сахарозу. Длительную абсорбцию пригодных для инъекции композиций можно осуществлять посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0145] Стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать

посредством введения активного соединения в необходимом количестве в пригодный растворитель с одним или комбинацией из ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей фильтрацией стерилизацией. Как правило, дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и необходимые ингредиенты, отличные от перечисленных выше.

[0146] В некоторых вариантах осуществления, композицию составляют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутримышечного введения, внутриопухолевого введения, внутриузлового введения, внутривенного введения, внутрибрюшинного введения, перорального введения, интравагинального или интракраниального введения.

СПОСОБЫ ПО НАСТОЯЩЕМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

[0147] Введение любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем описании, например, конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, можно использовать в лечении соответствующих нарушений здоровья, таких как злокачественные опухоли. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, как описано в настоящем описании, можно использовать для индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, как описано в настоящем описании, можно включать в лекарственные средства для применения в способах лечения субъекта, который имеет, который, как подозревают, имеет, или который может быть подвержен высокому риску развития одного или более соответствующих нарушений здоровья или заболеваний. Иллюстративные нарушения здоровья или заболевания могут включать, без ограничения, виды рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой пациента под наблюдением терапевта.

[0148] Неограничивающие примеры рака молочной железы, подходящего для способов по настоящему изобретению, включают протоковый рак молочной железы, лобулярный рак молочной железы, недифференцированный рак молочной железы, лобулярную 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 преобладающими внутрижелезистыми компонентами, виды воспалительного рака молочной железы и протоковые карциномы молочной железы. Протоковые карциномы молочной железы могут включать инвазивные лобулярные карциномы с преобладающими компонентами *in situ*, инвазивные лобулярные карциномы,

и инфильтрирующие лобулярные карциномы. Рак молочной железы может включать болезнь Педжета, экстрамамиллярную болезнь Педжета, болезнь Педжета с внутрижелезистой злокачественной опухолью и болезнь Педжета с инвазивной протоковой карциномой. Рак молочной железы может включать новообразования молочной железы с гистологической и гиперструктурной гетерогенностью (например, смешанными типами клеток). Рак молочной железы можно классифицировать как базальноподобный, люминальный А, люминальный В, ERBB2/Her2+ или подобный нормальной молочной железе молекулярные подтипы.

[0149] Соответственно, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту композиции, включающей: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; с) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению; и/или d) фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

[0150] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам предотвращения и/или лечения нарушения здоровья у нуждающегося в этом субъекта, включающим профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, включающей: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; с) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению; и/или d) фармацевтическую композицию любого по настоящему изобретению.

[0151] В некоторых вариантах осуществления, нарушение здоровья представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или, как подозревают, имеет злокачественную опухоль.

[0152] В некоторых вариантах осуществления, описанную композицию формулируют таким образом, чтобы она являлась совместимой с предназначенным для нее способом введения. Например, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально, посредством ингаляции или посредством парентерального способа. Примеры парентеральных способов введения включают, например, внутримышечное, внутриопухолевое, внутриглазное, внутривенное, внутриузловое, внутрикожное, подкожное, чрескожное (местное) введение, введение через слизистые оболочки, интравагинальное и ректальное введение. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят внутрь опухоли. Растворы или суспензии, используемые для парентерального введения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены;

антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты, фосфаты, трис, сахароза и средства для доведения тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. рН можно доводить с использованием кислот или оснований, таких как одно- и/или двухосновный фосфат натрия, соляная кислота или гидроксид натрия (например, до рН приблизительно 7,2-7,8, например, 7,5). Парентеральный препарат можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для множественных доз, изготовленные из стекла или пластика.

[0153] Терапевтические композиции, описанные в настоящем описании, например, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, можно вводить от одного или более раз в сутки до одного или более раз в неделю; включая один раз на каждые вторые сутки. Лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества рассматриваемых конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению может включать однократное лечение или может включать серии циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления, композиции вводят с еженедельными интервалами, например, 1-2, 2-3 или 3-4 дозы, введенные с 1-2, 2-3 или 3-4-недельными интервалами. За этим может следовать дополнительное введение каждые 1, 2, 3 или 4 месяца. В некоторых вариантах осуществления, 3 дозы можно вводить внутримышечно с 3-4-недельным интервалом, с последующим внутримышечным введением каждые 3 месяца. Альтернативно, композицию можно вводить с более короткими интервалами, например, каждые 8 часов в течение пяти суток, с последующим периодом отдыха 2-14 суток, например, 9 суток, с последующими дополнительными пятью сутками введения каждые 8 часов. Применительно к конструкциям нуклеиновых кислот и рекомбинантным полипептидам, терапевтически эффективное количество конструкции нуклеиновой кислоты или рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению (например, эффективная доза) зависит от выбранных конструкции нуклеиновой кислоты или рекомбинантного полипептида.

[0154] Как обсуждали выше, терапевтически эффективное количество включает количество терапевтической композиции, которое является достаточным для оказания конкретного эффекта при введении субъекту, такому как субъект, который имеет, как подозревают, имеет, или подвержен риску развития нарушения здоровья, например, злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество включает количество, достаточное для предотвращения или замедления развития симптома заболевания, изменения течения симптома заболевания (например, но без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания) или обращения симптома заболевания.

[0155] Лечение считают эффективным лечением, если по меньшей мере любой один или все из признаков или симптомов заболевания улучшаются или облегчаются.

Эффективность можно также измерять по отсутствию ухудшения у индивидуума, как оценено по госпитализации или необходимости медицинских вмешательств (например, прогрессирование заболевания прекращается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалисту в данной области и/или описаны в настоящем описании. Лечение включает любое лечение заболевания у субъекта или у животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающего) и включает: (1) ингибирование заболевания, например, остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания, например, вызов регрессии симптомов; и (3) предотвращение или уменьшение вероятности развития симптомов.

[0156] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту в композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, и в количестве, эффективном для стимуляции иммунного ответа. В общем, субъекта можно иммунизировать посредством начальных серий инъекций (или введения посредством одного из других способов, описанных ниже) и впоследствии, проводить бустер-инъекции для увеличения защиты, достигнутой посредством исходных серий введений. Начальные серии инъекций и последующие бустер-инъекции вводят в таких дозах и на протяжении такого периода времени, какие являются необходимыми для стимуляции иммунного ответа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления описанных способов, субъект представляет собой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, млекопитающее представляет собой субъекта-человека.

[0157] Как описано выше, фармацевтически приемлемые носители, подходящие для пригодного для инъекции применения, включают стерильные водные растворы (когда являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных пригодных для инъекций растворов или дисперсий. В этих случаях, композиция должна являться стерильной и должна являться текучей до той степени, чтобы существовала возможность простого введения через шприц. Композиция должна, кроме того, являться стабильной в условиях изготовления и хранения, и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.д.), их пригодные смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п.

[0158] Стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать посредством введения конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или рекомбинантных полипептидов в необходимом количестве в пригодный растворитель с одним или комбинацией из ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей фильтрацией стерилизацией.

[0159] Когда конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции подходящим образом защищены, как описано выше, их можно вводить перорально, например, с инертным разбавителем или усваиваемым съедобным носителем. Конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции и другие ингредиенты можно также заключать в капсулу с твердой или мягкой желатиновой оболочкой, спрессовывать в таблетки, или вводить непосредственно в диету индивидуума. Для перорального терапевтического введения, активное соединение можно включать в наполнители и использовать в форме проглатываемых таблеток, буккальных таблеток, лепешек, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п.

Дополнительные виды терапии

[0160] В некоторых вариантах осуществления, композицию, в соответствии с настоящим изобретением, вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в комбинации с по меньшей мере одним из видов дополнительной терапии (например, второй терапии). В некоторых вариантах осуществления, вторая терапия выбрана из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, терапии токсином, направленной терапии и хирургии. В некоторых вариантах осуществления, вторая терапия выбрана из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, терапии токсином или хирургии. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию и вторую терапию проводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию проводят в то же самое время, что и вторую терапию. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию и вторую терапию проводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию проводят до второй терапии. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию проводят после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию проводят до и/или после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию и вторую терапию проводят поочередно. В некоторых вариантах осуществления, первое терапевтическое средство и второе терапевтическое средство вводят совместно в одном составе.

НАБОРЫ

[0161] Также настоящее изобретение относится к различным наборам для практического осуществления способа, описанного в настоящем описании, так же как к письменным инструкциям для их получения и применения. В частности, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к наборам для индукции

иммунного ответа у субъекта. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для способов лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к наборам, включающим одно или более из конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, как представлено и описано в настоящем описании, так же как письменные инструкции для их получения и применения.

