

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491940** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.11.15**

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)  
**C12P 21/00** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2023.01.27**

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ МОЛЕКУЛ РНК**

(31) **63/303,886**

(72) Изобретатель:

(32) **2022.01.27**

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

(33) **US**

(86) **PCT/US2023/061489**

(74) Представитель:

(87) **WO 2023/147498 2023.08.03**

**Медведев В.Н. (RU)**

(71) Заявитель:

**РЕПЛИКЕЙТ БАЙОСАЙЕНС, ИНК.  
(US)**

(57) Настоящее изобретение, в целом, относится к способам получения функциональных самореплицирующихся РНК из нефункциональных однопочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК), таких как геномы альфавирусов, или срРНК. Более конкретно, способы относятся к сборке множества фрагментов нуклеиновой кислоты для получения de novo функциональных срРНК. Также настоящее изобретение относится к композициям, конструкциям нуклеиновой кислоты, векторам и рекомбинантным клеткам, включающим такие функциональные срРНК. Также в настоящем изобретении раскрыты способы индукции фармакодинамического эффекта у субъекта, а также способы профилактики и/или лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом.



**A1**

**202491940**

**202491940**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581771EA/061

### СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ МОЛЕКУЛ РНК

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

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США с серийным номером 63/303886, поданной 27 января 2022 г. Содержание вышеуказанной заявки специально включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, включая все фигуры.

#### **Область техники**

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к области молекулярной вирусологии и иммунологии. В частности, настоящее изобретение относится к новым способам получения функциональных самореплицирующихся РНК (срРНК), например, репликонов. Более конкретно, изобретение относится к способам получения функциональных срРНК из нефункциональных вирусных РНК-геномов с одноцепочечной положительной смысловой цепью (+оцРНК) или нефункциональных срРНК или комбинаций функциональных и нефункциональных срРНК. Изобретение также относится к композициям, содержащим такие функциональные срРНК.

#### **Уровень техники**

[0003] В последние годы несколько различных групп вирусов животных подвергались генетическим манипуляциям либо путем гомологичной рекомбинации, либо путем прямого конструирования их геномов. Доступность систем обратной генетики как для ДНК-, так и для РНК-вирусов создала новые перспективы для применения рекомбинантных вирусов, например, в качестве вакцин, экспрессионных векторов, противоопухолевых агентов, векторов генной терапии и средств доставки лекарственных препаратов.

[0004] Многие экспрессионные векторы на основе вирусов были использованы для экспрессии гетерологичных белков в культивируемых рекомбинантных клетках, и применение модифицированных вирусных векторов для экспрессии генов в клетках-хозяевах продолжает развиваться. Недавние достижения в этом отношении включают дальнейшее развитие способов и систем для получения мультисубъединичных белковых комплексов и коэкспрессию ферментов, модифицирующих белок, для повышения продукции гетерологичного белка. Другие недавние достижения в области технологий вирусных экспрессионных векторов включают множество передовых применений генной инженерии для контроля экспрессии генов, получения вирусных векторов, применений генной терапии *in vivo* и создания векторов для доставки вакцин.

[0005] Самореплицирующиеся молекулы РНК (срРНК), которые реплицируются в клетках-хозяевах, могут повысить эффективность доставки РНК и экспрессии кодированных генных продуктов за счет увеличения количества РНК, кодирующей желаемый генный продукт. Молекулы срРНК могут быть основаны, например, на срРНК

из альфавирусов. У различных видов и подвидов альфавирусов развился уникальный и разнообразный механизм в отношении иммуномодуляции и экспрессии генов у разных хозяев и в разных тканях. Их неисследованные свойства могут оказать большое влияние на здоровье человека при использовании в качестве срРНК векторов для экспрессии желаемого представляющего интерес гена (GOI), такого как антигены для вакцинации или терапевтические белки. Однако опубликованные или депонированные последовательности геномов альфавирусов часто являются неточными или неполными. Даже некоторые точные последовательности альфавирусов не подходят для получения срРНК, способных к саморепликации и экспрессии генов.

[0006] Существует необходимость в эффективных и экономически выгодных способах получения функциональных срРНК, которые могут быть использованы для экспрессии представляющих интерес продуктов. Также необходимы способы, позволяющие генерировать функциональные молекулы срРНК из нефункциональных геномов альфавирусов или других РНК-вирусов с одноцепочечной положительной смысловой цепью

### **Сущность изобретения**

[0007] Настоящее изобретение, помимо прочего, относится к способам получения функциональных самореплицирующихся РНК (срРНК), например, репликонов, из вирусных одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК), таких как геномы альфавирусов. Функциональные срРНК подходят для экспрессии представляющих интерес молекул, например, таких как вакцины и терапевтические полипептиды. Также настоящее изобретение относится к функциональным срРНК, конструкциям нуклеиновой кислоты, векторам и рекомбинантным клеткам, экспрессирующим такие конструкции срРНК, а также фармацевтическим композициям, содержащим их. Также настоящее изобретение относится к способам индукции фармакодинамического эффекта у субъекта и, в частности, к способам индукции иммунного ответа и способам профилактики и/или лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, где способы включают профилактическое или терапевтическое введение одной или более функциональных срРНК, конструкций нуклеиновой кислоты, векторов, рекомбинантных клеток и/или фармацевтической композиции по изобретению.

[0008] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения функциональной самореплицирующейся РНК (срРНК), например, репликона, где способ включает: (a) получение одного или более вирусных одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК) или нефункциональных срРНК, где по меньшей мере один из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК является нефункциональным, (b) удаление одного или более сайтов терминации транскрипции РНК-полимеразы или криптоических сайтов терминации транскрипции из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК, (c) создание множества фрагментов нуклеиновой кислоты, каждый из которых содержит нуклеотидную последовательность,

полученную из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК, и (d) сборку множества фрагментов нуклеиновой кислоты для получения функциональной собранной *de novo* срРНК.

[0009] Неограничивающие варианты осуществления способов по изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов терминации РНК-полимеразы или криптических сайтов терминации включают сайт терминации бактериофага T7 или криптический сайт терминации T7. В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов терминации РНК-полимеразы представляют собой сайт терминации РНК-полимеразы SP6 или криптический сайт терминации РНК-полимеразы SP6. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов нуклеиновой кислоты, каждый из которых имеет длину от приблизительно 60 нуклеотидов до приблизительно 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечные или двухцепочечные нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления функциональная собранная *de novo* срРНК не содержит по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков. В некоторых вариантах функциональная собранная *de novo* срРНК не содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков. В некоторых вариантах функциональная собранная *de novo* срРНК не содержит значительного участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующего один или более вирусных структурных белков. В некоторых вариантах функциональная собранная *de novo* срРНК не содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки.

[0010] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК представляет собой вирус, относящийся к роду *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК представляет собой вид альфавируса, относящийся к группе VEEV/EEEV, или группе SFV, или группе SINV. Примеры альфавирусов, подходящих для композиций и способов, раскрытых в настоящем изобретении, включают вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MIDV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус О'Ньонг-Ньонг (ONNV), вирус Росс-Ривер (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Маяро (MAYV), вирус Уна (UNAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHAIV), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайлендс J (HJV), вирус Форт Морган (FMV), вирус Ндumu (NDUV), вирус Мадариага (MADV) и вирус Багги-Крик. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из вирусных +оцРНК геномов или срРНК представляет собой вирус

восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус Синдбис (SINV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), вирус Мадариага (MADV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV) или вирус леса Семлики (SFV).

[0011] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают вставку последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный ген, в собранную *de novo* срРНК. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген функционально связан с субгеномным (sg) промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор sg является субгеномным промотором 26S.

[0012] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают удаление одного или более сайтов рестрикции из одного или более +оцРНК геномов или срРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из удаленных сайтов рестрикции распознается рестриктазой, подходящей для линейаризации собранной *de novo* срРНК или для вставки гетерологичного гена в собранную *de novo* срРНК. В некоторых вариантах осуществления полученная функциональная собранная *de novo* срРНК включает 3'-полиаденилатный тракт (поли(А)-хвост). В некоторых вариантах осуществления 3'-поли(А)-хвост включает по меньшей мере 11 адениннуклеотидов.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают замену одной или более нетранслируемых областей (UTR) или их участка в собранной *de novo* срРНК в UTR из другого вида или подвида вирусного +оцРНК генома. В некоторых вариантах осуществления UTR или ее участок получены из другого штамма того же вида +оцРНК вируса. В некоторых вариантах осуществления UTR или ее участок представляет собой 3'-UTR, 5'-UTR или участок любой из них. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают выбор UTR из вирулентного вида или авирулентного вида +оцРНК вируса.

[0014] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают замену неструктурного белка (nsP) или его участка в собранной *de novo* срРНК на гетерологичный nsP. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный nsP или его участок происходит из другого вида или подвида +оцРНК вируса. В некоторых вариантах осуществления nsP или его участок происходит из другого штамма того же вида +оцРНК вируса. В некоторых вариантах осуществления nsP или его участок представляет собой nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 или участок любого из них. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают выбор nsP или UTR из вирулентного вида или авирулентного вида +оцРНК вируса.

[0015] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают оценку функциональности собранной *de novo* срРНК. В некоторых вариантах осуществления оценка функциональности проводится *in vitro*, *in vivo* и/или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления оценка функциональности включает анализ собранной *de novo* срРНК в отношении способности к саморепликации *in vivo* и/или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления оценка функциональности включает анализ, выбранный из группы, состоящей из: детекции репликации РНК, детекции экспрессии

вирусного белка, детекции цитопатического эффекта (CPE) и детекции экспрессии гетерологичного гена. В некоторых вариантах осуществления оценка функциональности собранной *de novo* сРНК не включает вставку последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный ген, в собранную *de novo* сРНК.

[0016] В одном аспекте настоящее изобретение относится к функциональным самореплицирующимся РНК (сРНК), полученным способом, раскрытым в настоящем изобретении, где функциональные сРНК включают гетерологичную UTR и/или гетерологичный nsP.

[0017] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновой кислоты, кодирующим сРНК, раскрытую в настоящем изобретении. В связанном аспекте настоящее изобретение относится к векторам, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении.

[0018] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, включающим: (а) функциональную сРНК, описанную в настоящем изобретении, (b) конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, или (с) вектор, описанный в настоящем изобретении. Неограничивающие варианты осуществления рекомбинантных клеток по изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку насекомого. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку комара. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки почки обезьяны CV1, трансформированной SV40 (COS-7), клетки эмбриональной почки человека (например, клетки НЕК 293 или НЕК 293), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки Сертоли мыши (например, клетки ТМ4), клетки почки обезьяны (например, CV1), клетки карциномы шейки матки человека (например, HeLa), клетки почки собаки (например, MDCK), клетки печени крысы-буйвола (например, BRL 3A), клетки легкого человека (например, W138), клетки печени человека (например, Hep G2), клетки опухоли молочной железы мыши (например, ММТ 060562), клетки TRI, клетки FS4, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), клетки почки африканской зеленой мартышки (например, клетки Vero), клетки человека A549, клетки шейки матки человека, клетки человека CHME5, клетки человека PER.C6, клетки мышинной миеломы NS0, клетки эпидермоида гортани человека, клетки-фибробласта человека, клетки человека HUH-7, клетки человека MRC-5, мышечной клетки человека, эндотелиальной клетки человека, клетки-астроцита человека, клетки-макрофага человека, клетки человека RAW 264.7,

клетки мышцы 3Т3, клетки мышцы L929, клетки соединительной ткани мышцы, мышечной клетки мышцы и клетки почки кролика.

[0019] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим: (a) функциональную срРНК, описанную в настоящем изобретении, (b) конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, (c) вектор, описанный в настоящем изобретении, (c) рекомбинантную клетку, описанную в настоящем изобретении.

[0020] Неограничивающие варианты осуществления фармацевтических композиций по изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают функциональную срРНК, описанную в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают вектор, описанный в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают рекомбинантную клетку, описанную в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют в липосоме, липидной наночастице (LNP), полимерной наночастице, полиплексе, вирусной репликонной частице (VRP), микросфере, иммуностимулирующем комплексе (ISCOM), конъюгате биоактивного лиганда или комбинации любого из них. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является иммуногенной композицией. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию составляют в виде вакцины. В некоторых вариантах композиция является по существу неиммуногенной для субъекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют в виде адьюванта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутрибрюшинного введения, внутримышечного введения, интратрахеального введения, интранодального введения, интратуморального введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения, интратекального введения, внутриглазного, ректального и перорального введения.

[0021] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к наборам для практического применения способа, раскрытого здесь. В некоторых вариантах осуществления наборы включают: (a) функциональную срРНК, описанную здесь, (b) конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную здесь, (c) вектор, описанный здесь, (d) рекомбинантную клетку, описанную здесь, и/или (e) фармацевтическую композицию, описанную здесь.

[0022] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к трансгенным животным, включающим: (a) функциональную срРНК, описанную здесь, (b) конструкцию

нуклеиновой кислоты, описанную здесь, (с) вектор, описанный здесь, и/или (d) рекомбинантную клетку, описанную здесь. Неограничивающие примерные варианты осуществления трансгенных животных по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления животное является позвоночным животным или беспозвоночным животным. В некоторых вариантах осуществления животное является насекомым. В некоторых вариантах осуществления животное является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является млекопитающим, отличным от человека.

[0023] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения представляющего интерес полипептида, включающим: (i) разведение трансгенного животного, описанного в настоящем изобретении, или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, включающей конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, в условиях, при которых рекомбинантная клетка продуцирует полипептид, кодируемый срРНК.

[0024] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам индукции фармакодинамического эффекта у субъекта, включающим: введение субъекту композиции, включающей: (a) функциональную срРНК, описанную в настоящем изобретении, (b) конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, (c) рекомбинантную клетку, описанную в настоящем изобретении, и/или (d) фармацевтическую композицию, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, фармакодинамический эффект включает в себя индукцию иммунного ответа у субъекта.

[0025] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам профилактики или лечения патологического состояния у субъекта, где способ включает введение субъекту композиции, включающей: (a) функциональную срРНК, описанную в настоящем изобретении, (b) конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, (c) рекомбинантную клетку, описанную в настоящем изобретении, и/или (d) фармацевтическую композицию, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фармакодинамический эффект включает в себя индукцию иммунного ответа у субъекта.

[0026] Вышеизложенная сущность изобретения является только иллюстративной и не предназначена для ограничения каким-либо образом. В дополнение к иллюстративным вариантам осуществления и признакам, описанным в настоящем изобретении, дополнительные аспекты, варианты осуществления, объекты и признаки изобретения станут полностью очевидными из фигур, подробного описания и формулы изобретения.

### **Краткое описание фигур**

[0027] На фиг. 1А приведено графическое представление примера альфавируса и депонированной последовательности. Альфавирус имеет 5'-UTR, нуклеиновые кислоты, кодирующие четыре неструктурных белка nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, субгеномный промотор 26S, структурный полипротеин и 3'-UTR.

[0028] На фиг. 1В приведена графическая иллюстрация примера способа в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, где фрагменты нуклеиновой кислоты (синтезированные *de novo* или полученные из вирусного генома или сРНК или их комбинации) собраны в более крупную конструкцию. Собранная самореплицирующаяся конструкция или конструкция, как показано, включает промотор РНК-полимеразы, 5'-UTR, кодирует четыре неструктурных белка, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, субгеномный промотор 26S, последовательность адаптера и/или трансген, 3'-UTR и полиаденилатный тракт (pA), за которым следует терминатор и/или сайт рестрикции. Такую конструкцию можно использовать в качестве матрицы для получения сРНК для функционального тестирования *in vitro* и/или *in vivo*.

[0029] На фиг. 2 приведена графическая иллюстрация примера способа в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. Замена одной или более UTR из другого вида, подвида или штамма может быть стадией для функционализации самореплицирующейся молекулы РНК. Аналогично замена одного или более NSP из другого вида, подвида или штамма может быть стадией для функционализации самореплицирующейся молекулы РНК.

[0030] На фиг. 3 приведено графическое представление четырех неограничивающих примеров модифицированных конструкций генома альфавируса в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вирусные структурные белки исходного вируса, была полностью делецирована. Показаны неструктурные белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4. Неограничивающий пример модифицированной конструкции СНИКV может быть основан на штамме СНИКV S27 и, кроме того, может содержать гетерологичный ген (GOI), помещенный под контроль субгеномного промотора 26S. Неограничивающий пример модифицированной конструкции СНИКV также может быть основан на штамме СНИКV DRDE-06 и дополнительно содержит 3'-UTR, полученную из штамма СНИКV S27, и, кроме того, может содержать гетерологичный ген (GOI), помещенный под контроль субгеномного промотора 26S. Неограничивающий пример модифицированной конструкции SINV может быть основан на штамме SINV Girdwood и дополнительно может содержать гетерологичный ген (GOI), помещенный под контроль субгеномного промотора 26S. Неограничивающий пример модифицированной конструкции SINV может быть основан на штамме SINV AR86 и содержит nsP2, полученный из штамма SINV Girdwood, и дополнительно может содержать гетерологичный ген (GOI), помещенный под контроль субгеномного промотора 26S.

[0031] На фиг. 4 приведена графическая иллюстрация примера конструкции сРНК на основе альфавируса pRB\_017 СНИКV-DRDE-S27-HPV16 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытия, где последовательности, кодирующие модифицированный СНИКV DRDE-06, включены в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности для примера представляющего интерес гена (GOI), например, онкопротеинов вируса папилломы человека (HPV) E6/E7.

[0032] На фиг. 5 приведена графическая иллюстрация примера конструкции срРНК на основе альфавируса CHIKV-DRDE-NA в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия, где последовательность, кодирующая модифицированный геном CHIKV DRDE-06, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности для примера представляющего интерес гена (GOI), например, предшественника гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А H5N1.

[0033] На фиг. 6 приведена графическая иллюстрация примера конструкции срРНК на основе альфавируса CHIKV-DRDE-Oncology в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, где последовательность, кодирующая модифицированный геном CHIKV DRDE-06, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности для примера представляющего интерес гена (GOI), например, синтетическую кассету последовательностей, кодирующую гены или участки генов, имеющих отношение к онкологии (экстрогеновый рецептор 1 (ESR1), рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2) и рецептор человеческого эпидермального фактора роста 3 (HER3)).