[0162] В некоторых вариантах осуществления, наборы по настоящему изобретению дополнительно включают одно или более средств, которые можно использовать для введения любого из представленных конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций субъекту. Например, в некоторых вариантах осуществления, наборы по настоящему изобретению дополнительно включают один или более шприцев (включая предварительно заполненные шприцы) и/или катетеров (включая предварительно заполненные шприцы), используемых для введения любого из представленных конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций субъекту. В некоторых вариантах осуществления, набор может включать одно или более дополнительных лекарственных средств, которые можно вводить одновременно или последовательно с другими компонентами набора для желательной цели, например, для диагностики, предотвращения или лечения состояния у нуждающегося в этом субъекта.

[0163] Любой из вышеописанных наборов может дополнительно включать один или более дополнительных реагентов, где такие дополнительные реагенты могут быть выбраны из: буферов для разбавления; растворов для разведения, буферов для промывки, контрольных реагентов, контрольных экспрессирующих векторов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов, реагентов, подходящих для продукции *in vitro* представленных конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

[0164] В некоторых вариантах осуществления, компоненты набора могут находиться в отдельных контейнерах. В некоторых других вариантах осуществления, компоненты набора могут содержаться в одном контейнере. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, набор включает одно или более из конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, как представлено и описано в настоящем описании, в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе) и дополнительное лекарственное средство в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

[0165] В другом варианте осуществления, набор включает комбинацию композиций, описанных в настоящем описании, включая одно или более из конструкций

нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению, в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, формулированную совместно, необязательно, в фармацевтической композиции, в одном общем контейнере.

[0166] Если набор включает фармацевтическую композицию для парентерального введения субъекту, набор может включать устройство (например, устройство для инъекции или катетер) для проведения такого введения. Например, набор может включать одну или более гиподермических игл или других устройств для инъекции, как обсуждали выше, содержащих одно или более из конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению.

[0167] В некоторых вариантах осуществления, набор может дополнительно включать инструкции для использования компонентов набора для практического осуществления способов, описанных в настоящем описании. Например, набор может включать вкладыш в упаковку, включающий информацию относительно фармацевтических композиций и лекарственных форм в наборе. Как правило, такая информация помогает пациентам и терапевтам, чтобы использовать вложенные фармацевтические композиции и лекарственные формы эффективно и безопасно. Например, следующая информация относительно комбинации по настоящему изобретению может быть предоставлена на вкладыше: фармакокинетика, фармакодинамика, клинические исследования, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, меры предосторожности, неблагоприятные реакции, передозировка, правильные дозировка и введение, форма выпуска, надлежащие условия хранения, ссылки, информация о производителе/поставщике и патентная информация.

[0168] Инструкции для практического осуществления способов, как правило, записывают на подходящей среде для записи. Например, инструкции могут быть напечатаны на субстрате, таком как бумага или пластик, и т.д. Инструкции могут быть представлены в наборе в форме вкладыша в упаковку, на этикетке контейнера набора или его компонентов (например, связанные с упаковкой или внутренней упаковкой) и т.д. Инструкции могут быть представлены в форме файла электронного хранения данных, присутствующего на подходящей машиночитаемой среде для хранения информации, например, CD-ROM, дискете, флэш-накопителе и т.д. В некоторых случаях, действующие инструкции не присутствуют в наборе, однако, могут быть предоставлены средства для получения инструкций из удаленного источника (например, через интернет). Примером этого варианта осуществления является набор, включающий веб-адрес, по которому инструкции можно просматривать и/или с которого инструкции можно скачивать. Как и в случае инструкций, эти средства для получения инструкций могут быть записаны на подходящем субстрате.

[0169] Полное содержание всех публикаций и патентных заявок, упомянутых в настоящем описании, приведено в настоящем описании в качестве ссылки, в такой же

степени, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что содержание каждой индивидуальной публикации или патентной заявки приведено в качестве ссылки.

[0170] Не делают допущения, что какая-либо ссылка, процитированная в настоящем описании, составляет известный уровень техники. В обсуждении ссылок указано, что утверждают их авторы, и заявитель сохраняет право оспаривать правильность и применимость процитированных документов. Следует ясно понимать, что, хотя в настоящем описании приведены ссылки на ряд источников информации, включая статьи в научных журналах, патентные документы и руководства; эта ссылка не составляет допущения, что какой-либо из этих документов составляет часть общедоступного известного уровня техники в данной области.

[0171] Обсуждение общих способов, приведенное в настоящем описании, предназначено только для целей иллюстрации. Другие альтернативные способы и альтернативы станут очевидными специалисту в данной области при просмотре этого описания, и должны быть включены в содержание и сферу действия настоящего изобретения.

[0172] Дополнительные варианты осуществления более подробно описаны в следующих примерах, которые представлены с целью иллюстрации и никаким образом не предназначены для ограничения настоящего описания или формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0173] В практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать, если не указано иное, общепринятые способы молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, которые хорошо известны специалисту в данной области. Такие способы полностью объяснены в литературе, такой как Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory и Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (совместно обозначенные в настоящем описании как «Sambrook»); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (включая дополнения до 2014 г.); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. et al. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferré, F. & Gibbs, R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (включая дополнения до 2014 г.); и Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V.,

содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0174] Дополнительные варианты осуществления более подробно описаны в следующих примерах, которые представлены с целью иллюстрации и никаким образом не предназначены для ограничения объема настоящего описания или формулы изобретения.

ПРИМЕР 1

Конструирование векторов EEEV

[0175] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для конструирования базового вектора EEEV (например, без гетерологического гена), которые впоследствии использовали для конструирования векторов EEEV, экспрессирующих представляющие интерес ген или гены (например, ESR1 или его варианты, PI3K или его варианты, HER2 или его вариант и HER3 или его вариант).

[0176] Базовый вектор EEEV (т.е., без представляющего интерес гетерологического гена) конструировали, следующим образом: Базовый вектор EEEV синтезировали заново в четырех частях по ~4 т.п.о. (Twist Bioscience) из эталонной последовательности (Genbank EF151502) с несколькими модификациями. Молчащие мутации G301A, A3550C, G4516A, G5725A и G7399A вводили для уничтожения участков разрезания рестрикционных ферментов. Уникальный участок разрезания рестрикционного фермента (*SpeI*, 5'-A'CTAG, T-3') вводили вместо кодирующей последовательности структурных генов нативного EEEV (где 5'-A соответствует локализации иницирующего кодона ATG структурного полибелка, и 3'-T соответствует локализации стоп-кодона TAA структурного полибелка). 5'-адаптерную последовательность (5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3'; SEQ ID NO: 21) вставляли выше участка *SpeI*, и 3'-адаптерную последовательность (5'-GACCGCTACGCCCCAATGACCCGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 22) вставляли ниже участка *SpeI* для последующих способов сборки по Гибсону Gibson Assembly® (Gibson *et al.*, *Nat. Methods* 6, 343-345, 2009). Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 23) включали выше последовательности генома EEEV, и ниже содержалась поли(А)-последовательность, за которой следовал участок *SapI*, разрезающей выше участка узнавания. Непосредственно ниже участка *SapI* находится терминаторная последовательность T7 (5'-ААССССТСТСТАААСГГАГГГТТТТТТТ-3'; SEQ ID NO: 24), за которой следует уникальный участок разрезания рестрикционного фермента (*NotI*, 5'-GC'GGCC, GC-3'). Части объединяли в реакции сборки по Гибсону Gibson Assembly® пяти фрагментов: линейаризованного остова pYL и четырех синтезированных фрагментов для получения в результате базового вектора EEEV.

[0177] Конструирование вектора EEEV, содержащего гетерологические гены, проводили следующим образом: базовый вектор EEEV линейаризовали посредством расщепления *SpeI*. Варианты ESR1, PI3K, HER2 и HER3 подвергали оптимизации по кодонному составу/перепроектированию для экспрессии у человека *in silico* и, совместно с IRES EMCV, заново синтезировали (GeneArt, IDT). Синтетические продукты

амплифицировали с использованием праймеров, которые добавляют 5'- и 3'-адаптерные последовательности к концам генов, или праймеров, которые добавляют последовательности P2A и/или последовательности гомологии с соседними вставками генов. Продукт расщепления и продукты ПЦР комбинировали посредством способа сборки по Гибсону Gibson Assembly® для получения в результате конечных векторов.

ПРИМЕР 2

Оценка *in vitro* модифицированных векторов EEEV

[0178] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vitro*, проведенных для оценки уровней экспрессии конструкций синтетического репликона EEEV, описанных в примере 1 выше, и для исследования какого-либо их дифференциального поведения (например, репликации и экспрессии белка).

[0179] Транскрипция *in vitro*: РНК получали посредством транскрипции *in vitro* с линейаризованной посредством *SapI* плазмидной матрицы с использованием полимеразы бактериофага T7 либо с использованием 5'-кэпа ARCA (набор HiScribe™ T7 ARCA mRNA, NEB), либо посредством транскрипции без кэпа (набор HiScribe™ T7 High Yield РНК Synthesis Kit, NEB) с последующим добавлением 5'-кэпа 1 (система Vaccinia Capping System, mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase, NEB). Затем РНК очищали с использованием экстракции фенолом/хлороформом, или очистки на колонке (набор Monarch® РНК Cleanup Kit, NEB). Концентрацию РНК определяли по оптической плотности при 260 нм (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

[0180] Репликация: РНК трансформировали посредством электропорации в клетки ВНК-21 или Vero (например, 4D-Nucleofector™, Lonza). Через 15-22 час после трансформации, клетки фиксировали и пермеабелизировали (набор eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen) и окрашивали с использованием конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела против дцРНК (J2, Scicons) для количественной оценки частоты дцРНК+ клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI) дцРНК в индивидуальных клетках посредством флуоресцентной проточной цитометрии.

[0181] Экспрессия белка: РНК трансформировали посредством электропорации в клетки ВНК-21 или Vero (например, 4D-Nucleofector™, Lonza). ESR1: Через 15-22 часов после трансформации, клетки собирали и лизировали в буфере RIPA. Концентрацию белка в лизате нормализовали, затем анализировали в иммуноблоте с использованием в качестве зонда антитела кролика против ERα (A300-497A, Bethyl) и визуализировали с использованием конъюгированного с AF800 антитела козы против антител кролика (A32735, Thermo) (ФИГ. 2А). Сигнал флуоресценции из образцов клеток, трансформированных синтетическим моногенным репликоном EEEV, экспрессирующим ESR1, использовали для нормализации уровней экспрессии для оценки относительной экспрессии ESR1 из панели бигенных и тетрагенных репликонов (ФИГ. 2В). РІЗК: через 15-22 часов после трансформации, клетки собирали и лизировали в буфере RIPA. Концентрацию белка в лизате нормализовали, затем анализировали в иммуноблоте с

использованием в качестве зонда антитела кролика против РІЗКСА (РА587398, Thermo) и визуализировали с использованием конъюгированного с AF800 антитела козы против антител кролика (А32735, Thermo) (**ФИГ. 2С**). Сигнал флуоресценции из образцов клеток, трансформированных синтетическим моногенным репликоном EEEV, экспрессирующим ESR1, использовали для нормализации уровней экспрессии для оценки относительной экспрессии РІЗК из панели бигенных и тетрагенных репликонов (**ФИГ. 2D**). HER2: Через 15-22 часов после трансформации, клетки фиксировали и пермеабилizировали (набор eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen) и окрашивали с использованием конъюгированного с AF488 мышиногo моноклонального антитела против HER2 (24D2, Biolegend). Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) AF488 используют в качестве считывания экспрессии HER2. MFI клеток, трансформированных синтетическим моногенным репликоном EEEV, экспрессирующим HER2, использовали для нормализации уровней экспрессии для оценки относительной экспрессии HER2 из панели бигенных и тетрагенных репликонов (**ФИГ. 2E**). HER3: через 15-22 часов после трансформации, клетки фиксировали и пермеабилizировали (набор eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen) и окрашивали с использованием конъюгированного с APC мышиногo моноклонального антитела против HER3 (1В4С3, Biolegend). Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) APC использовали в качестве считывания экспрессии HER3. MFI клеток, трансформированных синтетическим моногенным репликоном EEEV, экспрессирующим HER3, использовали для нормализации уровней экспрессии для оценки относительной экспрессии HER3 из панели бигенных и тетрагенных репликонов (**ФИГ. 2F**). Нормализованные данные экспрессии ESR1, РІЗК, HER2 и HER3 с тетрагенных репликонов визуализировали на радиальной диаграмме (**ФИГ. 2G**).

ПРИМЕР 3

Оценка *in vivo* модифицированных векторов EEEV

[0182] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vivo*, проведенных для оценки любых дифференциальных иммунных ответов после вакцинации с использованием синтетических конструкций репликонов EEEV, описанных в настоящем описании (например, как не формулированных, так и формулированных с LNP векторов).

[0183] В этих экспериментах, синтетические конструкции репликонов, происходящие из EEEV штамма FL93-939, конструировали и впоследствии оценивали.

[0184] Мыши и инъекции. Мышей BALB/c закупали из Charles River Labs, Envigo или Jackson Laboratories. На сутки дозирования, между 0,01-10 мкг материала инъецировали внутримышечно либо в одну, либо разделенными на обе четырехглавые мышцы. Векторы вводили либо не формулированными, в солевом растворе, либо формулированными с LNP. Животных мониторовали по массе тела и другим общим наблюдениям на протяжении курса исследования. Для исследований иммуногенности, животных подвергали дозированию только на сутки 0 или на сутки 0 и сутки 21.

[0185] Формулирование LNP. Репликон РНК формулировали в липидные

наночастицы с использованием микроструйного смесителя и анализировали по размеру частиц, полидисперсности, с использованием динамического светорассеяния, и эффективности инкапсуляции. Липиды суспендировали в этаноле. Для L1, РНК суспендировали в 10 мМ цитратном буфере, рН 5,0, при концентрации 172 мкг/мл, и смешивали при скорости потока 3:1 (водный:органический). Для L2, РНК суспендировали в 250 мМ NaOAc рН 4,0, при концентрации 82 мкг/мл, и смешивали при скорости потока 3:1 (водный:органический).

[0186] *ELISpot.* Для измерения амплитуды специфических для ESR1, HER2 и HER3 ответов Т-клеток, анализ IFN γ ELISpot проводили с использованием набора Mouse IFN γ ELISpot PLUS Kit (HRP) (MabTech), по инструкциям производителя. Кратко, спленоциты выделяли и ресуспендировали до концентрации 5×10^6 клеток/мл в средах, содержащих пептиды, происходящие из ESR1, HER2 и HER3, РМА/иономицин в качестве положительного контроля, или DMSO в качестве ложной стимуляции.

Оценка линкеров

[0187] Результаты детектирующего IFN γ мыши анализа ELISpot, как измерено посредством пятнообразующих единиц, соответствующих отвечающим Т-клеткам селезенки через 14 суток после внутримышечной инъекции моногенного репликона РНК, кодирующего мутации ESR1 в различных порядках и соединенные между собой посредством различных линкеров, показаны на **ФИГ. 1**. Линкеры AAY, EAAAK, RVRR, GGGGS и GP GPG, которые тестировали в меняющихся порядках в кассете антигена ESR1, содержащего мутации K303R, E380Q, Y537C, Y537S, Y537N и D538G. Столбцы для каждой кассеты соответствуют следующим условиям стимуляции с использованием одного пептида в порядке K303R, E380Q, Y537N, Y537S, Y537C, D538G, ESR1 дикого типа и среды. Ответы тотальных Т-клеток (нанесенные на график как подсчитанные пятнообразующие единицы на миллион клеток) показаны на у-оси. Для линкера GGGGS в порядке 1 получены наиболее сильные ответы Т-клеток.

Оценка количества и порядка генов

[0188] Результаты детектирующего IFN γ мыши анализа ELISpot, как измерено посредством пятнообразующих единиц, соответствующих отвечающим Т-клеткам селезенки на сутки 35 после двух внутримышечных инъекций репликона РНК, кодирующего ESR1, HER2 и HER3, показаны на **ФИГ. 3**. Различные конструкции, в моногенной, бигенной или тетрагенной форме, имеющие различные порядки и соединения последовательностей ESR1, P13K, HER2 и HER3, тестировали, чтобы определить, для какой конфигурации генов в конструкциях получены наиболее сильные ответы Т-клеток после стимуляции. На Y-оси показаны ответы тотальных Т-клеток. Ответы на P13K не измеряли в этом эксперименте, поскольку он не вызывает ответов у мышей BALB/c.