[0034] На фиг. 7 графически обобщены результаты экспериментов, проведенных для демонстрации того, что нефункциональный геном альфавируса или срРНК можно функционализовать посредством замены дефектной последовательности nsP на соответствующий функциональный nsP, полученный из гетерологичного генома альфавируса или срРНК. На этой фигуре изображены контурные диаграммы клеток ВНК-21, которые были трансформированы с использованием примерных конструкций генома альфавируса в соответствии с некоторыми вариантами изобретения. В этих экспериментах конструкции генома альфавируса вводили в клетки ВНК-21 путем электропорации, и через 20 ч после трансформации клетки фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали с использованием PE-конъюгированного мышинового моноклонального антитела против двухцепочечной РНК (дцРНК) (J2, Scicons) для количественной оценки частоты дцРНК+ клеток с использованием флуоресцентной проточной цитометрии. Показана способность конструкций генома альфавируса подвергаться репликации РНК, приводящей к продукции дцРНК.

[0035] На фиг. 8А-8В приведены гистограммы, иллюстрирующие иммуногенность *in vivo* панели срРНК, которые были функционализованы в соответствии со способом, раскрытым здесь. Данная панель функционализованных срРНК кодировала примерный вирусный антиген, который представляет собой гликопротеин оболочки G вируса бешенства (RABV-G). Панель включала срРНК, полученные из вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE.TC83), штаммов вируса Чикунгунья S27 (CHIK.S27) и DRDE-06 (CHIK.DRDE), штаммов Girdwood вируса Синдбис (SIN.GW) и гибрида 1 AR86-Girdwood (SIN.AR86) и вируса восточного энцефалита лошадей (EEE.FL93). На фиг. 8А приведены результаты количественной оценки антигенспецифических ответов Т-клеток селезенки, оцененных с использованием ELISpot после двух иммунизаций. На фиг. 8В

показаны титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства из сыворотки после двух иммунизаций.

[0036] На фиг. 9 графически показано, что антигенспецифические ответы Т-клеток могут быть детектированы из функционализированных векторов срРНК, кодирующих мишени, связанные с инфекционными заболеваниями (сутки 14 после праймирования каждым вектором). Введение *in vivo* функционализированных векторов, полученных из СНИKV и SINV, кодирующих антиген HA из H5N1, мышам BALB/c генерирует антигенспецифические ответы CD4+ и CD8+ Т-клеток и функциональные ответы антител. Среднее геометрическое с геометрическим SD. Однофакторный дисперсионный анализ.

[0037] На фиг. 10 графически показано, что антигенспецифические ответы Т-клеток могут быть детектированы из функционализированных векторов срРНК, кодирующих мишени, связанные с онкологией (сутки 14 после праймирования каждым вектором). Введение *in vivo* векторов, полученных из СНИKV и SINV, кодирующих активирующие мутации из ESR1 и PI3K, наряду с усеченными белками HER2 и киназой HER3, мышам BALB/c генерирует сильные ответы Т-клеток. Среднее геометрическое с средним геометрическим SD. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA.

#### **Подробное описание изобретения**

[0038] Настоящее изобретение, в частности, относится к способам получения функциональных самореплицирующихся РНК (срРНК) из одного или более нефункциональных одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК), таких как геномы альфавирусов или нефункциональные самореплицирующиеся РНК. Функциональные срРНК подходят для экспрессии представляющих интерес молекул, например, таких как вакцины и терапевтические полипептиды. Настоящее изобретение также относится к конструкциям нуклеиновой кислоты, включая нуклеиновые кислоты, кодирующие срРНК, и векторам, содержащим срРНК по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к самореплицирующимся РНК, которые собраны *de novo* из множества фрагментов нуклеиновой кислоты одного или более нефункциональных геномов альфавирусов, геномов с одноцепочечной РНК (оцРНК) и/или срРНК.

[0039] Как обсуждалось выше, в данной области существует потребность в эффективных и экономически выгодных способах получения функциональных срРНК, в частности, тех, которые можно использовать для экспрессии представляющих интерес продуктов. Общедоступные данные по геномам альфавирусов не всегда содержат нуклеотидные последовательности, которые могут содержать последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие структурные белки, напрямую замененные представляющим интерес геном (GOI), для обеспечения самореплицирующихся и трансген-экспрессирующих срРНК. В частности, было обнаружено, что значительное число общедоступных геномов альфавирусов являются нефункциональными, например, неспособны подвергаться репликации и/или экспрессировать трансген.

[0040] Функциональные срРНК на основе альфавирусов можно использовать в

качестве надежных экспрессионных систем. В настоящем изобретении функциональная срРНК представляет собой срРНК, способную подвергаться репликации и/или экспрессировать трансген. Например, сообщалось, что преимущество применения альфавирусов в качестве вирусных экспрессионных векторов заключается в том, что они могут направлять синтез большого количества гетерологичных белков в рекомбинантных клетках-хозяевах. Среди других преимуществ, полипептиды, такие как терапевтические одноцепочечные антитела, могут быть наиболее эффективными, если экспрессируются на высоких уровнях *in vivo*. Кроме того, для получения рекомбинантных антител, выделенных из клеток в культуре (*ex vivo*), высокая экспрессия белка из срРНК может увеличить общий выход продукта-антитела. Кроме того, если экспрессированный белок представляет собой вакцинный антиген, то высокая экспрессия может индуцировать наиболее сильный иммунный ответ *in vivo*.

[0041] Не было полностью понятно, что полноразмерные вирусы и синтетические срРНК не обладают одинаковой способностью к репликации. В частности, многие полноразмерные вирусы и срРНК из общедоступных баз данных являются функционально дефектными как срРНК. В настоящее время подход к модификации для функционализации дефектного генома альфавируса или срРНК заключается в отмене одной или более ключевых точечных мутаций, связанных с вирулентностью, которая различается между штаммами, например, мутаций, которые расходятся между функциональным штаммом (например, Girdwood) и нефункциональным штаммом (например, AR86). Однако такая стратегия часто терпит неудачу или решение приходит произвольно, указывая на то, что существует гораздо больше нехарактеризованных и, следовательно, непредсказуемых расхождений последовательностей между штаммами. Следовательно, существует потребность в более быстром и эффективном способе идентификации функциональных штаммов альфавируса (вместо простой отмены точечных мутаций или выбора произвольных областей для создания химер). Также существует потребность в надежном способе получения функциональных срРНК из нефункциональных вирусных геномов или/и нефункциональных срРНК.

[0042] С учетом различного присутствия факторов ослабления клеток-хозяев в неструктурных и структурных областях альфавирусов, удаление структурных генов для обеспечения гетерологичной экспрессии генов в синтетических векторах будет иметь различные последствия для отдельных векторов. Синтетическая срРНК с различными факторами ослабления хозяев в неструктурных областях будет по-разному индуцировать иммунные ответы на гетерологичные гены, которые экспрессируются.

[0043] Как описано более подробно в настоящем описании, среди прочего, настоящее изобретение относится к новым способам, пригодным для получения функциональной срРНК из одного или более дефектных (например, нефункциональных) геномов альфавирусов или одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+срРНК) или из комбинации функциональных и нефункциональных срРНК или их фрагментов.

[0044] Заголовки, например, (a), (b), (i) и т. д., представлены исключительно для удобства чтения описания и формулы изобретения. Использование заголовков в описании или формуле изобретения не требует выполнения стадий или элементов в алфавитном или числовом порядке или в порядке, в котором они представлены.

### **I. Общие методы**

[0045] В практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, которые хорошо известны специалистам в данной области. Такие методы подробно описаны в литературе, например, Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory and Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (в совокупности относящиеся здесь к “Sambrook”); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (включая приложения 2014); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. et al. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferré, F. & Gibbs, R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (включая приложения 2014); и Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V., раскрытие информации из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

### **II. Определения**

[0046] Если не указано иное, то все термины, обозначения и другие научные термины или терминология, используемые в настоящем изобретении, имеют значения, обычно понимаемые специалистами в области, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях термины с общепонятными значениями определяются в настоящем изобретении для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений в настоящее описание не обязательно должно истолковываться как представляющее существенное различие по сравнению с тем, что обычно понимается в данной области. Многие из методов и процедур, описанных или упомянутых в настоящем изобретении, хорошо понятны и обычно применяются с использованием общепринятой методологии специалистами в данной области.

[0047] Формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если по контексту явно не требуется иное. Например, термин «клетка» включает одну или более клеток, включая их смеси. «А и/или В» используется в настоящем изобретении для

включения всех следующих альтернатив: «А», «В», «А или В» и «А и В».

[0048] Если указан диапазон значений, то подразумевается, что каждое промежуточное значение, до десятой доли единицы нижнего предела, если по контексту явно не требуется иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне, включается в раскрытие. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в раскрытие, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, то диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в раскрытие.

[0049] Термины «введение» и любые их грамматические варианты, используемые в настоящем изобретении, относятся к доставке биологически активной композиции или состава путем введения, включающим, не ограничиваясь этим, интраназальное, чрескожное, внутривенное, внутриартериальное, внутримышечное, интранодальное, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное, пероральное, интравагинальное и местное, интратекальное, внутриглазное, ректальное введение или их комбинации. Термин включает, не ограничивается этим, введение медицинским работником и самостоятельное введение.

[0050] В рамках изобретения, термин «полученный из» относится к источнику (например, встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты вируса), из которого получена последовательность нуклеиновой кислоты или полипептида либо (например, выделена из), либо сконструирована (т. е. получена с использованием методов генной инженерии). Термины «клетка», «культура клеток» и «клеточная линия» относятся не только к конкретной клетке, культуре клеток или клеточной линии, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки, культуры клеток или клеточной линии клеток, независимо от количества переносов или пассажей в культуре. Следует понимать, что не все потомство в точности идентично родительской клетке. Это связано с тем, что определенные модификации могут иметь место в последующих поколениях в результате мутации (например, в результате преднамеренных или непреднамеренных мутаций) или влияния окружающей среды (например, метилирования или других эпигенетических модификаций), так что потомство может, по сути, не быть идентичным родительской клетке, но все еще включается в объем данного термина, используемого в настоящем изобретении, при условии, что потомство сохраняет ту же функциональность, что и исходная клетка, культура клеток или клеточная линия.

[0051] Термин «конструкция» относится к рекомбинантной молекуле, например, рекомбинантной нуклеиновой кислоте или полипептиду, включая одну или более нуклеиновокислотных последовательностей или аминокислотных последовательностей из гетерологичных источников. Например, полипептидные конструкции могут представлять собой химерные полипептидные молекулы, в которых две или более аминокислотных последовательностей разного происхождения функционально связаны друг с другом в

одной полипептидной конструкции. Аналогично, конструкции нуклеиновой кислоты могут представлять собой химерные молекулы нуклеиновой кислоты, в которых две или более нуклеиновокислотных последовательностей разного происхождения собраны в одну молекулу нуклеиновой кислоты. Репрезентативные конструкции нуклеиновой кислоты могут включать любые рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, линейные или кольцевые, одноцепочечные или двухцепочечные полинуклеотидные молекулы ДНК или РНК, полученные из любого источника, такие как плазида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся полинуклеотидная молекула, фаг, способные к геномной интеграции или автономной репликации, включая молекулу нуклеиновой кислоты, где одна или более последовательностей нуклеиновой кислоты были функционально связаны. В некоторых вариантах осуществления одна или более конструкций нуклеиновой кислоты могут быть включены (например, вставлены) в одну молекулу нуклеиновой кислоты, такую как один вектор, или могут быть включены (например, вставлены) в две или более отдельных молекул нуклеиновой кислоты, таких как два или более отдельных вектора. Термин «вектор» используется в настоящем изобретении для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты или последовательности, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Таким образом, термин «вектор» охватывает как векторы на основе ДНК, так и векторы на основе РНК. Термин «вектор» включает клонирующие векторы и экспрессионные векторы, а также вирусные векторы и интегрирующие векторы. «Экспрессионный вектор» представляет собой вектор, который включает регуляторную область, тем самым он становится способным экспрессировать последовательности и фрагменты ДНК *in vitro*, *ex vivo* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления вектор может включать последовательности, которые направляют автономную репликацию в клетке, например, такие как плазида (вектор на основе ДНК) или самореплицирующийся вектор на основе РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор может включать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления вектор может включать последовательности ДНК, которые могут быть транскрибированы в РНК *in vitro* и/или *in vivo*. Пригодные векторы включают, например, плазмиды (например, ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды, бактериальные искусственные хромосомы и вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления вектор по изобретению может быть одноцепочечным вектором (например, на основе оцДНК или оцРНК). В некоторых вариантах осуществления вектор по изобретению может быть двухцепочечным вектором (например, на основе дцДНК или дцРНК). В некоторых вариантах осуществления вектор является вектором для доставки генов. В некоторых вариантах осуществления вектор используется в качестве носителя для доставки генов для переноса гена в клетку. В некоторых вариантах осуществления вектор по изобретению является вектором самореплицирующейся РНК (срРНК).

[0052] Термин «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество» композиции по настоящему

изобретению, например, нуклеиновокислотных конструкций, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, обычно относится к количеству, достаточному для того, чтобы композиция достигла заявленной цели по сравнению с отсутствием композиции (например, достигла эффекта, для которого она вводится, индуцировала иммунный ответ, обеспечивала профилактику или лечение заболевания или ослабляла один или более симптомов заболевания, расстройства, инфекции или патологического состояния). Примером «эффективного количества» является количество, достаточное для обеспечения лечения, профилактики или ослабления симптома или симптомов заболевания, которое также можно назвать «терапевтически эффективным количеством». «Ослабление» симптома означает снижение тяжести или частоты проявления симптома(ов) или устранение симптома(ов). Точное количество композиции, включая «терапевтически эффективное количество», будет зависеть от цели лечения, и может быть установлено специалистами в данной области с использованием известных методов (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).

[0053] В рамках изобретения, термин «функционально связанный» обозначает физическую или функциональную связь между двумя или более элементами, например, полипептидными последовательностями или полинуклеотидными последовательностями, которая позволяет им функционировать в соответствии с их предназначением. Например, термин «функционально связанный», используемый в контексте молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем изобретении, или кодирующих последовательностей и промоторных последовательностей в молекуле нуклеиновой кислоты, означает, что кодирующие последовательности и промоторные последовательности находятся в рамке считывания и в надлежащем пространственном и удаленном положении, чтобы обеспечить эффекты соответствующего связывания транскрипционными факторами или РНК-полимеразой при транскрипции. Следует понимать, что функционально связанные элементы могут быть смежными или несмежными (например, связанными друг с другом через линкер). Функционально связанные сегменты, участки, области и домены молекул нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем изобретении, могут быть смежными или несмежными (например, связанными друг с другом через линкер).

[0054] В рамках изобретения, термин «криптический сайт терминации» относится к сайту терминации РНК-полимеразы (например, терминатор T7 RNAP Tφ), который приводит к ранней терминации транскрипции и может быть получен из межгенных или внутригенных областей (т. е. не связан с геном).

[0055] В рамках изобретения, термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к любому пригодному веществу, которое обеспечивает фармацевтически приемлемый носитель, добавку или разбавитель для введения представляющего интерес соединения(й) субъекту. Таким образом, «фармацевтически приемлемый эксципиент»

может охватывать вещества, относящиеся к фармацевтически приемлемым разбавителям, фармацевтически приемлемым добавкам и фармацевтически приемлемым носителям. В рамках изобретения, термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает, не ограничиваясь этим, физиологический раствор, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и тому подобное, совместимые с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения (например, антибиотики и дополнительные терапевтические агенты) также могут быть включены в композиции.

[0056] В рамках изобретения, термин «участок» относится к фракции. В отношении конкретной структуры, такой как полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность или белок, то термин «участок» может обозначать непрерывную или прерывистую фракцию указанной структуры. Например, участок аминокислотной последовательности содержит по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% и по меньшей мере 90% аминокислот указанной аминокислотной последовательности. В дополнение или альтернативно, если «участок» является прерывистой фракцией, то указанная прерывистая фракция состоит из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более участков структуры (например, доменов белка), где каждый «участок» является непрерывным элементом структуры. Например, прерывистая фракция аминокислотной последовательности может состоять из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более, например, не более 4 участков указанной аминокислотной последовательности, где каждый участок 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.

[0057] Термин «рекомбинантный», когда он используется по отношению к клетке, нуклеиновой кислоте, белку или вектору, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были изменены или получены посредством человеческого вмешательства, например, были модифицированы или являются результатом применения лабораторных методов. Так, например, рекомбинантные белки и нуклеиновые кислоты включают белки и нуклеиновые кислоты, полученные с применением лабораторных методов. Рекомбинантные белки могут включать аминокислотные остатки, не встречающиеся в природной (нерекомбинантной или дикого типа) форме белка, или могут включать аминокислотные остатки, которые были модифицированы, например, помечены. Термин может включать любые модификации последовательности пептида, белка или нуклеиновой кислоты. Такие модификации могут включать следующее: любые химические модификации последовательности пептида, белка или нуклеиновой кислоты, включая одну или более аминокислот, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов; добавление, делецию и/или замену одной или более аминокислот в пептиде или белке;

создание слитого белка, например, слитого белка, включающего фрагмент антитела; и добавление, делецию и/или замену одной или более нуклеиновых кислот в последовательности нуклеиновой кислоты. Термин «рекомбинантный», когда он используется по отношению к клетке, не подразумевает включение встречающихся в природе клеток, а охватывает клетки, которые были сконструированы/модифицированы для включения или экспрессии полипептида или нуклеиновой кислоты, которые отсутствовали бы в клетке, если бы они не были сконструированы/модифицированы.

[0058] В рамках изобретения, «субъект» или «индивидуум» включают животных, таких как человек (например, человека-индивидуума) и «нечеловеческих» животных. В некоторых вариантах осуществления «субъект» или «индивидуум» является пациентом, находящимся под наблюдением врача. Таким образом, субъект может быть пациентом-человек или человеком-индивидуумом, который имеет или имеет риск или подозревается в наличии представляющего интерес патологического состояния (например, рака или инфекции) и/или одного или более симптомов патологического состояния. Субъект также может представлять собой индивидуум, у которого диагностирован риск развития представляющего интерес патологического состояния и/или заболевания во время постановки диагноза или позже. Термин «нечеловеческие животные» включает всех позвоночных, например, млекопитающих, например, грызунов, например, мышей, «нечеловеческих» приматов и других млекопитающих, например, таких как овцы, собаки, коровы, куры и животные, не относящиеся к млекопитающим, таким как амфибии, рептилии и т. д.

[0059] Если указан диапазон значений, то подразумевается, что каждое промежуточное значение, до десятой доли единицы нижнего предела, если по контексту явно не требуется иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне, включается в раскрытие. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в раскрытие, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в раскрытие.

[0060] Определенные диапазоны представлены в настоящем изобретении с числовыми значениями, которым предшествует термин «приблизительно», который, как используется в настоящем изобретении, имеет свое обычное округленное значение. Термин «приблизительно» используется для предоставления буквальной поддержки точного числа, которому он предшествует, а также числа, которое близко или приблизительно к числу, которому предшествует термин. При определении того, насколько число близко или приблизительно к конкретному указанному числу, близкое или приблизительно неуказанное число может быть числом, которое в контексте, в котором оно представлено, обеспечивает существенный эквивалент конкретно указанному числу. Если степень приближения иным образом не ясна из контекста, то

«приблизительно» означает либо в пределах плюс или минус 10% от представленного значения, либо округлено до ближайшей значимой цифры, во всех случаях включая представленное значение. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» указывает на обозначенное значение  $\pm$  до 10%, до  $\pm$  5% или до  $\pm$  1%.

[0061] Понятно, что аспекты и варианты осуществления раскрытия, описанные в настоящем изобретении, включают «содержащий», «состоящий» и «состоящий по существу из» аспектов и вариантов осуществления. В рамках изобретения, «содержащий» является синонимом «включающий», «состоящий из» или «характеризующийся» и является включающим или открытым, и не исключает дополнительные, неперечисленные элементы или стадии способа. В рамках изобретения, «состоящий из» исключает любые элементы, стадии или ингредиенты, не указанные в композиции или способе по настоящему изобретению. В рамках изобретения, термин «состоящий по существу из» не исключает вещества или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики композиции или способа по настоящему изобретению. Любое упоминание в настоящем изобретении термина «содержащий», в частности, в описании компонентов композиции или в описании стадий способа, подразумевает, что он охватывает такие композиции и способы, которые по существу состоят из перечисленных компонентов или стадий.

[0062] Следует понимать, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены по отдельности или в любой подходящей субкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к раскрытию, конкретно охвачены настоящим раскрытием и раскрыты в настоящем изобретении так же, как если бы была индивидуально и явно раскрыта каждая комбинация. Кроме того, все субкомбинации различных вариантов осуществления и их элементы также специально охвачены настоящим раскрытием и раскрыты в настоящем изобретении так же, как если бы была индивидуально и явно раскрыта каждая такая субкомбинация в настоящем изобретении.

### **Одноцепочечные РНК-вирусы с положительной смысловой цепью**

[0063] Одноцепочечные РНК-вирусы с положительной смысловой цепью (+оцРНК) включают основные патогены людей, животных, насекомых и растений. Эти вирусы имеют сходные характеристики генома и некоторые консервативные белковые домены.

[0064] В настоящее время известно восемь семейств +оцРНК вирусов, члены которых инфицируют позвоночных. К ним относятся три семейства, характеризующиеся необолочечными капсидами (*Hepeviridae*, *Caliciviridae* и *Picornaviridae*), и четыре семейства, которые имеют оболочечные капсиды (*Togaviridae*, *Arteriviridae*, *Flaviviridae* и *Coronaviridae*). Такие вирусы используют свои геномы в качестве информационной РНК, которая транслируется в один или более полипротеинов, которые затем расщепляются

вирусными или клеточными протеазами на отдельные белки. Геномы этих вирусов кодируют РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая транскрибирует положительную цепь РНК, а также комплементарные отрицательные цепи РНК, возникающие в качестве промежуточных продуктов репликации генома. Классификация в различные таксономические семейства зависит от количества различных полипротеинов, которые синтезируются во время вирусной инфекции, а также от количества, размера, положения и ориентации вирусных генов в молекуле РНК и наличия оболочки как компонента вириона.

[0065] Семейство *Coronaviridae* +оцРНК вирусов включает «супергруппу альфавирусов». Альфавирусы представляют собой небольшие оболочечные одноцепочечные РНК-вирусы с одноцепочечным РНК-геномом с положительной смысловой цепью. Род альфавирусов включает, в частности, вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус Синдбис (SINV), вирус Мадариага (MADV), вирус леса Семлики (SFV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV) или вирус леса Семлики (SFV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MIDV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус О'Ньонг-Ньонг (ONNV), вирус лихорадки Росс-ривер (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Маяро (MAYV), вирус Уна (UNAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHAIV), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус Хайлендс J (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), вирус Ндumu (NDUV), вирус Мадариага (MADV) и вирус Багги-Крик, которые все тесно связаны и способны инфицировать различных позвоночных, таких как млекопитающие, грызуны, рыбы, виды птиц, а также более крупных млекопитающих, таких как люди и лошади, а также беспозвоночных, таких как насекомые. В частности, вирусы Синдбис и леса Семлики были хорошо изучены, и цикл развития, способ репликации и т. д. этих вирусов довольно хорошо охарактеризованы.

[0066] Геном альфавируса составляет приблизительно 11-12 п.н. в длину, включая 5'-прайм-кэп, 3'-поли(А)-хвост и две открытые рамки считывания (ORF): рамка 4 т.н., кодирующая структурный полипротеин, и рамка 7 т.н., кодирующая неструктурные белки (nsP). Рамка считывания 4 т.н. кодирует вирусные структурные белки, такие как капсидный белок СР, гликопротеин Е1, гликопротеин Е2, белок Е3 и белок 6К. Неструктурный полипротеин (nsP) расщепляется на четыре различных белка (nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4), которые необходимы для транскрипции и трансляции вирусной мРНК внутри цитоплазмы клеток-хозяев. Графическое представление примера альфавируса и его структурной организации показано на фиг. 1А.

[0067] Белок nsP1 представляет собой фермент экпирования мРНК, который обладает как гуанин-7-метилтрансферазной (МТазы), так и гуанилилтрансферазной (ГТазы) активностью, где они направляют метилирование и экпирование вновь синтезированных вирусных геномных и субгеномных РНК. Мотив МТазы в N-концевом

домене nsP1 катализирует перенос метильной группы с S-аденозилметионина (AdoMet) в положение N7 молекулы ГТФ (m7Gppp). Затем ГТаза связывает m7Gppp, образуя ковалентную связь с каталитическим гистидином (m7Gr-ГТаза) и высвобождая PPi. Затем ГТаза переносит молекулу m7Gr на 5'-дифосфат РНК с образованием m7GpppNp-РНК. Полученная структура кэпа важна для трансляции вирусной мРНК и предотвращает деградацию мРНК клеточными 5'-экзонуклеазами. После N-концевого домена следуют элементы, которые позволяют связывать белок nsP1 с клеточными мембранами. Наличие  $\alpha$ -спиральной амфипатической петли и участков пальмитоилирования позволяет белку nsP1 и содержащему nsP1 репликационному комплексу «заякориваться» на плазматической мембране, возможно, посредством взаимодействия nsP1 с анионными фосфолипидами мембраны.

[0068] Белок nsP2 обладает многочисленными ферментативными активностями и функциональными ролями. N-концевая область содержит домен геликазы, который содержит семь сигнатур мотивов суперсемейства геликаз 1 (SF1). Он функционирует в качестве РНК-трифосфатазы, которая выполняет первую из реакций кэпирования вирусной РНК. Он также функционирует в качестве нуклеотидтрифосфатазы (NTPase), подпитывая активность РНК-геликазы. С-концевая область nsP2 содержит папаиноподобную цистеиновую протеазу, которая отвечает за процессинг вирусного неструктурного полипротеина. Протеаза распознает консервативные мотивы внутри полипротеина. Такая протеолитическая функция строго регулируется и модулируется другими доменами nsP2. Белок альфавируса nsP2 также был описан как фактор вирулентности, ответственный за транскрипционное и трансляционное отключение в инфицированных клетках-хозяевах и ингибирование противовирусных ответов, опосредованных интерфероном (IFN), способствующих контролю трансляционного аппарата вирусными факторами.

[0069] Точная роль белка nsP3 альфавируса в репликационном комплексе менее ясна. Белок nsP3 имеет три распознаваемых домена: N-концевой макродомен с фосфатазной активностью и способностью связывать нуклеиновые кислоты, уникальный домен альфавируса (AUD) и С-концевой гипервариабельный домен. Было показано, что делеция этого домена в nsP3 SFV приводила к низкой патогенности вируса, что свидетельствует о его важности в регуляции транскрипции вирусной РНК.

[0070] Полимераза nsP4 является наиболее высококонсервативным белком в альфавирусах, где наиболее дивергентный белок на >50% идентичен по аминокислотной последовательности по сравнению с другими альфавирусными nsP4. Белок nsP4 содержит коровый домен РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) на С-конце, который, как установлено, несет исключительную ответственность за синтетические свойства РНК вирусного репликационного комплекса. RdRp участвует в репликации геномной РНК через отрицательную цепь РНК и транскрипции субгеномной РНК 26S. N-концевой домен является специфичным для альфавируса и может быть частично структурно неупорядоченным.

[0071] 5'-две трети генома альфавируса кодируют ряд неструктурных белков (nsP), необходимых для транскрипции и репликации вирусной РНК. Эти белки транслируются непосредственно из РНК и вместе с клеточными белками образуют РНК-зависимую РНК-полимеразу, необходимую для репликации вирусного генома и транскрипции субгеномной РНК. Четыре неструктурных белка (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) продуцируются в виде одного полипротеина, составляющего репликационный аппарат вируса. Процессинг полипротеина происходит высокорегулируемым образом, с расщеплением в соединении P2/3, влияющим на использование матрицы РНК во время репликации генома. Этот сайт расположен у основания узкой щели и не является легкодоступным. После расщепления nsP3 создает кольцевую структуру, которая окружает nsP2. Эти два белка имеют обширный интерфейс. Мутации в nsP2, которые обеспечивают продукцию нецитопатических вирусов или температурно-чувствительных фенотипов, кластеризуются в области интерфейса P2/P3. Мутации P3 напротив местоположения нецитопатических мутаций nsP2 предотвращают эффективное расщепление P2/3. Это, в свою очередь, может влиять на инфекционность РНК, изменяя уровни продукции вирусной РНК.

[0072] 3'-третья часть генома состоит из субгеномной РНК, которая служит матрицей для трансляции всех структурных белков, необходимых для формирования вирусных частиц (например, корового нуклеокапсидного белка С и белков оболочки P62 и E1, которые ассоциируются в виде гетеродимера). «Заякоренные» на вирусной мембране поверхностные гликопротеины отвечают за распознавание рецепторов и проникновение в клетки-мишени посредством слияния мембран. Субгеномная РНК транскрибируется с субгеномного промотора 26S, находящегося на 3'-конце последовательности РНК, кодирующей белок nsP4. Протеолитическое созревание P62 с образованием E2 и E3 вызывает изменение вирусной поверхности. Вместе E1, E2 и иногда E3, гликопротеиновые «шипы» образуют димер E1/E2 или тример E1/E2/E3, где E2 простирается от центра к вершинам, E1 заполняет пространство между вершинами, и E3, если он присутствует, находится на дистальном конце шипа. При воздействии на вирус кислого содержимого эндосомы E1 диссоциирует от E2, образуя гомотример E1, который необходим для стадии слияния, чтобы сблизить клеточную и вирусную мембраны вместе. Альфавирусный гликопротеин E1 является вирусным слитым белком класса II, который структурно отличается от слитых белков класса I, обнаруженных в вирусе гриппа и ВИЧ. Гликопротеин E2 взаимодействует с нуклеокапсидом через свой цитоплазматический домен, в то время как его эктодомен отвечает за связывание с клеточным рецептором. Большинство альфавирусов теряют периферический белок E3, в то время как у вирусов Семлики он остается связанным с вирусной поверхностью.

[0073] Сообщалось, что репликация альфавируса происходит на мембранных поверхностях внутри клетки-хозяина. На первой стадии инфекционного цикла 5'-конец геномной РНК транслируется в полипротеин (nsP1-4) с активностью РНК-полимеразы, которая продуцирует отрицательную цепь, комплементарную геномной РНК. На второй стадии отрицательная цепь используется в качестве матрицы для продукции двух РНК,

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

[0074] Альфавирусы используют мотивы, находящиеся в их UTR, структурных областях и неструктурных областях, чтобы оказывать влияние на их репликацию в клетках-хозяевах. Эти области также имеют механизм для уклонения от врожденного иммунитета клеток-хозяев. Однако сообщалось о значительных различиях между видами альфавирусов. Например, в альфавирусах Нового и Старого Света развились различные компоненты для использования стрессовых гранул, сигнализации JAK-STAT, FXR и белков G3BP внутри клеток для сборки вирусных репликационных комплексов. Какая часть генома содержит эти компоненты, также различается у разных альфавирусов. Например, обходной путь активации PKR и последующего фосфорилирования EIF2alpha осуществляется через нисходящую петлю (DLP) у некоторых альфавирусов Старого Света, таких как Синдбис, но полагается, что обход этого пути осуществляется через NSP4 у вируса Чикунгунья, у которого отсутствует узнаваемая DLP. Кроме того, помимо различий между отдельными альфавирусами, часто существуют различия и внутри штаммов альфавирусов, которые могут объяснять изменения характеристик, таких как вирулентность. Например, вариации в последовательностях между североамериканскими и южноамериканскими штаммами вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV) приводят к изменению способности модулировать путь STAT1, что приводит к дифференциальной индукции интерферонов типа I и, как следствие, к изменениям вирулентности.

#### Самореплицирующаяся РНК

[0075] Как будет понятно специалистам в данной области, термин «самореплицирующаяся РНК» относится к молекуле РНК, которая содержит всю генетическую информацию, необходимую для регуляции ее собственной амплификации или саморепликации в перmissive клетке. Следовательно, срРНК иногда также называют «самоамплифицирующейся РНК» (саРНК), термин, который охватывает «репликон» или «репликон РНК» или «РНК-репликон». Для регуляции собственной репликации, срРНК обычно: (1) кодирует полимеразу, репликазу или другие белки, которые могут взаимодействовать с вирусными или полученными из клетки-хозяина белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, чтобы катализировать процесс амплификации РНК; и (2) содержит цис-действующие последовательности РНК, необходимые для репликации и транскрипции субгеномной репликон-кодированной РНК.

Эти последовательности могут быть связаны в процессе репликации с ее самокодированными белками или несамоедирированными полученными из клетки белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, или комплексами между любыми из этих компонентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения срРНК (например, репликон) получена из альфавируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция альфавирусной срРНК (например, срРНК, саРНК или молекула репликона) обычно содержит следующие элементы: 5'-вирусную или дефектно-интерферирующую последовательность РНК, необходимую в цис-ориентации для репликации, последовательности, кодирующие биологически активные неструктурные белки альфавируса (например, nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4), субгеномный промотор (sg) для субгеномной РНК (сгРНК), 3'-вирусные последовательности, необходимые в цис-ориентации для репликации, и, необязательно, полиаденилатный тракт (поли(А)). В некоторых случаях субгеномный промотор (sg), который направляет экспрессию гетерологичной последовательности, может быть включен в конструкцию срРНК по настоящему изобретению.

[0076] Кроме того, термин молекула срРНК (например, срРНК, саРНК или молекула репликона) обычно относится к молекуле положительной полярности или смысловому «мессенджеру», и срРНК может иметь длину, отличную от длины РНК любого известного, встречающегося в природе альфавируса. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения срРНК не содержит по меньшей мере участок кодирующей последовательности для одного или более структурных белков альфавируса; и/или последовательности, кодирующие структурные гены, могут быть заменены гетерологичными последовательностями. В тех случаях, когда срРНК должна быть упакована в рекомбинантную частицу альфавируса, то она может содержать одну или более последовательностей, так называемых сигналов упаковки, которые служат для инициации взаимодействий со структурными белками альфавируса, что приводит к образованию частицы.

[0077] Конструкции срРНК по настоящему изобретению обычно имеют длину по меньшей мере приблизительно 2 т.н. Например, срРНК может иметь длину по меньшей мере приблизительно 2 т.н., по меньшей мере приблизительно 3 т.н., по меньшей мере приблизительно 4 т.н., по меньшей мере приблизительно 5 т.н., по меньшей мере приблизительно 6 т.н., по меньшей мере приблизительно 7 т.н., по меньшей мере приблизительно 8 т.н., по меньшей мере приблизительно 9 т.н., по меньшей мере приблизительно 10 т.н., по меньшей мере приблизительно 11 т.н., по меньшей мере приблизительно 12 т.н. или более 12 т.н. В некоторых вариантах осуществления срРНК может иметь длину от приблизительно 4 т.н. до приблизительно 20 т.н., от приблизительно 4 т.н. до приблизительно 18 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 16 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 14 т.н., от приблизительно 7 т.н. до приблизительно 12 т.н., от приблизительно 8 т.н. до приблизительно 16 т.н., от приблизительно 9 т.н. до приблизительно 14 т.н., от

приблизительно 10 т.н. до приблизительно 18 т.н., от приблизительно 18 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 20 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 10 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 8 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 7 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 6 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 12 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 11 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 10 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 9 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 8 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 7 т.н., от приблизительно 7 т.н. до приблизительно 11 т.н., от приблизительно 7 т.н. до приблизительно 10 т.н., от приблизительно 7 т.н. до приблизительно 9 т.н., от приблизительно 7 т.н. до приблизительно 8 т.н., от приблизительно 8 т.н. до приблизительно 11 т.н., от приблизительно 8 т.н. до приблизительно 10 т.н., от приблизительно 8 т.н. до приблизительно 9 т.н., от приблизительно 9 т.н. до приблизительно 11 т.н., от приблизительно 9 т.н. до приблизительно 10 т.н. или от приблизительно 10 т.н. до приблизительно 11 т.н.. В некоторых вариантах осуществления срРНК может иметь длину от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 14 т.н. В некоторых вариантах осуществления срРНК может иметь длину от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 16 т.н.