Оценка порядка генов и липидного состава

[0189] Результаты детектирующего IFN γ мыши анализа ELISpot, как измерено посредством пятнообразующих единиц, соответствующих отвечающим Т-клеткам

селезенки на сутки 35 после двух внутримышечных инъекций репликона РНК, либо в солевом растворе, либо формулированного в двух различных композициях LNP L1 или L2, кодирующего ESR1, PI3K, HER2 и HER3, показаны на **ФИГ. 5**. Различные тетрагенные конструкции, имеющие различные остовы вектора репликона, тестировали для определения того, для какого вектора репликона РНК и состава получены наиболее сильные ответы Т-клеток при стимуляции.

ПРИМЕР 4

Эффективность для положительного по рецептору эстрогенов рака молочной железы

[0190] Две модели эффективности показаны на **ФИГ. 6** для имитации двух клинических сценариев. В терапевтической модели, линию клеток опухоли, экспрессирующую придающую устойчивость мутацию, подвергаемую нацеливанию посредством вакцины, имплантируют сначала. Вакцинацию проводят потом. Это моделирует сценарий лечения пациентов с предсуществующими мутациями. В профилактической модели, вакцинацию проводят до имплантации линии клеток опухоли, кодирующей придающую устойчивость мутацию, включенную в вакцину. Этот сценарий имитирует лечение пациентов до возникновения приобретенных мутаций. Введение репликона РНК, кодирующего мутацию(и), экспрессируемую линией клеток опухоли, должно вызывать сильные ответы Т-клеток у мышей, которые могут приводить к задержке роста опухоли. Если рост опухоли не задерживается, является вероятным, что линия клеток опухоли эволюционировала до потери подвергаемой нацеливанию мутации, что показывает, что репликон РНК являлся способным оказывать селективное давление посредством иммунной системы для потери активирующей мутации.

[0191] В то время как описаны конкретные альтернативы по настоящему изобретению, следует понимать, что различные модификации и комбинации являются возможными, и предусмотрены в рамках истинного содержания и объема прилагаемой формулы изобретения. Таким образом, не существует намерения ограничения точным рефератом и описанием, представленными в настоящем документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированные геном или самореплицирующаяся РНК (срРНК) вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), где по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного генома или срРНК EEEV, была заменена на кодирующую последовательность для полипептидной конструкции, содержащей:

а) кодирующую последовательность для рецептора эстрогенов 1 (ESR1) или его варианта;

б) кодирующую последовательность для PI3K или его варианта;

с) кодирующую последовательность для HER2 или его варианта и

д) кодирующую последовательность для HER3 или его варианта.

2. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где модифицированные геном или срРНК EEEV не содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вирусные структурные белки.

3. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая модифицированные EEEV или срРНК, является функционально связанной с промоторной последовательностью.

4. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где кодирующие последовательности из (а) - (д) являются функционально связанными друг с другом в пределах одной открытой рамки считывания (ORF).

5. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где кодирующие последовательности из (а) - (д) являются функционально связанными друг с другом посредством одной или более соединительных последовательностей, кодирующих аутопротеолитический пептид или внутренний участок связывания рибосомы (IRES).

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, где аутопротеолитический пептид содержит одну или более последовательностей аутопротеолитического расщепления из кальций-зависимой сериновой эндопротеазы (фурина), 2А тешовируса-1 свиней (P2A), 2А вируса ящура (FMDV) (F2A), 2А вируса ринита А лошадей (ERAV) (E2A), 2А вируса *Thosea asigna* (T2A), 2А вируса цитоплазматического полиэдроза (BmCPV2A), 2А вируса фляшерии (BmIFV2A) или их комбинацию.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, где внутренний участок связывания рибосомы (IRES) происходит из IRES ассоциированного с саркомой Капоши вируса герпеса (KSHV), IRES вируса гепатита, IRES пестивируса, IRES крипавируса, IRES вируса черемуховой тли, IRES фактора роста фибробластов, IRES фактора роста тромбоцитов, IRES фактора роста эндотелия сосудов, IRES инсулиноподобного фактора роста, IRES пикорнавируса, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), IRES Pim-1, IRES p53, IRES Araf-1, IRES TDP2, IRES L-мус и IRES с-мус.

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где по меньшей мере одна из кодирующих последовательностей из (а) - (д) содержит одно или более молекулярных

изменений.

9. Нуклеиновая кислота по п.8, где одно или более молекулярных изменений введены в конфигурацию множества изменяющих кассет, аранжированных в тандеме вдоль длины кодирующей последовательности.

10. Нуклеиновая кислота по п.9, где множество изменяющих кассет являются функционально связанными друг с другом посредством одного или более линкеров.

11. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.8, где кодирующая последовательность для варианта ESR1 в (a) содержит одно или более молекулярных изменений, стимулирующих независимые от лиганда виды активности рецептора.

12. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.11, где одно или более молекулярных изменений содержит активирующую мутацию, выбранную из группы, состоящей из K303R, E380Q, Y537C, Y537S, Y537N и D538G.

13. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.8, где вариант PI3K в (b) содержит одно или более молекулярных изменений, стимулирующих независимые от лиганда виды активности рецептора.

14. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.13, где одно или более молекулярных изменений содержит активирующую мутацию, выбранную из группы, состоящей из E542K, E545K, H1047L и H1047R.

15. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где вариант HER2 в (c) содержит кодирующую последовательность для внеклеточного домена и трансмембранного домена.

16. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где вариант HER3 в (d) содержит кодирующую последовательность для неактивного в качестве киназы HER3.

17. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-10.

18. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где кодирующая последовательность для полипептидной конструкции содержит, в направлении от 5'- до 3'-:

a) кодирующую последовательность для варианта PI3K, содержащего одну или более активирующих мутаций, выбранных из E542K, H1047L, E545K и H1047R;

b) кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида P2A;

c) кодирующую последовательность для варианта HER2, содержащего внеклеточный домен и трансмембранный домен;

d) кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида P2A;

e) кодирующую последовательность для неактивного в качестве киназы варианта HER3;

f) кодирующую последовательность для внутреннего участка связывания рибосомы (IRES); и

g) кодирующую последовательность для варианта ESR1, содержащего одну или более активирующих мутаций, выбранных из Y537C, E380Q, K303R, Y537S, D538G и Y537N.

19. Рекомбинантная клетка, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1.

20. Рекомбинантная клетка по п.19, представляющая собой клетку млекопитающего или клетку насекомого.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент и:

конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, где композиция составлена с носителем для доставки в систему доставки, где система доставки содержит липосому, частицу вирусного репликона (VRP), наночастицу на основе липидов (LNP), полимерную наночастицу, физиологический буфер, микросферу, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), конъюгат биоактивного лиганда или комбинацию любых из них.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, где липид присутствует в массовом отношении липида к РНК от приблизительно 100:1 до приблизительно 4:1.

24. Фармацевтическая композиция по п.22, где наночастицы на основе липидов имеют средний диаметр от приблизительно 25 нм до приблизительно 1000 нм.

25. Фармацевтическая композиция по п.21, где композиция составлена в качестве вакцины.

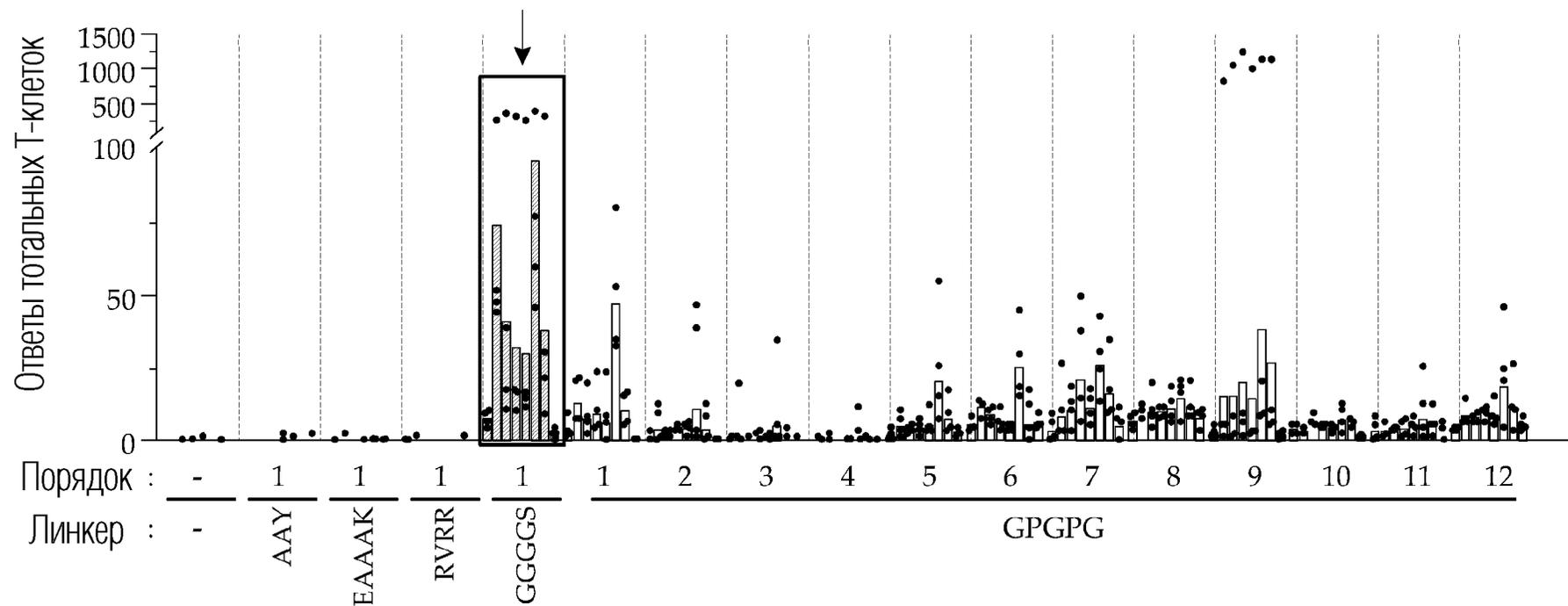
26. Способ индукции иммунного ответа или лечения нарушения здоровья у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты по п.1.