### **III. Композиции**

#### **A. Самореплицирующиеся РНК по изобретению**

[0078] Настоящее изобретение относится, среди прочего, к функциональным срРНК, которые собраны *de novo* из фрагментов нуклеиновой кислоты, полученных из: (i) одной или более нефункциональных срРНК или (ii) одного или более нефункциональных вирусных +оцРНК геномов. Такие собранные срРНК могут амплифицироваться и инициировать экспрессию и/или сверхэкспрессию представляющих интерес белков в клетке-хозяине или в организме субъекта. срРНК, в отличие от мРНК, использует собственную кодированную полимеразу для амплификации. срРНК по настоящему изобретению, такие как основанные на альфавирусах, генерируют большие количества субгеномных мРНК, из которых могут быть экспрессированы большие количества представляющих интерес белков.

[0079] В некоторых вариантах осуществления функциональная срРНК может включать гетерологичную 5'-UTR или ее участок. В других вариантах осуществления функциональная срРНК может включать гетерологичную 3'-UTR или ее участок. В некоторых вариантах осуществления гетерологичными могут быть как 3'-, так и 5'-UTR функциональной срРНК. В некоторых вариантах осуществления гетерологичными могут представлять собой как 3'-UTR, так и 5'-UTR из одного и того же вида, подвида или штамма. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные последовательности 5'-UTR и/или 3'-UTR могут происходить из разных видов, подвидов или штаммов. Штамм может происходить из вирулентного или авирулентного варианта вируса. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные последовательности 5'-UTR и/или 3'-UTR могут

происходить из вируса Чикунгунья. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные последовательности 5'-UTR и/или 3'-UTR могут происходить из штамма Чикунгунья S27. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные последовательности 5'-UTR и/или 3'-UTR могут происходить из штамма DRDE-06 вируса Чикунгунья.

[0080] В некоторых вариантах осуществления функциональная срРНК может включать один или более гетерологичных nsP или их участков. Например, гетерологичный nsP может представлять собой nsP1, nsP2, nsP3 или nsP4. В некоторых вариантах nsP может происходить из штамма SINV AR86 или из штамма Girdwood SINV.

[0081] В некоторых вариантах осуществления функциональная срРНК может включать как гетерологичную UTR, так и гетерологичный nsP или его участки.

[0082] Настоящее изобретение также относится к функциональным срРНК, которые собраны с использованием способов, описанных здесь. срРНК может включать, например, 5'-UTR, промотор 26S, нуклеиновые кислоты для четырех неструктурных белков: nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, структурный белок и 3'-UTR. Графическая иллюстрация сборки нескольких фрагментов нуклеиновой кислоты в более крупную конструкцию показана на фиг. 1В.

[0083] В некоторых вариантах осуществления срРНК собраны из нефункциональных вирусных геномов или других срРНК, как подробно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления срРНК содержат гетерологичный неструктурный белок (nsP) или его фрагменты. Например, гетерологичный nsP или его участок представляет собой nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 или участок любого из них, или комбинацию любого из вышеперечисленного. Как описано выше, специалистам в данной области должно быть понятно, что участок последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей неструктурный полипептид, может включать достаточно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей неструктурный полипептид, чтобы обеспечить предполагаемую идентификацию этого полипептида, либо путем ручной оценки последовательности специалистами в данной области, либо путем автоматизированного сравнения и идентификации последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BLAST (см., например, «Basic Local Alignment Search Tool»; Altschul SF et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1993). Следовательно, участок нуклеотидной последовательности включает достаточно последовательности, чтобы обеспечить специфическую идентификацию и/или выделение фрагмента нуклеиновой кислоты, включающего последовательность. Например, участок последовательности нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере приблизительно 20%, например, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% от полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты.

[0084] В некоторых вариантах осуществления срРНК содержат гетерологичную UTR или ее участок. Например, гетерологичная UTR может представлять собой 5'- или 3'-

UTR или участок любой из них, или комбинацию любого из вышеперечисленного.

[0085] На фиг. 2 приведена графическая иллюстрация примера способа сборки функциональной срРНК из нефункционального вирусного генома. Как показано на фиг. 2, в некоторых вариантах осуществления способа замена одной или более UTR из другого вида, подвида или штамма может быть стадией для функционализации самореплицирующейся молекулы РНК. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления способа замена одного или более nsPsNSP или его участка из другого вида, подвида или штамма может быть стадией для функционализации самореплицирующейся молекулы РНК. Примеры конструкций с использованием способов, описанных здесь, показаны на фиг. 3.

### *В. Конструкции нуклеиновой кислоты и векторы*

[0086] Один из аспектов настоящего изобретения относится к конструкциям нуклеиновой кислоты, включающим или кодирующим функциональные срРНК, описанные в настоящем изобретении. Конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут представлять собой химерные молекулы нуклеиновой кислоты, в которых две или более последовательностей нуклеиновой кислоты различного происхождения собраны в одну молекулу нуклеиновой кислоты. Таким образом, репрезентативные конструкции нуклеиновой кислоты включают любые конструкции, которые содержат: (1) последовательности нуклеиновой кислоты, включающие регуляторные и кодирующие последовательности, которые не встречаются соединенными друг с другом в природе (например, по меньшей мере одна из нуклеотидных последовательностей является гетерологичной по отношению по меньшей мере к одной из ее других нуклеотидных последовательностей), или (2) последовательности, кодирующие участки функциональных молекул РНК или белков, которые не соединены друг с другом в природе, или (3) участки промоторов, которые не соединены друг с другом в природе. Типичные конструкции нуклеиновой кислоты могут включать любые рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, линейные или кольцевые, одноцепочечные или двухцепочечные нуклеиновокислотные молекулы ДНК или РНК, полученные из любого источника, такие как плазида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся молекула полинуклеотида, фаг, способные к геномной интеграции или автономной репликации, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, где одна или более последовательностей нуклеиновой кислоты были функционально связаны. Термины «молекула нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются здесь взаимозаменяемо и относятся как к молекулам РНК, так и к молекулам ДНК, включая молекулы нуклеиновой кислоты, включающие кДНК, геномную ДНК, синтетическую ДНК и молекулы ДНК или РНК, содержащие аналоги нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты может быть двухцепочечной или одноцепочечной (например, смысловая цепь или антисмысловая цепь). Молекула нуклеиновой кислоты может содержать необычные или модифицированные нуклеотиды. Термины «полинуклеотидная последовательность» и «последовательность нуклеиновой кислоты», используемые в настоящем изобретении

взаимозаменяемо, относятся к последовательности молекулы полинуклеотида. Полинуклеотидные и полипептидные последовательности, раскрытые в настоящем изобретении, показаны с использованием стандартных буквенных сокращенных обозначений, используемых для азотистых оснований и аминокислот, как указано в 37 CFR §1.82, который включает в себя посредством ссылки WIPO Standard ST 25 (1998), Приложение 2, таблицы 1-6.

[0087] Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут представлять собой молекулы нуклеиновой кислоты любой длины, включая молекулы нуклеиновой кислоты, которые обычно имеют длину от приблизительно 2 т.н. до 50 т.н., например, от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 40 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 30 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 20 т.н. или от приблизительно 10 т.н. до приблизительно 50 т.н., например, от приблизительно 15 т.н. до 30 т.н., от приблизительно 20 т.н. до приблизительно 50 т.н., от приблизительно 20 т.н. до приблизительно 40 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 25 т.н. или от приблизительно 30 т.н. до приблизительно 50 т.н.. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты имеют длину по меньшей мере 6 т.н. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты имеют длину от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 20 т.н.. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновых кислот (например, векторы или конструкции срРНК) по изобретению обычно имеют длину, по меньшей мере приблизительно 2 т.н. Например, конструкции нуклеиновой кислоты (например, векторы или срРНК) могут иметь длину по меньшей мере приблизительно 2 т.н., по меньшей мере приблизительно 3 т.н., по меньшей мере приблизительно 4 т.н., по меньшей мере приблизительно 5 т.н., по меньшей мере приблизительно 6 т.н., по меньшей мере приблизительно 7 т.н., по меньшей мере приблизительно 8 т.н., по меньшей мере приблизительно 9 т.н., по меньшей мере приблизительно 10 т.н., по меньшей мере приблизительно 11 т.н., по меньшей мере приблизительно 12 т.н. или более 12 т.н. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты (например, векторы или срРНК) могут иметь длину от приблизительно 4 т.н. до приблизительно 20 т.н., от приблизительно 4 т.н. до приблизительно 18 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 16 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 14 т.н., от приблизительно 7 т.н. до приблизительно 12 т.н., от приблизительно 8 т.н. до приблизительно 16 т.н., от приблизительно 9 т.н. до приблизительно 14 т.н., от приблизительно 10 т.н. до приблизительно 18 т.н., от приблизительно 11 т.н. до приблизительно 16 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 18 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 20 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 10 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 8 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 7 т.н., от приблизительно 5 т.н. до приблизительно 6 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 12 т.н., от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 11 т.н., приблизительно 6 т.н. до приблизительно 10 т.н., приблизительно

6 т.н. до приблизительно 9 т.н., приблизительно 6 т.н. до приблизительно 8 т.н., приблизительно 6 т.н. до приблизительно 7 т.н., приблизительно 7 т.н. до приблизительно 11 т.н., приблизительно 7 т.н. до приблизительно 10 т.н., приблизительно 7 т.н. до приблизительно 9 т.н., приблизительно 7 т.н. до приблизительно 8 т.н., приблизительно 8 т.н. до приблизительно 11 т.н., приблизительно 8 т.н. до приблизительно 10 т.н., приблизительно 8 т.н. до приблизительно 9 т.н., приблизительно 9 т.н. до приблизительно 11 т.н., приблизительно 9 т.н. до приблизительно 10 т.н. или приблизительно 10 т.н. до приблизительно 11 т.н. В некоторых вариантах конструкции нуклеиновых кислот (например, векторы или срРНК) могут иметь длину от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 14 т.н. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты (например, векторы или срРНК) могут иметь длину от приблизительно 6 т.н. до приблизительно 16 т.н.

[0088] Конструкции по настоящему изобретению могут включать необходимые элементы для прямой экспрессии представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, которая также находится в конструкции. Такие элементы могут включать контрольные элементы, такие как промотор, который функционально связан с (чтобы направлять транскрипцию) представляющей интерес последовательностью нуклеиновой кислоты, и необязательно включает последовательность полиаденилирования.

[0089] Один аспект настоящего изобретения относится к векторам, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную выше. Специалистам в данной области должно быть понятно, что термин «вектор» обычно относится к рекомбинантной полинуклеотидной конструкции, предназначенной для переноса между клетками-хозяевами, и которая может использоваться для целей трансформации, например, для введения гетерологичной ДНК в клетку-хозяина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вектор может быть репликоном (например, срРНК), таким как плазида, фаг или космида, в который может быть вставлен другой сегмент ДНК, для обеспечения репликации вставленного сегмента. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор может представлять собой интегрирующий вектор. В дополнение к компонентам конструкции вектор может включать, например, один или более селективных маркеров, один или более ориджинов репликации, таких как прокариотические и эукариотические ориджины репликации, по меньшей мере один сайт множественного клонирования и/или элементы для облегчения стабильной интеграции конструкции в геном клетки. Две или более конструкции могут быть включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты, такую как один вектор, или могут содержаться в двух или более отдельных молекулах нуклеиновой кислоты, таких как два или более отдельных векторов.

[0090] Молекулярные методики и методы, с помощью которых можно собрать и охарактеризовать конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, более подробно описаны в примерах настоящей заявки.

[0091] В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем изобретении, получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК (например, амплификации полимеразной цепной реакцией (ПЦР), клонирования и т. д.) или химического синтеза. Молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем изобретении, включают природные молекулы нуклеиновой кислоты и их гомологи, включая, не ограничиваясь этим, природные аллельные варианты и модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, в которых один или более нуклеотидных остатков были вставлены, делецированы и/или заменены таким образом, что такие модификации обеспечивают требуемое свойство в осуществлении биологической активности, описанной в настоящем изобретении.

[0092] Специалистам в данной области должно быть понятно, что молекулы нуклеиновой кислоты, включая варианты встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты, могут быть получены с использованием ряда методов, известных специалистам в данной области (см., например, Sambrook *et al.*, In: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Последовательность молекулы нуклеиновой кислоты может быть модифицирована по отношению к природной последовательности, из которой она получена, с использованием различных методов, включая, помимо прочего, классические методы мутагенеза и методы рекомбинантной ДНК, такие как, помимо прочего, направленный мутагенез, химическая обработка молекулы нуклеиновой кислоты для индукции мутаций, расщепление фрагмента нуклеиновой кислоты рестриктазой, лигирование фрагментов нуклеиновой кислоты, ПЦР-амплификация и/или мутагенез выбранных областей последовательности нуклеиновой кислоты, рекомбинационное клонирование и химический синтез, включая химический синтез смесей олигонуклеотидов и лигирование групп смесей для «создания» смеси молекул нуклеиновой кислоты, а также их комбинации. Гомологи молекул нуклеиновых кислот могут быть выбраны из смеси модифицированных молекул нуклеиновых кислот путем скрининга на предмет определения функции белка или репликона, например, самореплицирующейся РНК, кодированной молекулой нуклеиновой кислоты, и/или путем гибридизации с геном дикого типа или его фрагментом, с помощью ПЦР с использованием праймеров, имеющих гомологию с целевой или молекулой дикого типа или последовательностью нуклеиновой кислоты.

### С. Фармацевтические композиции

[0093] срРНК, конструкции нуклеиновой кислоты, векторы и рекомбинантные клетки по настоящему изобретению могут быть включены в композиции, включая фармацевтические композиции. Такие композиции обычно включают одну или более конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов, описанных и полученных в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент, например, носитель. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют для профилактики, лечения или контроля патологического состояния, такого как иммунное заболевание или микробная

инфекция. Например, композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в качестве профилактической композиции, терапевтической композиции или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый эксципиент или смесь эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют для применения в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют для применения в качестве адьюванта.

[0094] Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим: фармацевтически приемлемый эксципиент и: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; и/или б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению.

[0095] Неограничивающие варианты осуществления фармацевтических композиций по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, включающим рекомбинантную клетку, описанную в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0096] В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют в липосоме. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют в липидной наночастице (LNP). В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют в полимерной наночастице. В некоторых вариантах осуществления композиции являются иммуногенными композициями, например, композициями, которые могут индуцировать иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции составляют в виде вакцины. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют в виде адьюванта.

[0097] В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции являются по существу неиммуногенными для субъекта, например, композиции, которые минимально стимулируют иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления неиммуногенные или минимально иммуногенные композиции составляют в качестве биотерапевтического препарата. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутрибрюшинного введения, внутримышечного введения, интратрахеального введения, интранодального введения, интратуморального введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения, внутриглазного, ректального и перорального введения.

[0098] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные

порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsipanny, NJ) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). В этих случаях композиция должна быть стерильной и жидкой в той степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она может быть стабильной в условиях производства и хранения и может быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, включающая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ, например, додецилсульфата натрия. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях композиция предпочтительно включает изотонические агенты, например сахара, хлорид натрия и полиспирты, такие как маннит и сорбит, и/или хлорид натрия в композиции. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно достичь путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, моностеарата алюминия или желатина.

[0099] Стерильные инъекционные растворы можно приготовить включением активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. Обычно дисперсии готовят включением активного соединения в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше.

[0100] В некоторых вариантах осуществления композицию формулируют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутрибрюшинного введения, внутримышечного введения, интратрахеального введения, интранодального введения, интратуморального введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения, внутриглазного, ректального и перорального введения. В некоторых вариантах осуществления вводимая композиция приводит к усилению выработки интерферона у субъекта.

#### *D. Рекомбинантные клетки*

[0101] Как описано более подробно ниже, один аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантным клеткам, которые были сконструированы для включения конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем изобретении, вектора, описанного в настоящем изобретении, и/или включения (например, экспрессии)

конструкции срРНК, описанной в настоящем изобретении. Настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, где клетки содержат срРНК или конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую срРНК.

[0102] Конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть введены в клетку-хозяин для получения рекомбинантной клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую срРНК по настоящему изобретению. Следовательно, прокариотические или эукариотические клетки, которые содержат конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую срРНК, описанную в настоящем изобретении, также являются признаками изобретения. В связанном аспекте некоторые варианты осуществления, раскрытые в настоящем изобретении, относятся к способам трансформации клетки, которые включают введение в клетку-хозяина, такую как животная клетка, конструкции нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящем изобретении, и затем отбор или скрининг трансформированной клетки. Введение конструкций нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в клетки может быть достигнуто способами, известными специалистам в данной области, например, такими как вирусная инфекция, трансфекция, конъюгация, слияние протопластов, липофекция, электропорация, нуклеофекция, осаждение фосфатом кальция, трансфекция, опосредованная полиэтиленимином (PEI), трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном, трансфекция, опосредованная липосомами, технология генной пушки для доставки частиц, прямая микроинъекция, доставка нуклеиновой кислоты, опосредованная наночастицами, и тому подобное.

[0103] В одном аспекте некоторые варианты осуществления изобретения относятся к рекомбинантным клеткам, например, рекомбинантным клеткам животных, которые включают конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении. Конструкция нуклеиновой кислоты может быть стабильно интегрирована в геном хозяина или может быть эписомально реплицирующейся или присутствовать в рекомбинантной клетке хозяина в качестве мини-кольцевого экспрессионного вектора для стабильной или транзientной экспрессии. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты поддерживается и реплицируется в рекомбинантной клетке хозяина в качестве эписомальной единицы. В некоторых вариантах конструкция нуклеиновой кислоты стабильно интегрирована в геном рекомбинантной клетки. Стабильная интеграция может быть выполнена с использованием классических методов случайной геномной рекомбинации или с использованием более точных методов редактирования генома, таких как система редактирования генома CRISPR/Cas9 с использованием направляющей РНК или TALEN. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты присутствует в рекомбинантной клетке хозяина в виде мини-кольцевого экспрессионного вектора для стабильной или транзientной экспрессии.

[0104] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой прокариотическую клетку, например, бактерию *E. coli*, или эукариотическую

клетку, например, клетку насекомого (например, клетку комара или клетку Sf21), или клетки млекопитающих (например, клетки COS, клетки NIH 3T3 или клетки HeLa). В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vivo*, например, рекомбинантная клетка в живом организме, например, клетка трансгенного субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления субъектом является насекомое. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект-млекопитающее является человеком. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления животная клетка представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки почки обезьяны CV1, трансформированной SV40 (COS-7), клетки эмбриональной почки человека (например, клетки HEK 293 или HEK 293), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки Сертоли мышцы (например, клетки TM4), клетки почки обезьяны (например, CV1), клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), клетки почки собаки (например, MDCK), клетки печени крысы-буйвола (например, BRL 3A), клетки легкого человека (например, W138), клетки печени человека (например, Hep G2), клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562), клетки TRI, клетки FS4, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), клетки почки африканской зеленой мартышки (например, клетки Vero), клетки человека A549, клетки шейки матки человека, клетки человека CHME5, клетки человека PER.C6, клетки мышинной миеломы NS0, клетки эпидермоида гортани человека, клетки-фибробласта человека, клетки человека HUH-7, клетки человека MRC-5, мышечной клетки человека, эндотелиальной клетки человека, клетки-астроцита человека, клетки-макрофага человека, клетки человека RAW 264.7, клетки мышцы 3T3, клетки мышцы L929, клетки соединительной ткани мышцы, мышечной клетки мышцы и клетки почки кролика.

[0105] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку насекомого, например, клетку линии клеток насекомых. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку Sf21. Дополнительные подходящие линии клеток насекомых включают, не ограничиваясь этим, линии клеток, созданные из клеток отрядов насекомых *Diptera*, *Lepidoptera* и *Hemiptera*, и они могут быть получены из различных тканевых источников. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку линии клеток чешуекрылых насекомых. За последние несколько десятилетий доступность линий клеток чешуекрылых насекомых увеличилась приблизительно на 50 линий в десятилетие. Более

подробную информацию о доступных линиях клеток чешуекрылых насекомых можно найти, например, в публикации Lynn D.E., *Available lepidopteran insect cell lines*. *Methods Mol. Biol.*, 2007;388:117-38, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку комара, например, клетку видов комаров родов *Anopheles* (*An.*), *Culex* (*Cx.*) и *Aedes* (*Stegomyia*) (*Ae.*). Примеры линий клеток комаров, подходящих для композиций и способов, описанных в настоящем изобретении, 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, не ограничиваясь этим, CCL-125, Aag-2, RML-12, C6/26, C6/36, C7-10, AP-61, A.t. GRIP-1, A.t. GRIP-2, UM-AVE1, Mos.55, Sua1B, 4a-3B, Mos.43, MSQ43 и LSB-AA695BB. В некоторых вариантах осуществления клетка комара представляет собой клетку клеточной линии C6/26.

#### E. Культура клеток

[0106] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клеточным культурам, включающим по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, раскрытую в настоящем изобретении, и культуральную среду. Как правило, культуральная среда может представлять собой любую подходящую культуральную среду для культивирования клеток, описанных в настоящем изобретении. Методы трансформации широкого ряда вышеуказанных клеток-хозяев и видов известны в данной области и описаны в технической и научной литературе. Следовательно, клеточные культуры, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, раскрытую в настоящем изобретении, также входят в объем настоящей заявки. Методы и системы, подходящие для создания и поддержания клеточных культур, известны в данной области

#### F. Трансгенные животные

[0107] Также в еще одном аспекте настоящее изобретение относится к трансгенным животным, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, вектор, описанный в настоящем изобретении, и/или включающим (например, экспрессирующим) конструкцию срРНК, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления насекомым является комар. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления трансгенное млекопитающее является млекопитающим, отличным от человека. Как правило, трансгенные животные по настоящему изобретению могут быть любым животным, отличным от человека, известным в данной области. Примеры животных, отличных от человека, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, могут включать, без ограничений, лабораторных животных (например,

мышей, крыс, хомяков, песчанок, морских свинок и т. д.), домашний скот (например, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, овец, коз, уток, гусей, кур и т. д.), приматов, отличных от человека (например, обезьян, шимпанзе, орангутанов, мартышек и т. д.), рыб, амфибий (например, лягушек, саламандр и т. д.), рептилий (например, змей, ящериц и т. д.) и других животных (например, лисиц, ласок, кроликов, норок, бобров, горностаев, выдр, соболей, тюленей, койотов, шиншилл, оленей, ондатр, опоссумов и т. д.). Трансгенных «нечеловеческих» животных-хозяев по настоящему изобретению получают с использованием стандартных методов, известных в данной области для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в геном «нечеловеческого» животного. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное продуцирует представляющий интерес белок.

[0108] В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное является позвоночным животным или беспозвоночным животным. В некоторых вариантах осуществления животное является насекомым. В некоторых вариантах осуществления животное является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является млекопитающим, отличным от человека. В некоторых вариантах осуществления «нечеловеческие» животные по изобретению являются «нечеловеческими» приматами. Другие виды животных, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают животных, которые: (i) подходят для трансгенеза и (ii) способны перестраивать сегменты гена иммуноглобулина для получения ответной выработки антител. Примеры таких видов включают, не ограничиваясь этим, мышей, крыс, хомяков, кроликов, курами, коз, свиней, овец и коров. Подходы и методы получения трансгенных нечеловеческих животных известны в данной области. Примеры методов включают пронуклеарную микроинъекцию, микроинъекцию ДНК, опосредованный лентивирусным вектором перенос ДНК в ранние эмбрионы и опосредованный спермой трансгенез, опосредованное аденовирусом введение ДНК в сперму животных (например, свиней), использование ретровирусных векторов (например, виды птиц), перенос ядра соматической клетки (например, козы). Обзор современного уровня получения трансгенных домашних сельскохозяйственных животных представлен в публикации Niemann, H. et al. (2005) Rev. Sci. Tech., 24:285-298.

[0109] В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой насекомое. В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные по настоящему изобретению являются химерными трансгенными животными. В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные по настоящему изобретению являются трансгенными животными с зародышевыми клетками и соматическими клетками, содержащими одну или более (например, одну или более, две или более, три или более, четыре или более и т.д.) конструкций нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления одна или более конструкций нуклеиновых кислот стабильно интегрированы в геном трансгенных животных. В некоторых вариантах осуществления геномы трансгенных животных по настоящему изобретению могут

включать любые из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более копий одной или более конструкций нуклеиновой кислоты, векторов и/или срРНК по настоящему изобретению.

#### **IV. Наборы**

[0110] Также настоящее изобретение относится к различным наборам для практического применения способа, описанного в настоящем изобретении. В частности, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к наборам для получения представляющего интерес полипептида с использованием способов, описанных в настоящем изобретении. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для индукции фармакодинамического эффекта у субъекта. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для индукции иммунного ответа у субъекта. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для профилактики патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для способов лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для способов индукции иммунного ответа у субъекта. Например, в настоящем изобретении представлены, в некоторых вариантах осуществления, наборы, которые включают одну или более срРНК, конструкций нуклеиновой кислоты, векторов, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций, как предоставлено и описано в настоящем изобретении, а также письменные инструкции по получению и применению этого.

[0111] В некоторых вариантах осуществления наборы по настоящему изобретению дополнительно включают одно или более средств, пригодных для введения любой из обеспеченных срРНК, конструкций нуклеиновой кислоты, векторов, рекомбинантных клеток 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 обеспеченных конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций субъекту. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать один или более дополнительных терапевтических агентов, которые могут вводиться одновременно или последовательно с другими компонентами набора для желаемой цели, например, для диагностики, профилактики или лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом.

[0112] Любой из вышеописанных наборов может дополнительно включать один или более дополнительных реагентов, где такие дополнительные реагенты могут быть выбраны из: буферов для разбавления, растворов для восстановления, промывочных буферов, контрольных реагентов, контрольных экспрессионных векторов, отрицательных контролей, положительных контролей, реагентов, подходящих для получения *in vitro* обеспеченных конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток и/или

фармацевтических композиций по изобретению.

[0113] В некоторых вариантах осуществления компоненты набора могут находиться в отдельных контейнерах. В некоторых других вариантах осуществления компоненты набора могут быть объединены в одном контейнере.

[0114] В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно включать инструкции по применению компонентов набора для практического применения способов, раскрытых здесь. Инструкции по практическому применению способов обычно записаны на подходящем носителе записи. Например, инструкции могут быть напечатаны на подложке, такой как бумага или пластик и т. д. Инструкции могут находиться в наборе в виде вкладыша в упаковку, на этикетке контейнера набора или его компонентов (например, связанных с упаковкой или субупаковкой) и т. д. Инструкции могут находиться в виде файла в системе электронного хранения данных, присутствующего на подходящем носителе, считываемом компьютером, например, CD-ROM, дискете, флэш-накопителе и т. д. В некоторых случаях фактические инструкции отсутствуют в наборе, но могут быть предоставлены средства для получения инструкций из удаленного источника (например, через Интернет). Примером такого варианта является набор, который включает веб-адрес, где инструкции можно просмотреть и/или с которого инструкции можно загрузить. Как и в случае с инструкциями, такое средство для получения инструкций может быть записано на подходящей подложке.

## **V. Способы**

### *Способы получения функциональных самореплицирующихся РНК*

[0115] Также настоящее изобретение относится к способам получения функциональной самореплицирующейся РНК (срРНК) из одного или более нефункциональных одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК) или нефункциональных срРНК. Неограничивающие примеры варианта осуществления раскрытых способов получения функциональных самореплицирующихся РНК могут включать один или более из следующих признаков.

[0116] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения функциональной самореплицирующейся РНК (срРНК), включающим: (а) обеспечение исходного материала, (b) удаление одного или более сайтов терминации транскрипции РНК-полимеразы или криптоических сайтов терминации из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК; (с) создание множества фрагментов нуклеиновой кислоты, каждый из которых содержит нуклеотидную последовательность, полученную из исходного материала, и (d) сборку множества фрагментов нуклеиновой кислоты для получения функциональной собранной *de novo* срРНК.

[0117] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения функциональной самореплицирующейся РНК (срРНК), включающим: (а) обеспечение одного или более одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК) или нефункциональных срРНК, где по меньшей мере один из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК является нефункциональным; (b)

удаление одного или более сайтов терминации T7 или криптоических сайтов терминации T7 из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК; (с) создание множества фрагментов нуклеиновой кислоты, каждый из которых содержит нуклеотидную последовательность, полученную из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК, и (d) сборку множества фрагментов нуклеиновой кислоты для получения функциональной собранной *de novo* срРНК.

[0118] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения функциональной самореплицирующейся РНК (срРНК), включающим: (а) обеспечение одного или более одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК) или нефункциональных срРНК, где по меньшей мере один из одного или нескольких вирусных +оцРНК геномов или срРНК является нефункциональным; (b) удаление одного или более сайтов терминации SP6 или криптоических сайтов терминации РНК-полимеразы SP6 из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК; (с) создание множества фрагментов нуклеиновой кислоты, каждый из которых содержит нуклеотидную последовательность, полученную из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК, и (d) сборку множества фрагментов нуклеиновой кислоты для получения функциональной собранной *de novo* срРНК.

[0119] В некоторых вариантах осуществления исходный материал, раскрытый в настоящем изобретении, представляет собой один или более одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК). В некоторых вариантах осуществления исходный материал представляет собой только вирусные +оцРНК геномы. В некоторых вариантах осуществления весь исходный материал представляет собой срРНК. В некоторых вариантах осуществления исходный материал включает комбинацию одного или более вирусных +оцРНК геномов и срРНК, где по меньшей мере один из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК является нефункциональным. В некоторых вариантах осуществления весь исходный материал является нефункциональным. В некоторых вариантах исходный материал включает комбинацию функциональных и нефункциональных срРНК. В некоторых вариантах срРНК и/или вирусные +оцРНК геномы являются полноразмерными. В других вариантах срРНК и/или вирусные +оцРНК геномы не являются полноразмерными, а являются их фрагментами.

[0120] В некоторых вариантах осуществления исходный материал включает по меньшей мере одну нефункциональную срРНК или +оцРНК. В некоторых вариантах осуществления исходный материал включает, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более нефункциональных срРНК и/или +оцРНК. В еще одних вариантах осуществления исходный материал включает от приблизительно 1 до приблизительно 12, от приблизительно 2 до приблизительно 11, от приблизительно 3 до приблизительно 10, от приблизительно 4 до приблизительно 9, от приблизительно 5 до приблизительно 8, от приблизительно 6 до приблизительно 7 нефункциональных срРНК или +оцРНК.

[0121] В некоторых вариантах осуществления исходный материал включает различные комбинации функциональных и нефункциональных срРНК и/или +оцРНК или

их фрагментов. В некоторых вариантах 10%, 15%, или 20%, или 25%, или 30%, или 35%, или 40%, или 45%, или 50%, или 55%, или 60%, или 65%, или 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90%, или 95%, 100% срРНК или +оцРНК являются нефункциональными. В некоторых вариантах все срРНК и/или +оцРНК являются нефункциональными.

[0122] Однако в некоторых вариантах осуществления исходный материал включает один или более фрагментов ДНК, кодирующих требуемую последовательность РНК. В некоторых вариантах осуществления исходный материал включает синтетическую молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления синтетическая молекула ДНК включает последовательность, основанную на известной последовательности срРНК. В некоторых вариантах осуществления исходным материалом может быть плазмидный остов, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую известную представляющую интерес последовательность РНК.

[0123] В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем изобретении, все срРНК и/или +оцРНК в исходном материале происходят из одного вида. В некоторых вариантах осуществления способов все срРНК или +оцРНК в исходном материале происходят из разных штаммов или разных изолятов одного вида. В некоторых вариантах осуществления срРНК или +оцРНК происходят из разных видов.

[0124] Способы получения функциональных срРНК, раскрытые в настоящем изобретении, включают стадию удаления одного или более сайтов терминации транскрипции РНК-полимеразы или криптоических сайтов терминации из исходного материала (например, одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК). Неограничивающие примеры сайтов терминации транскрипции, подходящих для способов, раскрытых в настоящем изобретении, включают сайты РНК-полимераз бактериофагов, таких как ДНК-зависимые полимеразы T3, T7 и SP6. В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов терминации транскрипции включают сайты терминации бактериофага T7. В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов терминации включают криптоические сайты терминации T7. В некоторых вариантах осуществления сайты терминации включают сайты терминации SP6. В некоторых вариантах осуществления сайты терминации включают криптоические сайты терминации SP6.

[0125] Специалистам в данной области должно быть понятно, что для удаления сайтов терминации транскрипции РНК-полимеразы можно использовать ряд доступных методов. Такие методы включают в себя, например, не ограничиваются этим, удаление путем рестрикционного расщепления или направленного мутагенеза для создания молчащих мутаций, или синтезом фрагмента(ов) с молчащими мутациями или субклонированием для удаления сайта(ов) и т. д.

[0126] Способы получения функциональных срРНК, раскрытые в настоящем изобретении, включают стадию создания множества фрагментов нуклеиновой кислоты, каждый из которых содержит нуклеотидную последовательность, полученную из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК. Специалистам в данной области должно

быть понятно, что можно использовать любой метод создания фрагментов нуклеиновой кислоты. Например, амплификацию ПЦР, рестрикционное расщепление, химический синтез и т. д.

[0127] Способы получения функциональных сРНК, раскрытые в настоящем изобретении, включают сборку множества фрагментов нуклеиновой кислоты для получения функциональной собранной *de novo* сРНК. Специалистам в данной области должно быть понятно, что можно использовать любой метод сборки фрагментов нуклеиновой кислоты. Например, посредством лигирования или процедур на основе ПЦР, таких как методы сборки Гибсона, или методом слияния ПЦР и т. д. Например, в некоторых вариантах осуществления первоначальная сборка вектора сРНК осуществляется рестрикционным расщеплением плазмидного остова и химическим синтезом фрагментов. В некоторых вариантах осуществления последующая повторная сборка с участками из разных штаммов осуществляется рестрикционным расщеплением плазмиды, ПЦР из векторов, кодирующих векторы сРНК, и сборкой Гибсона.

[0128] В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем изобретении, множество фрагментов нуклеиновой кислоты имеют длину от приблизительно 60 нуклеотидов до приблизительно 5000 нуклеотидов каждый. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов нуклеиновой кислоты имеют длину от приблизительно 100 до приблизительно 4000 нуклеотидов. В других вариантах осуществления множество фрагментов нуклеиновой кислоты имеют длину от приблизительно 200 до приблизительно 3000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фрагменты нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем изобретении, имеют длину от приблизительно 200 до приблизительно 1000 нуклеотидов. В еще одних вариантах осуществления фрагменты нуклеиновой кислоты имеют длину от приблизительно 200 до приблизительно 500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов нуклеиновой кислоты представляют собой одноцепочечные или двухцепочечные нуклеиновые кислоты.

[0129] В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем изобретении, функциональная собранная *de novo* сРНК может не содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков. В некоторых аспектах функциональная собранная *de novo* сРНК может не содержать значительной части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков. Специалистам в данной области должно быть понятно, что значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный структурный полипептид, может включать достаточно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный структурный полипептид, чтобы обеспечить предполагаемую идентификацию этого полипептида, либо путем ручной оценки последовательности специалистами в данной области, либо путем автоматизированного сравнения и идентификации последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BLAST (см., например, «Basic Local Alignment Search Tool»;

Altschul SF et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1993). Соответственно, значительная часть нуклеотидной последовательности включает достаточно последовательности, чтобы обеспечить специфическую идентификацию и/или выделение фрагмента нуклеиновой кислоты, включающего 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% от полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вектор альфавирусной сРНК не содержит всю последовательность, кодирующую вирусные структурные белки, например, функциональная собранная *de novo* сРНК не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вирусные структурные белки.