27. Способ по п.26, представляющий собой способ индукции иммунного ответа.

28. Способ по п.26, представляющий собой способ лечения злокачественной опухоли.

29. Способ по п.28, где злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы.

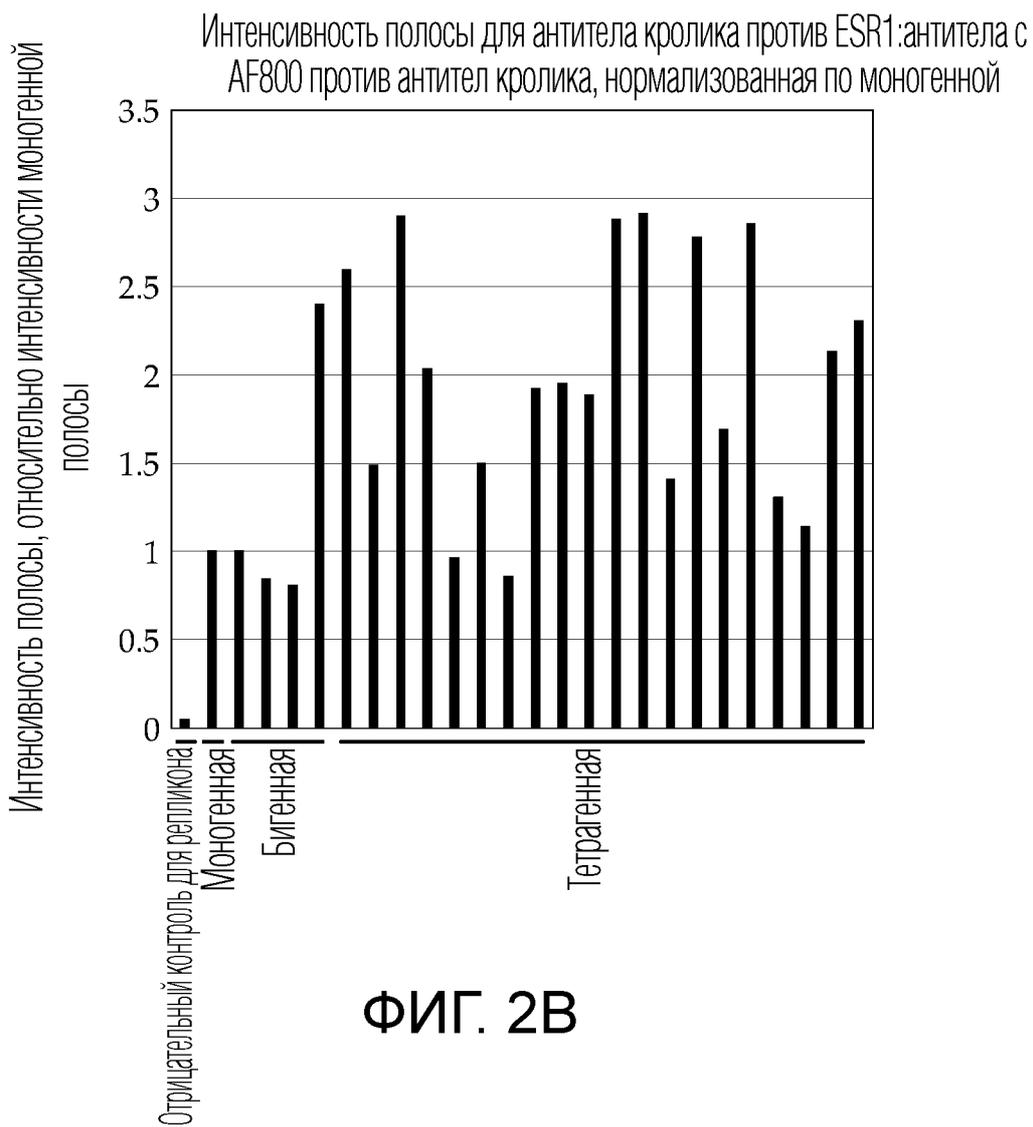
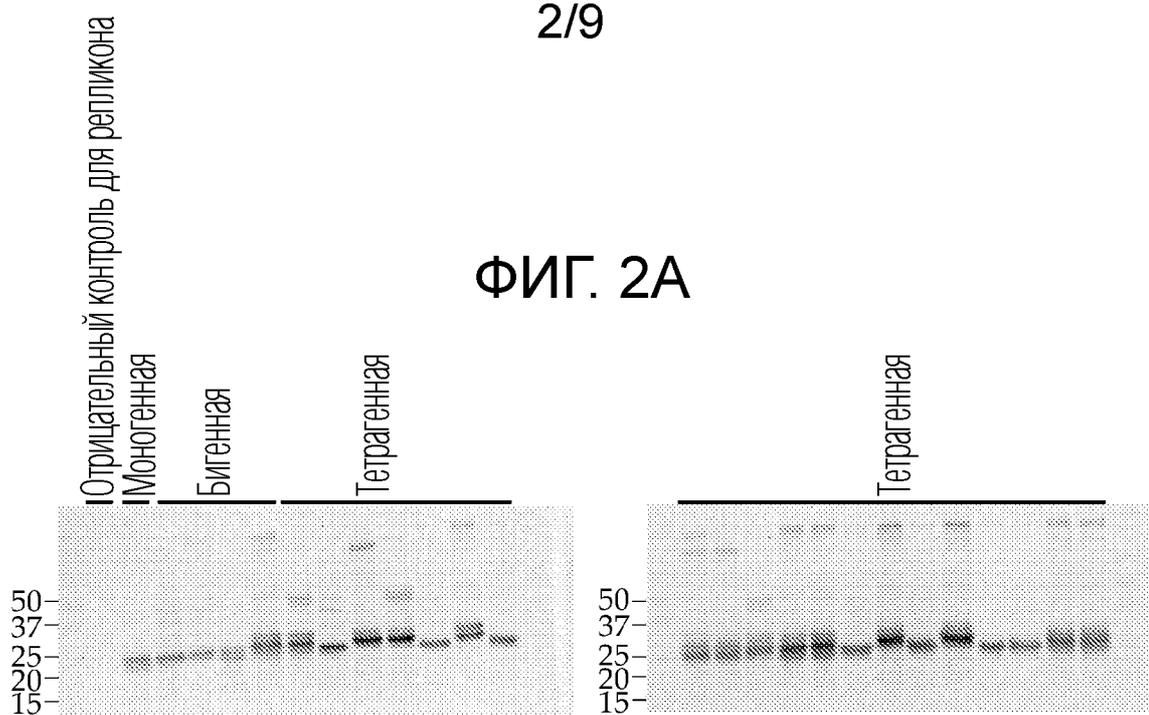
30. Способ по п.25, где композицию вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в комбинации с по меньшей мере одним из видов дополнительной терапии.