[0130] В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем изобретении, вирусные +оцРНК геномы или сРНК могут происходить из вируса, относящегося к роду *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. В некоторых вариантах осуществления вирусный +оцРНК геном или сРНК представляет собой вид альфавируса, относящийся к группе VEEV/EEEV, или группе SFV, или группе SINV. В некоторых вариантах вирусные +оцРНК геномы или сРНК могут представлять собой геномы альфавируса, такого как вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддлбург (MIDV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус О'Ньонг-Ньонг (ONNV), вирус Росс-Ривер (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Маяро (MAYV), вирус Уна (UNAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHAIV), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайленд J (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), вирус Ндumu (NDUV), вирус Мадариага (MADV) и вирус Багги-Крик. В некоторых вариантах вирусный +оцРНК геном или сРНК могут представлять собой вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус Синдбис (SINV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), вирус Мадариага (MADV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV) или вирус леса Семлики (SFV). В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой VEEV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой EEEV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой CHIKV. В некоторых вариантах осуществления альфавирус представляет собой SINV.

[0131] Подходящие последовательности альфавируса дикого типа хорошо известны и доступны в базах данных последовательностей, таких как NCBI Genbank, Американская коллекция типовых культур, Rockville, Md. Репрезентативные примеры подходящих альфавирусов включают вирус Аура (ATCC VR-368), вирус Бебару (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), вирус Кабассу (ATCC VR-922), вирус Чикунгунья (ATCC VR-

64, ATCC VR- 1241), вирус восточного энцефаломиелита лошадей (ATCC VR-65, ATCC VR- 1242), вирус Форт-Морган (ATCC VR-924), вирус Гета (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), вирус Кызылагач (ATCC VR-927), вирус Майаро (ATCC VR-66), вирус Майаро (ATCC VR-1277), вирус Миддлбург (ATCC VR-370), вирус Мукамбо (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), вирус Ндumu (ATCC VR-371), вирус Пиксуна (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), вирус Росс-Ривер (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), вирус леса Семлики (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), вирус Синдбис (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), вирус Тонате (ATCC VR-925), вирус Тринити (ATCC VR-469), вирус Уна (ATCC VR-374), вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532), вирус западного энцефаломиелита лошадей (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), вирус Ватароа (ATCC VR-926) и Y-62-33 (ATCC VR-375).

[0132] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способ дополнительно включает включение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный ген, в собранную *de novo* срРНК. Гетерологичный ген может быть любым представляющим интерес геном (GOI).

[0133] Полипептид, кодируемый GOI, может представлять собой, как правило, любой полипептид, и может быть, например, терапевтическим полипептидом, профилактическим полипептидом, диагностическим полипептидом, нутрицевтическим полипептидом, промышленным ферментом и репортерным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления GOI кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антитела, антигена, иммуномодулятора, фермента, сигнального белка и цитокина. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность GOI оптимизирована для экспрессии на уровне, превышающем уровень экспрессии референтной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность GOI оптимизирована для повышения стабильности РНК. Известно несколько методологий и методов, пригодных для оценки стабильности РНК, включая различные *in silico* методологии и/или эмпирическое стресс-тестирование хранения срРНК с различным использованием кодонов GOI и его влияние на эффективность срРНК (например, изучение дцРНК в клетках после трансфекции) и экспрессию генов. Дополнительную информацию по этому вопросу можно найти, например, в Wayment-Steele H. et al. (2021). Cold Spring Harbor Laboratory ([doi.org/10.1101/2020.08.22.262931](https://doi.org/10.1101/2020.08.22.262931)). В некоторых вариантах полипептид, кодируемый GOI, является рекомбинантным полипептидом.

[0134] В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид может представлять собой последовательность, которая приводит к образованию нескольких полипептидных продуктов, связанных саморасщепляющимися пептидами (например, P2A) или разделенных последовательностью(и) IRES.

[0135] В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем изобретении, по меньшей мере участок последовательности нуклеиновой кислоты,

кодирующей вирусные структурные белки собранной *de novo* срРНК, заменяется экспрессионной кассетой, содержащей гетерологичный ген, функционально связанный с промотором. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген может быть функционально связан с субгеномным (sg) промотором. Промотор sg может представлять собой субгеномный промотор 26S.

[0136] В еще одних вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способ дополнительно включает удаление одного или более сайтов рестрикции из одного или более нефункциональных +оцРНК геномов или срРНК. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из удаленных сайтов рестрикции распознается рестриктазой, подходящей для линейаризации собранной *de novo* срРНК или для вставки гетерологичного гена в собранную *de novo* срРНК.

[0137] В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем изобретении, полученная функциональная собранная срРНК включает 3'-полиаденилатный тракт (поли(А)-хвост). В некоторых вариантах осуществления 3'-поли(А)-хвост включает по меньшей мере 11 адениннуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 3'-поли(А)-хвост включает по меньшей мере 15 нуклеотидов. Однако в некоторых вариантах осуществления 3'-поли(А)-хвост включает по меньшей мере 20 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов, по меньшей мере 30 нуклеотидов, по меньшей мере 35 нуклеотидов, по меньшей мере 40 нуклеотидов, по меньшей мере 50 нуклеотидов, по меньшей мере 60 нуклеотидов, по меньшей мере 70 нуклеотидов, по меньшей мере 80 нуклеотидов, по меньшей мере 90 нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов, по меньшей мере 200 нуклеотидов или по меньшей мере 250 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 3'-поли(А)-хвост имеет длину от приблизительно 11 до приблизительно 300, или от приблизительно 20 до приблизительно 250, или от приблизительно 30 до приблизительно 200, или от приблизительно 40 до приблизительно 150, или от приблизительно 50 до приблизительно 100 адениннуклеотидов.

[0138] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем изобретении, дополнительно включают замену одной или более нетранслируемых областей (UTR) или их участков в собранной *de novo* срРНК в UTR из другого вида, подвида или штамма альфавируса или вирусного +оцРНК генома. В некоторых вариантах осуществления замене подвергается только 5'-UTR или ее участок. В некоторых вариантах осуществления заменяется только 3'-UTR или ее участок. В некоторых вариантах осуществления одна или более UTR заменяются гетерологичными UTR из другого подвида +оцРНК вируса или другого вида +оцРНК вируса, или другого штамма +оцРНК вируса относительно вида нефункционального вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления заменяются как 3'-UTR, так и 5'-UTR. В таких вариантах осуществления как 3'-UTR, так и 5'-UTR заменяются гетерологичными UTR из того же вида, подвида или штамма +оцРНК вируса. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR и 5'-UTR заменяются гетерологичными UTR из разных видов, подвигов или штаммов +оцРНК вируса. Штамм может происходить из вирулентного или авирулентного варианта вируса.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичные последовательности 5'-UTR и/или 3'-UTR могут происходить из вируса Чикунгунья. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные последовательности 5'-UTR и/или 3'-UTR могут происходить из штамма Чикунгунья S27. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные последовательности 5'-UTR и/или 3'-UTR могут происходить из штамма Чикунгунья DRDE-06.

[0139] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способ включает замену неструктурного белка (nsP) или его участка в собранной *de novo* сРНК гетерологичным nsP. Гетерологичный nsP или его участок может происходить из другого вида или подвида +оцРНК вируса. В некоторых аспектах nsP или его участок получен из другого штамма того же вида +оцРНК вируса. В некоторых вариантах осуществления nsP или его участок представляет собой nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 или участок любого из них.

[0140] Во время репликации вируса каждая из субъединиц nsP (например, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) полипротеинового комплекса nsP процессируется по отдельности в отдельный белок. Затем эти белки объединяются, образуя полипротеиновый комплекс nsP, который выполняет геномную и субгеномную функцию транскрипции. Не желая связываться с какой-либо конкретной теорией, полагается, что каждый сам по себе nsP является разумно биологически самодостаточным с точки зрения вклада в общую функцию сРНК и должен рассматриваться как дискретная модульная единица. В некоторых вариантах осуществления способа функционализации нефункционального альфавирусного генома или сРНК каждая из субъединиц nsP рассматривается в качестве дискретной модульной единицы и может быть заменена (обменена) соответствующей модульной единицей из другого вируса (например, другого вида или другого штамма того же вида), что приводит к образованию химерного вируса с новыми характеристиками. Раскрытый в настоящем описании способ позволяет проводить научную оценку эффекта обмена nsP в следующем минимальном ряду: (1) сРНК, которая не подвергается успешной репликации и/или экспрессии белка в клетках *in vitro*; и (2) сРНК, которая подвергается успешной репликации и/или экспрессии белка в клетках *in vitro*. Такой подход быстро дает информацию о том, какой nsP создает проблемы для любого заданного штамма, без необходимости создания большого количества новых конструкций. В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем изобретении, способ включает выбор nsP или UTR из вариантов вирулентного вида +оцРНК вируса. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем изобретении, способ включает выбор nsP или UTR из вариантов авирулентного вида +оцРНК вируса. В некоторых вариантах осуществления выбор видов или подвидов +оцРНК может быть сделан на основе выбора вирулентных или авирулентных вариантов на основе того, были ли охарактеризованы иммуномодулирующие механизмы в областях NSP или областях UTR. Специалисты в данной области легко поймут, что вирулентные виды или подвиды или штаммы часто обладают большей или меньшей иммуностимулирующей или

воспалительной активностью по сравнению с авирулентными видами или подвидами или штаммами. Это может иметь преимущества или недостатки в отношении пригодности данного вектора для его применения в зависимости от того, желательна ли повышенная иммуногенность (вакцина) или пониженная иммуногенность (биотерапевтический GOI). Если фенотип вирулентности связан с последовательностью в nsP или UTR, то он, вероятно, окажет существенное влияние на конечное применение функционализированного вектора срРНК. Например, при функционализации авирулентного штамма в вектор срРНК может быть желательным выбрать nsP(s) и/или UTR(s) из других авирулентных видов или подвидов или штаммов, или может быть желательно выбрать nsP(s) и/или UTR(s) из вирулентных видов или подвидов или штаммов. В некоторых вариантах осуществления при функционализации вирулентного штамма в вектор срРНК может быть желательным выбрать nsP(s) и/или UTR(s) из авирулентных видов или подвидов или штаммов. В некоторых вариантах осуществления может быть желательным выбрать nsP(s) и/или UTR(s) из других вирулентных видов или подвидов, или штаммов.

[0141] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем изобретении, включают оценку функциональности собранной *de novo* срРНК. В некоторых вариантах осуществления оценка функциональности проводится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления оценка функциональности проводится *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления оценка функциональности проводится *ex vivo*. В еще одних вариантах осуществления оценка функциональности включает анализ одной или более конструкций собранной *de novo* срРНК на предмет способности к саморепликации *in vivo*. В еще одних вариантах осуществления оценка функциональности включает анализ одной или более конструкций собранной *de novo* срРНК на предмет способности к саморепликации *ex vivo*.

[0142] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем изобретении, оценка функциональности генома альфавируса или срРНК выполняется с использованием анализа, включающего: детектирование репликации РНК, детектирование экспрессии вирусного белка, детектирование цитопатического эффекта (CPE) и детектирование гетерологичной экспрессии генов.

[0143] В некоторых вариантах осуществления оценка функциональности собранной *de novo* срРНК выполняется посредством включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный ген, в собранную *de novo* срРНК. В других вариантах осуществления способов включают оценку функциональности собранных конструкций без включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный ген, в одну или более собранных *de novo* срРНК. В некоторых вариантах осуществления нефункциональность генома альфавируса или срРНК определяется дефицитом саморепликации в клетке-хозяине.

[0144] В общем, функциональность срРНК можно оценить с использованием одного или более анализов и методологий, известных в данной области. Примеры

подходящих аналитических методов оценки функциональности включают, помимо прочего, иммуноблоттинг, флуоресцентную проточную цитометрию, твердофазный иммуноферментный анализ, анализ иммуногенности, анализ биологической активности и эффективности на модели заболевания. В некоторых вариантах осуществления нефункциональность собранной срРНК определяется по дефициту саморепликации в клетке-хозяине. В частности, нефункциональная срРНК или вирусный геном могут быть идентифицированы как неспособные к саморепликации в клеточной культуре или первичной клеточной линии, например, не ограничиваясь этим, ВНК, VERO или HEK293. Примерный анализ, который можно использовать для детекции реплицирующихся векторов, включает анализ эффективности *in vitro*. В этом анализе реплицирующиеся векторы детектируются с помощью метода, в котором измеряется эффективность репликации посредством захвата промежуточной дцРНК и сопоставимой экспрессии белка в отдельных клетках с использованием антигенспецифического моноклонального антитела J2. Испытуемую срРНК разбавляют и непосредственно электропорируют в клетки. Когда испытуемая срРНК (входная композиция срРНК) инкапсулируют или адсорбируют в невирусной системе доставки, то детергент (или другой метод экстракции) используется для выделения срРНК из системы доставки перед ее электропорацией в клетки. После достаточной инкубации клетки фиксируют и подвергают иммуноанализу с использованием конъюгированного с флуорофором антитела (J2), которое специфически детектирует промежуточное звено репликации дцРНК вектора. Клетки с положительным сигналом указывают на присутствие интактной и функциональной дцРНК, которую можно количественно определить с использованием флуоресцентной проточной цитометрии. Результатом анализа является частота положительных клеток на нг трансфектированной РНК. Имеет место зависимость от дозы частота трансфектированных дцРНК+ клеток, что дает возможность построить сигмоидальную кривую, которая сходна со стандартной кривой, получаемой в широко используемом твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) для количественной оценки других биологических молекул. Референтный стандарт срРНК можно использовать для «сглаживания» вариабельности клеточного анализа и обеспечения возможности сравнения эффективности между анализами. Референтный стандарт срРНК может представлять собой аликвоту большого препарата, который хранится при  $-80^{\circ}\text{C}$ , и эффективность каждой испытуемой РНК определяется относительно стандарта.

[0145] В некоторых вариантах осуществления аналогичная стратегия количественной оценки титров вирусных репликационных частиц (VRP) может использоваться посредством инфицирования клеток последовательными разведениями частиц с последующим проведением иммуноанализа с антителом J2.

[0146] В некоторых вариантах осуществления функциональность срРНК оценивается измерением белков, экспрессированных из срРНК. Например, РНК можно трансформировать электропорацией в клетки ВНК-21 или Vero (например, 4D-Nucleofector™, Lonza). После достаточной инкубации после трансформации клетки

фиксируют и пермеабелизируют (набор eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer, Invitrogen) и окрашивают с использованием конъюгированного с флуорофором моноклонального антитела, специфичного к представляющему интерес белку, для количественной оценки частоты белок<sup>+</sup> клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI) белка в отдельных клетках с использованием флуоресцентной проточной цитометрии.

[0147] Примерный рабочий процесс по настоящему изобретению начинается с обеспечения одного или более нефункциональных геномов или срРНК или комбинации функциональных и нефункциональных срРНК и удаления любого сайта терминации РНК-полимеразы или криптического сайта терминации, такого как сайт терминации T7, криптического сайта терминации T7, сайта терминации SP6 или криптического сайта терминации SP6 из одной или более срРНК, тем самым генерируя множество фрагментов нуклеиновых кислот *de novo*, собирая из фрагментов размером от приблизительно 60 п.н. до 5000 п.н., для получения матрицы ДНК, которую можно использовать для транскрипции *in vitro* для генерации срРНК с поли(А)-хвостом, имеющим по меньшей мере 11 адениннуклеотидов. Собранная срРНК может включать промотор, 5'-UTR и последовательности, кодирующие: nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, субгеномный промотор 26S, адаптер и/или трансген, 3'-UTR и поли(А), за которым следует терминатор или сайт рестрикции. Функциональность собранной *de novo* срРНК можно тестировать *in vivo* или *in vitro* без использования гетерологичного гена или с использованием гетерологичного гена, или обоих вариантов. Если обнаружено, что срРНК является нефункциональной, например, не отсутствовала репликация или экспрессия белка, то один или более nsP или их участков обмениваются местами или заменяются гетерологичным nsP. В качестве альтернативы, если собранная срРНК оказывается нефункциональной, то одну или более UTR можно заменить гетерологичными UTR. UTR, как описано выше, могут представлять собой 5'- или 3'-UTR или обе. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов срРНК, которые используются для получения функциональных срРНК по настоящему изобретению, синтезируются *de novo*.

[0148] Другой пример рабочего процесса для функционализации сборки вектора срРНК заключается в следующем. Несколько фрагментов нуклеиновой кислоты (могут быть от 100 т.н. до 12 т.н.) можно синтезировать (любым известным методом) на основе референтной последовательности +оцРНК генома альфавируса или срРНК из базы данных генов, такого как Genbank (исходный материал; например, штамм 1 +оцРНК вируса). Фрагменты могут быть синтезированы с уникальным сайтом рестрикции для расщепления рестриктазой вместо кодирующей последовательности вирусных структурных генов. Промотор РНК-полимеразы включается апстрим последовательности генома, и последовательность полиА может находиться, если она еще не присутствует, за которой следует уникальный сайт рестрикции для расщепления рестриктазой, за которым следует последовательность терминатора, за которой следует другой уникальный сайт рестрикции для расщепления рестриктазой. Участки могут быть объединены любым известным

методом, например, с использованием набора для пятикомпонентной реакции сборки Gibson Assembly® (например, линейаризованный остов плазмиды с рестрикцией и четыре синтезированных фрагмента). Вышеуказанный вектор на удивление нефункционален (т. е. он не подвергается саморепликации и/или не способен экспрессировать тестируемый трансген/белок). Вышеуказанный вектор может быть функционализирован путем замены одного или более эндогенных nsP или UTR гетерологичным эквивалентом. Например, заменой эндогенного nsP2 гетерологичным nsP2 из срРНК 2-го штамма вируса 1 следующим образом. Вышеуказанный вектор линейаризуют рестрикционным расщеплением, и большой фрагмент выделяют гель-экстракцией после гель-электрофореза. Этот линейаризованный продукт может не содержать часть других эндогенных nsP. Недостающая часть эндогенных nsP генерируется с помощью ПЦР из матрицы нефункционального вектора срРНК, описанного выше. Гетерологичный nsP2 из штамма 2 генерируется с помощью ПЦР из матрицы другого вектора срРНК (который готовится аналогично вектору срРНК штамма 1 выше) на основе опубликованной референтной последовательности второго штамма. Участки объединяют в реакции сборки с использованием набора Gibson Assembly®, в результате чего получается функциональный вектор срРНК. Во втором примере эндогенная 3'-UTR заменяется гетерологичной 3'-UTR из срРНК 2-го штамма вируса 1 следующим образом. Нефункциональный вектор линейаризуют рестриктазным расщеплением, и большой фрагмент выделяют путем гель-экстракцией после гель-электрофореза. Линейаризованный продукт может не иметь части других характеристик вектора срРНК, таких как полиА, сайт(ы) рестрикции или терминатор T7. Гетерологичную 3'-UTR и отсутствующие характеристики вектора генерируются с помощью ПЦР из матрицы другого вектора срРНК (который готовится аналогично вектору срРНК штамма 1 выше) на основе опубликованной референтной последовательности второго штамма. Участки объединяются в реакции сборки с использованием набора Gibson Assembly®, в результате чего получается функциональный вектор срРНК.