Порядок стимуляций: K303R, E380Q, Y537N, Y537S, Y537C, D538G, WT, среды

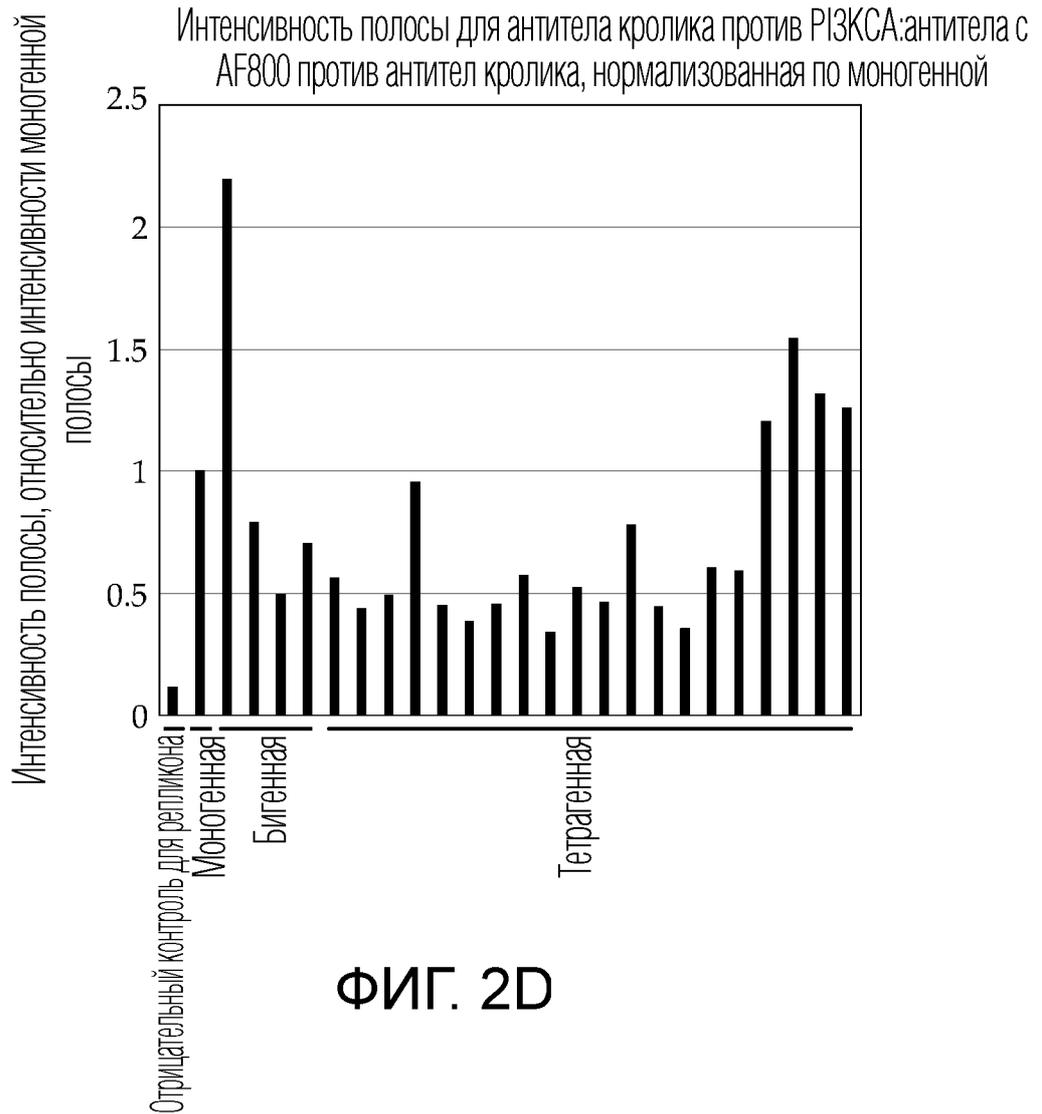
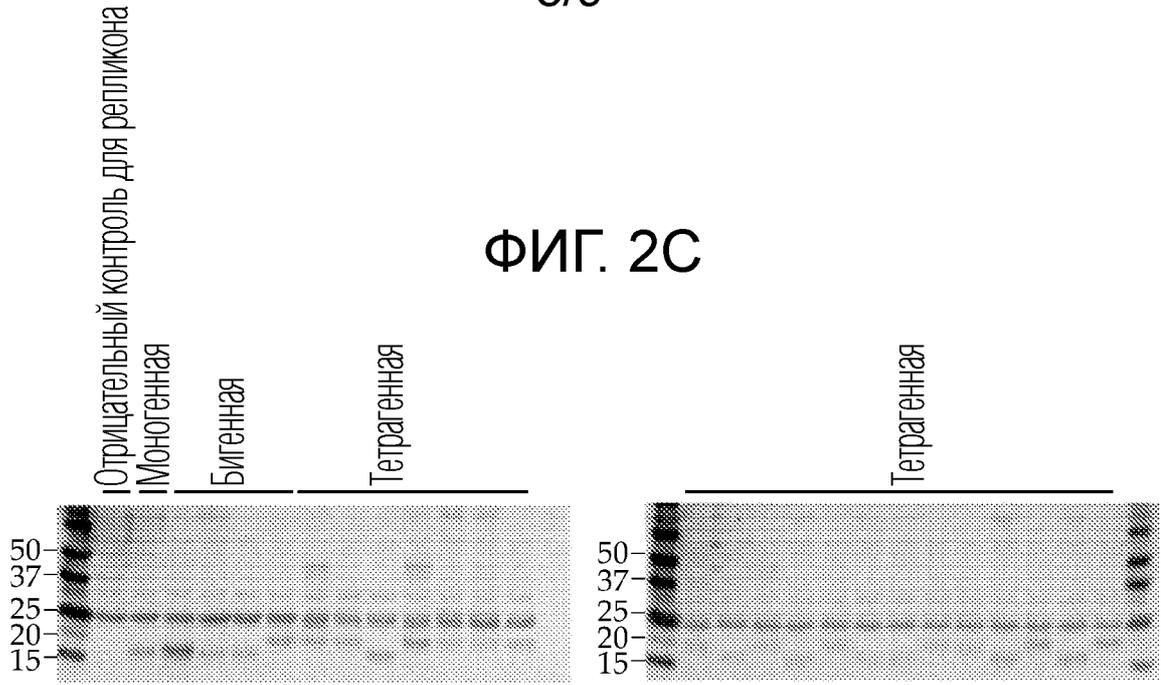
ФИГ. 1

ФИГ. 2А

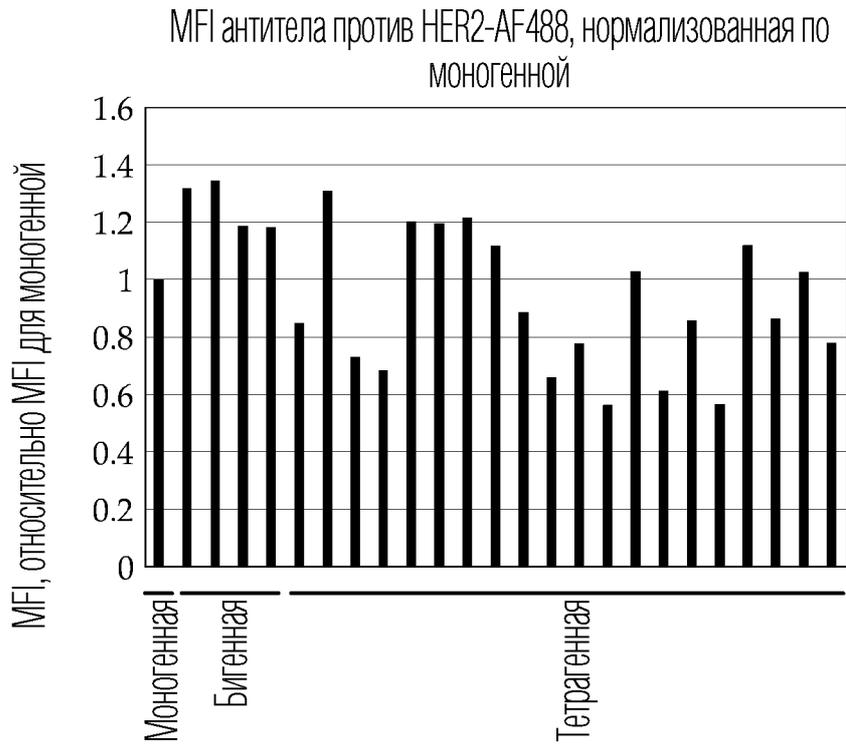


ФИГ. 2В

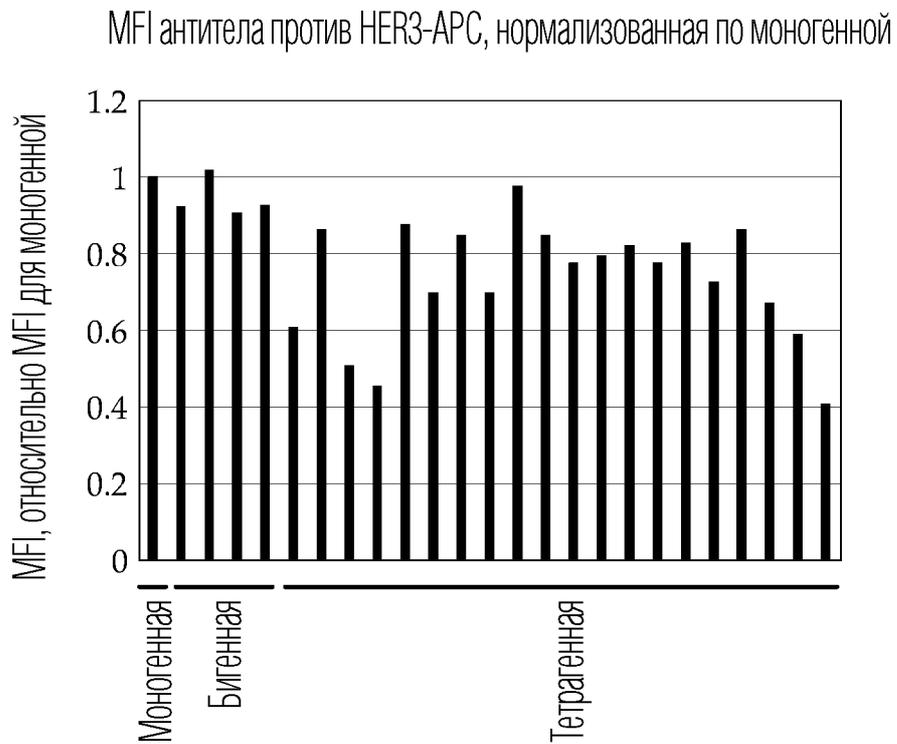
ФИГ. 2С



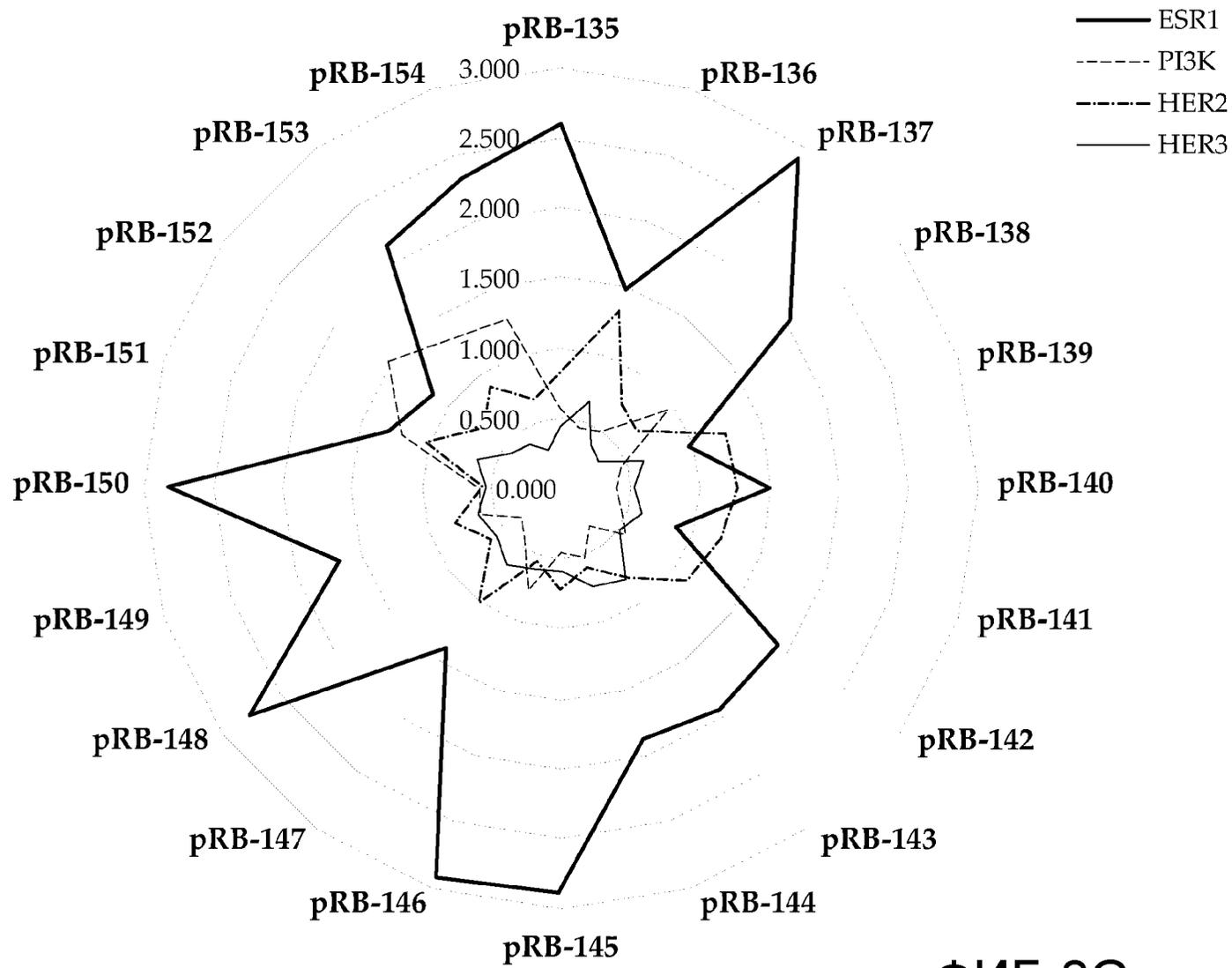
ФИГ. 2D



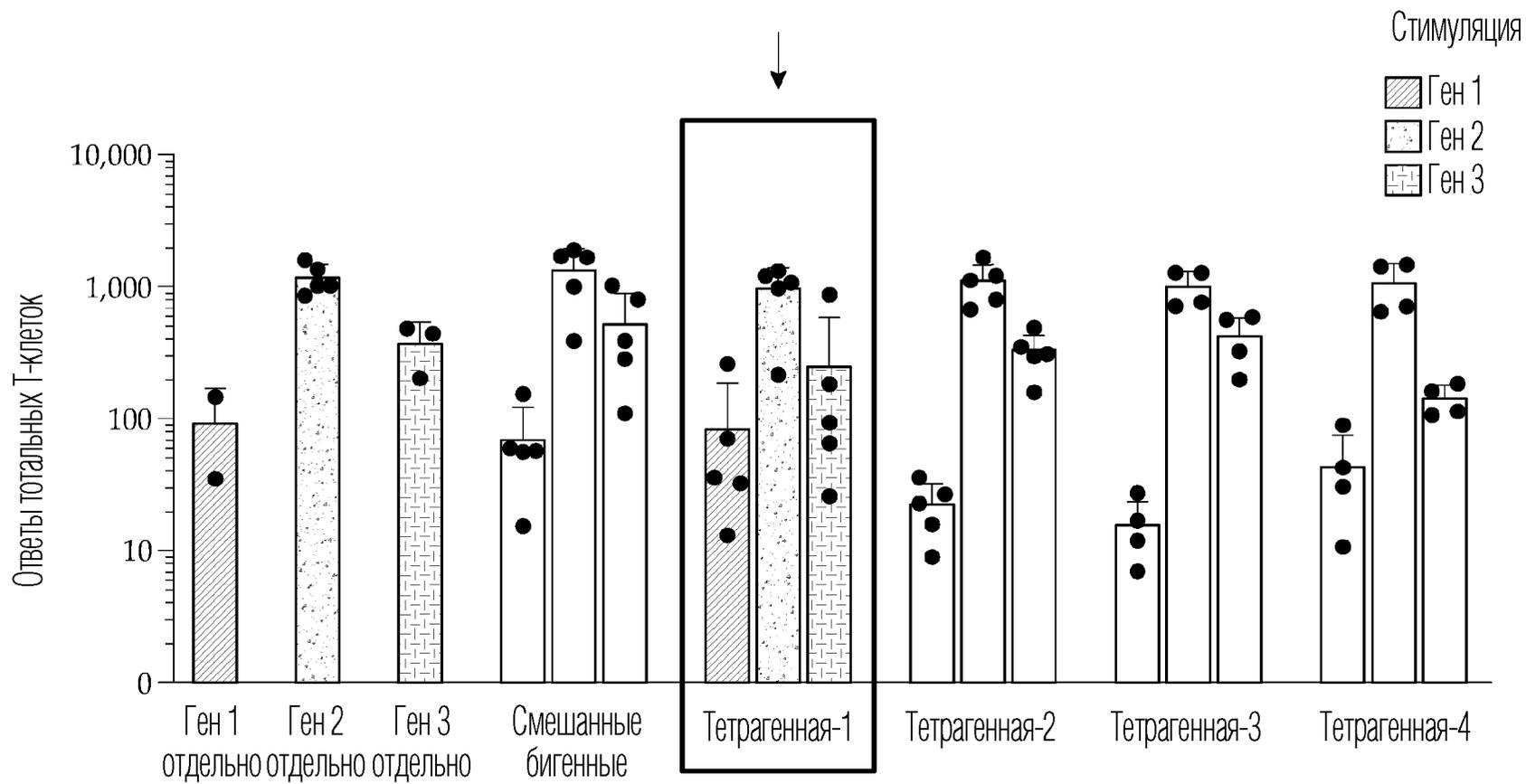
ФИГ. 2Е



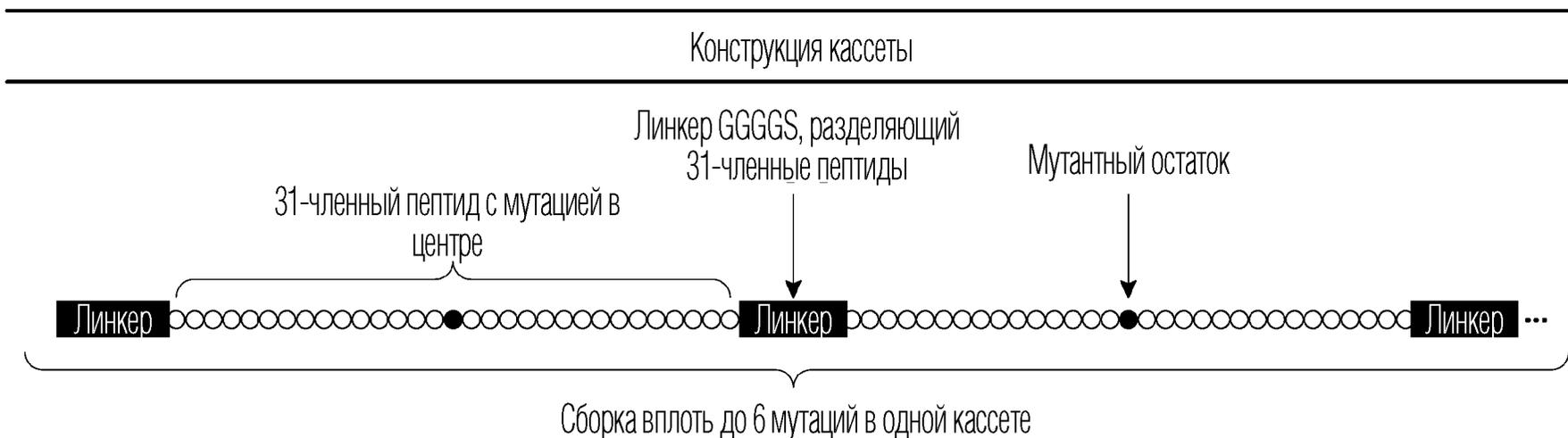
ФИГ. 2F



ΦΙΓ. 2G



ФИГ. 3



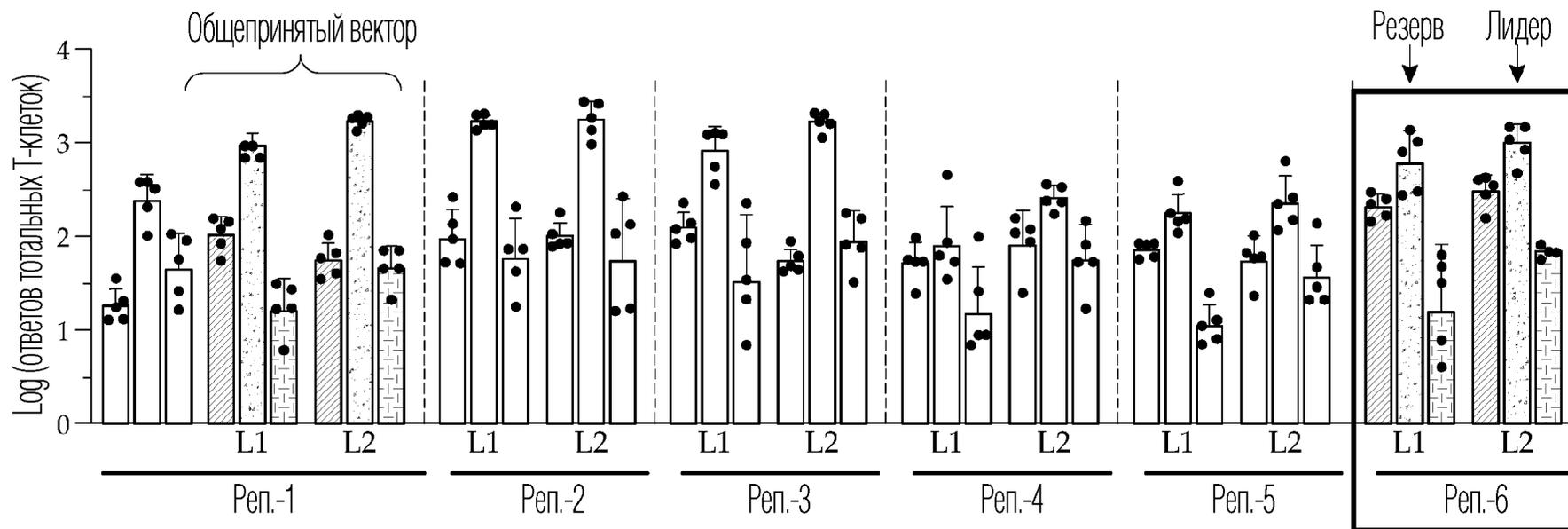
ФИГ. 4

Ответы для специфической устойчивости: ESR1 