[0149] Функциональность срРНК, полученной в соответствии со способами по настоящему изобретению, можно тестировать с использованием процедуры транскрипции *in vitro*, например, как описано в примере 4 ниже.

[0150] Способы получения функциональных срРНК, раскрытые в настоящем изобретении, могут быть различными, как это могут оценить специалисты в данной области, но все равно оставаться в рамках изобретения. При наличии нефункциональной срРНК функциональная срРНК может быть получена сборкой фрагментов нуклеиновой кислоты, кодирующих всю или участки нефункциональной срРНК после удаления любых сайтов терминации РНК-полимеразы или криптоических сайтов терминации.

[0151] Также в соответствии со способами получения функциональной срРНК по настоящему изобретению функциональную срРНК можно получить сборкой фрагментов нуклеиновой кислоты, кодирующих всю или участки нефункциональной срРНК после удаления любых сайтов терминации РНК-полимеразы или криптоических сайтов

терминации (таких как сайты терминации T7, криптоические сайты терминации T7, сайты терминации SP6 или криптоические сайты терминации SP6) и использования фрагмента, кодирующего гетерологичную UTR, как описано в настоящем изобретении.

[0152] В некоторых вариантах осуществления способов получения функциональной срРНК по настоящему изобретению функциональная срРНК может быть получена сборкой фрагментов нуклеиновой кислоты, кодирующих всю или участки нефункциональной срРНК после удаления любых сайтов терминации РНК-полимеразы или криптоических сайтов терминации (таких как сайты терминации T7, криптоические сайты терминации T7, сайты терминации SP6 или криптоические сайты терминации SP6) и использования одного или более фрагментов, кодирующих гетерологичный nsP, как описано выше.

Способы индукции фармакодинамического эффекта, профилактики или лечения патологических состояний

[0153] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам индукции фармакодинамического эффекта у субъекта, где способы включают введение субъекту композиции, включающей: (a) функциональную срРНК, описанную в настоящем изобретении, (b) конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, (c) рекомбинантную клетку, описанную в настоящем изобретении, и/или (d) фармацевтическую композицию, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фармакодинамический эффект включает в себя индукцию иммунного ответа у субъекта.

[0154] Примеры фармакодинамических эффектов, которые можно анализировать, включают: эффект иммуногенности (например, индукцию иммунного ответа *in vivo*), ответ на биомаркер, терапевтический эффект, профилактический эффект, желаемый эффект, нежелательный эффект, неблагоприятный эффект и эффект на модели заболевания. В некоторых вариантах осуществления оценка фармакодинамических эффектов включает в себя оценку индукции иммунного ответа *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления оценка фармакодинамических эффектов включает в себя оценку индукции цитокиновых путей, которые могут усиливать иммунный ответ и предотвращать ангиогенез и метастазирование.

[0155] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам профилактики или лечения патологического состояния у субъекта, где способ включает введение субъекту композиции, включающей: (a) функциональную срРНК, описанную в настоящем изобретении, (b) конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, (c) рекомбинантную клетку, описанную в настоящем изобретении, и/или (d) фармацевтическую композицию, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фармакодинамический эффект включает в себя индукцию иммунного ответа у субъекта.

[0156] Введение любой из фармацевтических или терапевтических композиций, описанных в настоящем изобретении, например, конструкции нуклеиновой кислоты,

рекомбинантные клетки, можно использовать в лечении соответствующих патологических состояний, таких как пролиферативные расстройства (например, рак) и хронические инфекции (например, вирусные инфекции). В некоторых вариантах конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, могут быть включены в терапевтические агенты для применения в способах лечения индивидуума или субъекта, у которого имеет место, у которого подозревают наличие или который может иметь высокий риск развития одного или более соответствующих патологических состояний или заболеваний. Примеры патологических состояний или заболеваний могут включать, без ограничений, рак, иммунные заболевания, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, генную терапию, замену генов, сердечно-сосудистые заболевания, возрастные патологии, острую инфекцию и хроническую инфекцию. В некоторых вариантах индивидуум является пациентом, находящимся под наблюдением врача.

[0157] Примеры аутоиммунных заболеваний, подходящих для способов по настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь этим, ревматоидный артрит, остеоартрит, болезнь Стилла, семейную средиземноморскую лихорадку, системный склероз, рассеянный склероз, анкилозирующий спондилит, тиреоидит Хашимото, тиреоидит, системную красную волчанку, синдром Шегрена, диабетическую ретинопатию, диабетическую васкулопатию, диабетическую невралгию, инсулит, псориаз, гнездную алопецию, тепловую и холодную аутоиммунную гемолитическую анемию (АНА), пернициозную анемию, острые воспалительные заболевания, аутоиммунный адреналит, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP), синдром Ламберта-Итона, склерозирующий лишай, болезнь Лайма, болезнь Грейвса, болезнь Бехчета, болезнь Меньера, реактивный артрит (синдром Рейтера), синдром Черджа-Стросса, синдром Когана, синдром CREST, пузырьчатку обыкновенную и листовидную, буллезный пемфигоид, ревматическую полимиалгию, полимиозит, первичный билиарный цирроз, панкреатит, перитонит, псориазический артрит, ревматизм, саркоидоз, склеродермию, целиакию, синдром «ригидного человека», артериит Такаясу, транзиторную непереносимость глютена, аутоиммунный увеит, витилиго, полихондрит, герпетиформный дерматит (DH) или болезнь Дюринга, фибромиалгию, синдром Гудпасчера, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, аутоиммунный гепатит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, миастению гравис, иммунокомплексные болезни, гломерулонефрит, узелковый полиартериит, антифосфолипидный синдром, полигландулярный аутоиммунный синдром, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), крапивницу, аутоиммунное бесплодие, ювенильный ревматоидный артрит, саркоидоз и аутоиммунную кардиомиопатию.

[0158] Неограничивающие примеры инфекций, подходящих для способов по настоящему изобретению, включают вирусные инфекции, вызванные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита В (HCV), вирусом гепатита С (HCV),

цитомегаловирусом (CMV), респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом папилломы человека (HPV), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV2), коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), вирусом респираторного синдрома Ближнего Востока (MERS), вирусом гриппа и вирусом Эбола. Еще одни инфекции, подходящие для способов по настоящему изобретению, включают инфекции, вызванные внутриклеточными паразитами, такими как лейшмании, риккетсии, хламидии, коксии, плазмодии, бруцеллы, микобактерии, листерии, токсоплазмы и трипаносомы. В некоторых вариантах осуществления конструкции срРНК, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции могут быть пригодными в лечении и/или профилактике иммунных заболеваний, аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, например, таких как гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника, нефрит, перитонит, псориаз, псориатический артрит, остеоартрит, болезнь Стилла, семейная средиземноморская лихорадка, системная склеродермия и склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, острое повреждение легких, менингит, энцефалит, увеит, множественная миелома, гломерулонефрит, нефрит, астма, атеросклероз, дефицит адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Шегрена, ювенильный диабет, болезнь Рейтера, болезнь Бехчета, иммунокомплексный нефрит, IgA-нефропатия, IgM-полинейропатии, иммуноопосредованная тромбоцитопения, гемолитическая анемия, миастения гравис, волчаночный нефрит, красная волчанка, ревматоидный артрит (RA), анкилозирующий спондилит, пузырчатка, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, васкулиты мелких сосудов, синдром Оменна, хроническая почечная недостаточность, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, острый инфекционный мононуклеоз, ВИЧ, заболевания, вызванные вирусом герпеса, вирусные инфекции человека, вызванные коронавирусом, другим энтеровирусом, вирусом герпеса, вирусом гриппа, вирусом парагриппа, респираторно-синцитиальным вирусом, или аденовирусная инфекция, бактериальная пневмония, раны, сепсис, церебральный инсульт/отек мозга, ишемически-реперфузионное повреждение и гепатит С.

[0159] Неограничивающие примеры воспалительных заболеваний, подходящих для способов по настоящему изобретению, включают воспалительные заболевания, такие как астма, воспалительные заболевания кишечника (IBD), хронический колит, спленомегалия и ревматоидный артрит.

[0160] В некоторых вариантах осуществления субъектом является позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее-субъект. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее-субъект является человек.

[0161] Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту композиции, включающей: а) конструкцию нуклеиновой

кислоты по изобретению; b) рекомбинантную клетку по изобретению; и/или c) фармацевтическую композицию по изобретению.

[0162] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам профилактики и/или лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, включающей: a) конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению; b) рекомбинантную клетку по изобретению; и/или c) фармацевтическую композицию по любому аспекту изобретения.

[0163] В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние представляет собой пролиферативное расстройство или микробную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подозревается в наличии патологического состояния, связанного с пролиферативным расстройством или микробной инфекцией.

[0164] В некоторых вариантах осуществления раскрытую композицию составляют таким образом, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем введения. Например, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции по изобретению можно вводить перорально или путем ингаляции, но более вероятно, что они будут вводиться парентеральным путем. Примерами парентеральных путей введения являются, например, внутривенное, интранодальное, внутрикожное, подкожное, чрескожное (местное), трансмукозальное, интравагинальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, фиксированные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с использованием кислот или оснований, таких как одно- и/или двухосновный фосфат натрия, соляная кислота или гидроксид натрия (например, до pH приблизительно 7,2-7,8, например, 7,5). Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократного применения, изготовленные из стекла или пластика.

[0165] Дозировку, токсичность и терапевтическую эффективность таких рассматриваемых конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток и/или фармацевтических композиций по изобретению можно определить стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, для определения LD<sub>50</sub> (дозы, летальной для 50% популяции) и ED<sub>50</sub> (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсическими и терапевтическими эффектами представляет собой терапевтический

индекс, и его можно выразить как отношение  $LD_{50}/ED_{50}$ . Соединения, которые демонстрируют высокие терапевтические индексы, как правило, являются подходящими. Хотя соединения, обладающие токсическими побочными эффектами, могут использоваться, следует проявлять осторожность при разработке системы доставки, которая нацеливает такие соединения на участок пораженной ткани, чтобы свести к минимуму потенциальное повреждение неинфицированных клеток и, таким образом, уменьшить побочные эффекты.

[0166] Например, данные, полученные в анализах на клеточной культуре и на животных, можно использовать для определения диапазона дозировок для применения у людей. Дозировка таких соединений обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают  $ED_{50}$  с проявлением низкой токсичности или без нее. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способе по настоящему изобретению, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценить по данным анализов на клеточной культуре. Дозу можно определить на животных моделях для достижения диапазона циркулирующей концентрации в плазме крови, который включает  $IC_{50}$  (например, концентрацию испытуемого соединения, которая достигает полумаксимального ингибирования симптомов), как определено на клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодных доз у людей. Уровни в плазме можно измерить, например, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0167] Терапевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, например, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции, могут вводиться от одного или более раз в сутки до одного или нескольких раз в неделю; включая один раз через день. Специалистам в данной области должно быть понятно, что определенные факторы могут оказывать влияние на дозировку и время, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, не ограничиваясь этим, тяжесть заболевания, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством рассматриваемых мультвалентных полипептидов и мультвалентных антител по изобретению может включать однократное лечение или может включать серию лечений. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят каждые 8 ч в течение пяти суток, за которыми следует период отдыха от 2 до 14 суток, например, 9 суток, за которыми следуют дополнительные пять суток введения каждые 8 ч. В отношении конструкций нуклеиновой кислоты, то терапевтически эффективное количество конструкции нуклеиновой кислоты (например, эффективная дозировка) зависит от выбранной конструкции нуклеиновой кислоты. Например, можно вводить разовые дозы в диапазоне от приблизительно 0,001 до 0,1 мг/кг массы тела пациента. В некоторых вариантах можно

вводить приблизительно 0,005, 0,01, 0,05 мг/кг. В некоторых вариантах можно вводить разовые дозы в диапазоне от приблизительно 0,03 мкг до 300 мкг/кг массы тела пациента. В некоторых вариантах можно вводить разовые дозы в диапазоне от приблизительно 0,3 мг до 3 мг/кг массы тела пациента.

[0168] Как обсуждалось выше, терапевтически эффективное количество включает количество терапевтической композиции, которое достаточно для обеспечения определенного эффекта при введении субъекту, например, тому, у кого имеет место, имеется подозрение на наличие или существует риск развития заболевания, например, заболевания или инфекции. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество включает количество, достаточное для предотвращения или задержки развития симптома заболевания или инфекции, изменения течения симптома заболевания или инфекции (например, не ограничиваясь этим, замедления прогрессирования симптома заболевания или инфекции) или устранения симптома заболевания или инфекции. Понятно, что для любого конкретного случая соответствующее эффективное количество может быть определено специалистами в данной области с использованием рутинного экспериментирования.

[0169] Эффективность лечения, включающего раскрытую терапевтическую композицию для лечения заболевания или инфекции, могут определить опытные клиницисты. Однако лечение считается эффективным, если хотя бы один или все признаки или симптомы заболевания или инфекции ослабляются или смягчаются. Эффективность также можно оценить по отсутствию ухудшения состояния человека, что оценивается по отсутствию необходимости в госпитализации или необходимости медицинского вмешательства (например, прогрессирование заболевания или инфекции останавливается или по меньшей мере замедляется). Методы оценки этих показателей известны специалистам в данной области и/или описаны в настоящем изобретении. Лечение включает любое лечение заболевания или инфекции у субъекта или животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающего) и включает: (1) подавление заболевания или инфекции, например, остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания или инфекции, например, вызывая регресс симптомов; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития симптомов.

[0170] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции по изобретению можно вводить субъекту в составе, содержащем фармацевтически приемлемый носитель, и в количестве, эффективном для индукции иммунного ответа. Как правило, субъект может быть иммунизирован посредством начальной серии инъекций (или введения одним из других путей, описанных ниже) и затем ему могут быть введены бустеры для повышения защиты, обеспечиваемой первоначальной серией введений. Начальная серия инъекций и последующие бустеры вводятся в таких дозах и в течение такого периода времени, которые необходимы для индукции иммунного ответа у субъекта. В некоторых вариантах

введенная композиция приводит к повышению выработки интерферона у субъекта. В некоторых вариантах осуществления раскрытых способов субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек.

[0171] Как описано выше, фармацевтически приемлемые носители, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если соединения являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления экстенперо стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В этих случаях композиция может быть стерильной и может быть жидкой в той степени, в которой ее легко вводить шприцем. Композиция может быть стабильной в условиях производства и хранения и может быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. д.), подходящие их смеси и растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвратить действие микроорганизмов можно с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, асорбиновой кислоты, тимеросала и т. п.

[0172] Стерильные инъекционные растворы можно приготовить включением конструкций нуклеиновой кислоты и рекомбинантных клеток в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией.

[0173] Когда конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции соответствующим образом защищены, как описано выше, то их можно вводить перорально, например, с инертным разбавителем или усваиваемым съедобным носителем. Конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции и другие ингредиенты также могут быть заключены в твердую или мягкую желатиновую капсулу, спрессованы в таблетки или включены непосредственно в рацион человека. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть включено с эксципиентами и использовано в форме таблеток для приема внутрь, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т. п.

[0174] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению могут быть доставлены в клетку или в организм субъекта с использованием липидной наночастицы (LNP). LNP, как правило, являются менее иммуногенными, чем вирусные частицы. В то время как у многих людей имеется предрасполагающий иммунитет к вирусным частицам, то предрасполагающий иммунитет к LNP отсутствует. Кроме того, маловероятно развитие адаптивного иммунного ответа

против LNP, что позволяет повторно вводить LNP.

[0175] Было разработано несколько различных ионизируемых катионных липидов для применения в LNP. К ним относятся C12-200, MC3, LN16 и MD1 среди прочих. Например, в одном типе LNP фрагмент GalNAc присоединен к внешней стороне LNP и функционирует в качестве лиганда для поглощения в печень через рецептор асиалогликопротеина. Любой из этих катионных липидов можно использовать для формулирования LNP в целях доставки конструкций нуклеиновых кислот по изобретению в печень.

[0176] В некоторых вариантах LNP относится к любой частице, имеющей диаметр менее 1000 нм, 500 нм, 250 нм, 200 нм, 150 нм, 100 нм, 75 нм, 50 нм или 25 нм. В качестве альтернативы наночастица может иметь размер от 1 до 1000 нм, 1 до 500 нм, 1 до 250 нм, 25-200 нм, 25-100 нм, 35-75 нм или 25-60 нм.

[0177] LNP могут быть изготовлены из катионных, анионных или нейтральных липидов. Нейтральные липиды, такие как фузогенный фосфолипид DOPE или мембранный компонент холестерин, могут быть включены в LNP в качестве «вспомогательных липидов» для повышения активности трансфекции и стабильности наночастиц. Ограничения катионных липидов включают низкую эффективность за счет низкой стабильности и быстрого выведения, а также развития воспалительных или противовоспалительных реакций. LNP также могут содержать гидрофобные липиды, гидрофильные липиды или как гидрофобные, так и гидрофильные липиды.

[0178] Любой липид или комбинация липидов, которые были разработаны для применения в LNP, можно использовать для получения LNP по изобретению. Неограничивающие примеры липидов, подходящих для использования в получении LNP, включают DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерин, DOTAP-холестерин, GAP-DMORIE-DPPE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоль (PEG). Неограничивающие примеры катионных липидов, подходящих для применения в производстве LNP, включают 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 и 7C1. Неограничивающие примеры нейтральных липидов, подходящих для использования в производстве LNP, включают DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. Неограничивающие примеры липидов, модифицированных ПЭГ, подходящих для использования в производстве LNP, включают PEG-DMG, PEG-CerC14 и PEG-CerC20.