Ответы для обходной устойчивости: HER2  , HER3 

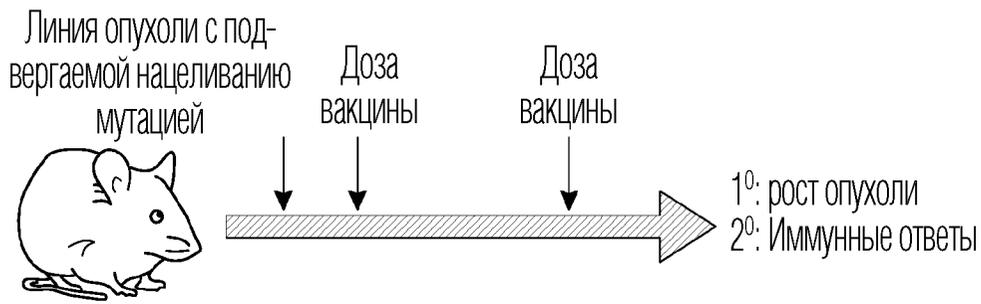
Наивысшие ответы для специфической устойчивости (в 2-5х выше, чем для VEE.TC83)

Сравнимые ответы для обходной устойчивости

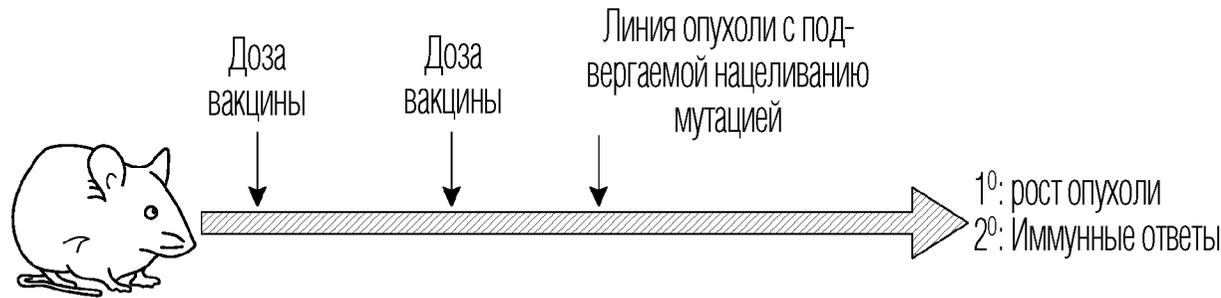


ФИГ. 5

Терапевтическая
Моделирует лечение
пациентов с предше-
ствующими мутациями



Профилактическая
Моделирует лечение паци-
ентов без предше-
ствующих мутаций



ФИГ. 6