[0179] В некоторых вариантах осуществления липиды можно комбинировать в любых количественных молярных соотношениях для получения LNP. Кроме того, полинуклеотид(ы) можно комбинировать с липидом(ами) в широком диапазоне молярных соотношений для получения LNP.

[0180] В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, например, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции, включаются в терапевтические композиции для применения в способах профилактики или лечения субъекта, у которого есть, подозревается наличие или может иметь место высокий риск

развития рака, аутоиммунного заболевания и/или инфекции.

[0181] В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, например, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки и/или фармацевтические композиции, включаются в терапевтические композиции для применения в способах профилактики или лечения субъекта, у которого имеет место, имеется подозрение на наличие или может быть высокий риск развития микробной инфекции. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой грибковую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой вирусную инфекцию.

[0182] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в комбинации по меньшей мере с одной дополнительной терапией (например, второй терапией). В некоторых вариантах осуществления вторая терапия выбрана из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсинотерапии, таргетной терапии и хирургии. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия выбрана из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсинотерапии или хирургии. В некоторых вариантах осуществления первая терапия и вторая терапия вводятся одновременно. В некоторых вариантах осуществления первая терапия вводится одновременно со второй терапией. В некоторых вариантах осуществления первая терапия и вторая терапия вводятся последовательно. В некоторых вариантах осуществления первая терапия вводится перед второй терапией. В некоторых вариантах осуществления первая терапия вводится после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления первая терапия вводится перед второй терапией. В некоторых вариантах осуществления первая терапия вводится после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления первая терапия вводится до и после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления первая терапия и вторая терапия вводятся поочередно. В некоторых вариантах осуществления первая терапия и вторая терапия вводятся вместе в одной формуле.

*Способы получения представляющего интерес полипептида*

[0183] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения представляющего полипептида, где способы включают: (i) разведение трансгенного животного по изобретению; или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, включающей конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении, в условиях, при которых рекомбинантная клетка продуцирует полипептид, кодируемый срРНК.

[0184] Неограничивающие примеры вариантов осуществления раскрытых способов получения рекомбинантного полипептида могут включать один или более из следующих

признаков. В некоторых вариантах осуществления способы получения рекомбинантного полипептида по изобретению дополнительно включают выделение и/или очистку полученного полипептида. В некоторых вариантах осуществления способы получения полипептида по изобретению дополнительно включают структурную модификацию полученного полипептида для увеличения периода полураспада.

[0185] Обсуждение общих методов, приведенных в настоящем изобретении, предназначено только для иллюстративных целей. Другие альтернативные методы и альтернативы будут очевидны для специалистов в данной области после ознакомления с этим раскрытием и должны быть включены в дух и сферу действия этой заявки.

[0186] Следует понимать, что определенные особенности раскрытия, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. Наоборот, различные особенности раскрытия, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к раскрытию, специально охвачены настоящим раскрытием и раскрыты в настоящем изобретении так же, как если бы каждая комбинация была индивидуально и явно раскрыта. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов также специально охвачены настоящим раскрытием и раскрыты в настоящем изобретении так же, как если бы каждая такая подкомбинация была индивидуально и явно раскрыта в настоящем изобретении.

[0187] В данной заявке упоминаются различные патенты, патентные заявки и другие типы публикаций (например, журнальные статьи, записи в электронных базах данных и т. д.). Раскрытие всех патентов, патентных заявок и других публикаций, цитируемых здесь, настоящим включено в качестве ссылки в полном объеме для любых целей.

## **Примеры**

### **Пример 1**

#### *Обмен nsP для функционализации вектора срPHK*

[0188] Пример сборки вектора срPHK, которая неожиданно привела к получению нефункциональной SINV AR86 срPHK, представляет собой следующее. Синтезировали четыре участка размером ~4 т.н. (Twist Bioscience, Thermo Fisher GeneArt) на основе референтной последовательности SINV AR86 (Genbank U38305) с уникальным сайтом рестрикции для расщепления рестриктазой (SpeI, 5'-A'CTAG, T-3') вместо кодирующей последовательности структурных генов SINV (где 5'-A является следующим нуклеотидом после последовательности 3'-адаптера P2A, следующей за нуклеотидом 93 гена структурного полипротеина, и 3'-T соответствует расположению стоп-кодона TGA структурного полипротеина). Промотор PHK-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3') включали апстрим от последовательности генома SINV, и даунстрим находилась последовательность полиА, за которой следовал уникальный сайт

рестрикции (SapI, 5'-GCTCTTC(N)1'(N)3,-3'), за которым следовала последовательность терминатора T7 (5'-AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTT-3'), за которой следовал уникальный сайт рестрикции для расщепления рестриктазой (NotI, 5'-GC'GGCC, GC-3'). Участки объединяли с использованием набора для пятикомпонентной реакции сборки Gibson Assembly® (например, линейризованный плазмидный остов с рестриктазой и четыре синтезированных фрагмента).

[0189] Вышеуказанный вектор функционизировали заменой SINV AR86 nsP2 на SINV Girdwood nsP2 следующим образом. Вышеуказанный вектор линейризовали рестрикционным расщеплением с использованием BbvCI и AflII, и большой фрагмент выделяли гель-экстракцией после гель-электрофореза. В этом линейризованном продукте отсутствовала часть AR86 nsP1, весь AR86 nsP2 и часть AR86 nsP3. Левый фрагмент вставки, содержащий отсутствующую часть AR86 nsP1, получали с помощью ПЦР из нефункциональной матрицы вектора SINV AR86 срPHK, описанного выше. Отсутствующая часть AR86 nsP3 была аналогичным образом получена с использованием ПЦР. Girdwood nsP2 получали с помощью ПЦР из матрицы вектора SINV Girdwood срPHK, который готовили аналогично вектору SINV AR86 срPHK выше на основе референтной последовательности SINV Girdwood (Genbank MF459683) с использованием праймеров, которые добавляли гомологичные концы к другим продуктам ПЦР. Участки объединяли с использованием набора для четырехкомпонентной реакции сборки Gibson Assembly® (например, исходный рестрикционный линейризованный остов SINV AR86 и три фрагмента ПЦР) с получением функционального вектора SINV AR86 срPHK.

[0190] Конструирование векторов SINV AR86 срPHK, содержащих гетерологичные гены, выполняли следующим образом: функциональный вектор, описанный выше, линейризовали расщеплением SpeI. Ген гемагглютини́на (HA) из вируса гриппа (Genbank AY651334) кодон-оптимизировали/реорганизовали для экспрессии у человека *in silico* и синтезировали *de novo* (IDT). Синтетический продукт амплифицировали с использованием праймеров, которые добавляли 5'- и 3'-последовательности адаптеров к концу гена HA. Продукт расщепления и продукт ПЦР объединяли с использованием набора для процедуры Gibson Assembly® для получения конечного вектора. В качестве альтернативы варианты ESR1, PI3K, HER2 и HER3 кодон-оптимизировали/реорганизовали для экспрессии у человека *in silico* и вместе с EMCV IRES синтезировали *de novo* (GeneArt, IDT). Синтетические продукты амплифицировали с использованием праймеров, которые добавляли либо 5'- и 3'-последовательности адаптеров к концам генов, либо праймеров, которые добавляли последовательности Р2А и/или последовательности гомологии к соседним вставкам генов. Продукт расщепления и продукты ПЦР объединяли с использованием набора для процедуры Gibson Assembly® для получения конечного вектора.

## **Пример 2**

### Обмен UTR для функционализации вектора срPHK

[0191] Еще один пример сборки вектора срPHK, который неожиданно привел к

образованию нефункциональной CHIKV DRDE-06 срРНК, представлял собой следующее. Синтезировали четыре участка размером ~4 т.н. (Twist Bioscience, Thermo Fisher GeneArt) на основе референтной последовательности CHIKV DRDE-06 (Genbank EF210157) с уникальным сайтом рестрикции для расщепления рестриктазой (SpeI, 5'-A'CTAG, T-3') вместо кодирующей последовательности структурных генов CHIKV (где 5'-А является следующим нуклеотидом после 3'-последовательности адаптера P2A, следующей за нуклеотидом 93 структурного полипротеинового гена, и 3'-Т соответствует расположению стоп-кодона TGA структурного полипротеина). Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАG-3') включали апстрим от последовательности генома CHIKV, даунстрим находилась последовательность полиА, за которой следовал уникальный сайт рестрикции (SapI, 5'-GCTCTTC(N)1'(N)3,-3'), за которой следовала последовательность терминатора T7 (5'-ААССССТСТСТАААСGAGGGGTTTTTTT-3'), за которой следовал уникальный сайт рестрикции для расщепления рестриктазой (NotI, 5'-GC'GGCC, GC-3'). Участки объединяли с использованием набора для пятикомпонентной реакции сборки Gibson Assembly® (например, плазмидный остов, линейаризованный расщеплением рестриктазой и четыре синтезированных фрагмента), что приводило к получению базового вектора CHIKV DRDE-06 срРНК.

[0192] Вектор CHIKV DRDE-06 срРНК функционизировали расщеплением рестриктазами SpeI и NotI нефункционального базового вектора DRDE-06 и объединяли с использованием набора для двухкомпонентной реакции сборки Gibson Assembly® с линейаризованным остовом и продуктом ПЦР из вектора CHIKV S27, содержащим последовательность 3'-UTR, полиА и терминатора T7.

[0193] Конструирование векторов CHIKV DRDE-06 срРНК, содержащих гетерологичные гены, выполняли следующим образом: функциональный вектор, описанный выше, линейаризовали расщеплением SpeI. Ген гемагглютинаина (HA) из вируса гриппа (Genbank AY651334) кодон-оптимизировали/реорганизовали для экспрессии у человека *in silico* и синтезирован *de novo* (IDT). Синтетический продукт амплифицировали с использованием праймеров, которые добавляли 5'- и 3'-последовательности адаптера к концу гена HA. Продукт расщепления и продукт ПЦР объединяли с использованием набора для процедуры Gibson Assembly® для получения конечного вектора (CHIKV-DRDE-HA, показанного на фиг. 5). В качестве альтернативы варианты ESR1, PI3K, HER2 и HER3 кодон-оптимизировали/реорганизовали для экспрессии у человека *in silico* и вместе с EMCV IRES синтезировали *de novo* (GeneArt, IDT). Синтетические продукты амплифицировали с использованием праймеров, которые добавляли либо 5'- и 3'-последовательности адаптеров к концам генов, либо праймеров, которые добавляли последовательности P2A и/или последовательности гомологии к соседним вставкам генов. Продукт расщепления и продукты ПЦР объединяли с использованием набора для процедуры Gibson Assembly® для получения конечного вектора (CHIKV-DRDE-Oncology, показанного на фиг. 6).

**Пример 3**Транскрипция *in vitro*

[0194] Функциональность *срРНК*, полученной в соответствии со способами по настоящему изобретению, можно анализировать с использованием процедуры транскрипции *in vitro*, например, следующим образом. Получали РНК с помощью транскрипции *in vitro* с использованием матрицы плазмидной ДНК, которую линейаризовали ферментативным расщеплением с помощью SapI, которая разрезает конец поли(А). Полимеразу бактериофага T7 использовали для транскрипции *in vitro* либо с 5' ARCA-кэпом (набор мРНК HiScribe™ T7 ARCA, NEB), либо с помощью транскрипции без кэпа (набор для синтеза РНК HiScribe™ T7 High Yield, NEB) с последующим добавлением 5'-кэпа 1 (система кэпирования вируса осповакцины, мРНК кэп 2'-О-метилтрансфераза, NEB). *срРНК* выделяли экстракцией смесью фенола/хлороформа, осаждали хлоридом лития или очищали на колонке (набор для очистки РНК Monarch®, NEB). Концентрацию РНК определяли по поглощению при 260 нм (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific). Идентичность продуктов *срРНК* оценивали с использованием гель-электрофореза.

**Пример 4**Оценка функциональных *срРНК in vitro*

[0195] В данном примере описаны результаты экспериментов *in vitro*, проведенных для оценки функциональности конструкций, описанных в примере 1 выше.

[0196] Транскрипция *in vitro*: *срРНК* получали транскрипцией *in vitro* с использованием матрицы плазмидной ДНК, линейаризованной ферментативным расщеплением. В этих примерах ДНК либо линейаризовали с помощью NotI, которая разрезает даунстрим от терминатора T7, либо линейаризовали с помощью SapI, которая разрезает на конце поли(А). Полимеразу бактериофага T7 использовали для транскрипции *in vitro* либо с 5' ARCA-кэпом (набор мРНК HiScribe™ T7 ARCA, NEB), либо с помощью транскрипции без кэпа (набор синтеза РНК HiScribe™ T7 High Yield, NEB) с последующим добавлением 5'-кэпа 1 (система кэпирования осповакцины, мРНК кэп 2'-О-метилтрансфераза, NEB). *срРНК* выделяли экстракцией смесью фенола/хлороформа, осаждали хлоридом лития или очищали на колонке (набор для очистки РНК Monarch®, NEB). Концентрацию РНК определяли по поглощению при 260 нм (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

[0197] Репликация. *срРНК* трансформировали электропорацией в клетки ВНК-21 или Vero (например, 4D-Nucleofector™, Lonza). Через 17-20 ч после трансформации клетки фиксировали и пермеабелизировали (eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen) и окрашивали с использованием PE-конъюгированного мышинового моноклонального антитела против дцРНК (J2, Scicons) для количественной оценки частоты дцРНК+ клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI) дцРНК в отдельных клетках с помощью флуоресцентной проточной цитометрии.

[0198] Как показано на фиг. 7, нефункциональная *срРНК* штамма SINV AR86

может быть функционализована с помощью гетерологичного nsP2 из штамма SINV Girdwood. Это демонстрируется увеличением частоты дцРНК+ клеток при использовании гетерологичного nsP2 из штамма SINV Girdwood.

### **Пример 5**

#### Оценка функциональных срРНК *in vivo*

[0199] В данном примере описаны результаты экспериментов *in vivo*, проведенных для оценки любых дифференциальных иммунных ответов после вакцинации функционализованными конструкциями срРНК, описанными в примере 1 выше (например, векторами, неформулированными и формулированными в LNP).

[0200] Мыши и инъекции. Самок мышей C57BL/6 или BALB/c получали в питомнике Charles River Labs или Jackson Laboratories. В день введения внутримышечно вводили 0,1-10 мкг материала, который разделяли на обе четырехглавые мышцы. Векторы вводили в виде неформулированных в физиологическом растворе или формулированными в LNP. У животных контролировали массу тела и другие общие показатели в течение всего исследования. Для исследования иммуногенности животным вводили дозы на сутки 0 и сутки 21. Селезенки отбирали на сутки 35, и сыворотку выделяли на сутки 0, 14 и 35. Для исследования экспрессии белка животным вводили дозы на сутки 0, и биолюминесценцию измеряли на сутки 1, 3 и 7. Визуализацию активности люциферазы *in vivo* проводили с использованием системы IVIS на указанные временные точки.

[0201] Формуляция в LNP. срРНК формулировали в липидных наночастицах с использованием микрофлюидного смесителя и определяли размер частиц, полидисперсность с использованием динамического рассеяния света и эффективность инкапсуляции. Молярные соотношения липидов, используемых при формуляции частиц LNP, составляли 30% C12-200, 46,5% холестерина, 2,5% ПЭГ-2К и 16% DOPE.

[0202] ELISpot. Для измерения величины специфичных для вируса гриппа Т-клеточных ответов проводили анализ IFN $\gamma$  ELISpot с использованием набора Mouse IFN $\gamma$  ELISpot PLUS (HRP) (MabTech) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, спленоциты выделяли и ресуспендировали до титра  $5 \times 10^6$  клеток/мл в среде, содержащей пептиды, представляющие эпитопы CD4+ или CD8+ Т-клеток для HA, РМА/иономицин в качестве положительного контроля или ДМСО в качестве имитации стимуляции.

[0203] Внутриклеточное окрашивание на цитокины. Селезенки выделяли в соответствии с методами, описанными для ELISpots, и  $1 \times 10^6$  клеток добавляли к клеткам, содержащим среду, в общем объеме 200 мкл на лунку. Каждая лунка содержала пептиды, представляющие эпитопы CD4+ или CD8+ Т-клеток для HA, РМА/иономицин в качестве положительного контроля или ДМСО в качестве имитации стимуляции. Через 1 ч в каждую лунку добавляли ингибитор транспорта белка GolgiPlug™ (BD Biosciences). Клетки инкубировали еще в течение 5 ч. После инкубации поверхность клеток окрашивали на CD8+ (53-6.7), CD4+ (GK1.5), B220 (B238128), Gr-1 (RB6-8C5), CD16/32 (M93) с использованием стандартных методов. После окрашивания поверхностей клетки фиксировали и окрашивали на внутриклеточные белки в соответствии со стандартными

методами для IFN $\gamma$  (RPA-T8), IL-2 (JES6-5H4) и TNF (MP6-XT22). Затем клетки анализировали на проточном цитометре, и полученные файлы FCS анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo версия 10.4.1.

[0204] Антитела. Ответную выработку антител для измерения общего уровня HA-специфического IgG определяли с использованием наборов ELISA от Alpha Diagnostic International в соответствии с инструкциями производителя.

[0205] Конструкцию CHIKV-DRDE-HPV16 (показанную на фиг. 4) получали с использованием методов, описанных в примере 2 выше. Конструкцию формулировали в LNP и вводили мышам и анализировали с помощью анализа ELISpot, как описано выше.

[0206] Конструкцию SINV-AR86-HA и конструкцию CHIKV-DRDE-HA (показано на фиг. 5) получали с использованием методов, описанных в примерах 1 и 2 выше. Конструкции формулировали в LNP и вводили мышам и анализировали с помощью анализа ELISpot, как описано выше. Результаты показывали, что эти функционализированные векторы срПНК могут индуцировать иммунные ответы *in vivo* (фиг. 9).

[0207] Аналогичным образом, конструкцию SINV-AR86-Oncology и конструкцию CHIKV-DRDE-Oncology (показано на фиг. 6) получали с использованием методов, описанных в примерах 1 и 2 выше. Конструкции формулировали в LNP и вводили мышам и анализировали с помощью анализа ELISpot с пептидами ESR1 и HER2 (в отличие от пептидов HA). Результаты показывали, что эти функционализированные векторы срПНК могут индуцировать иммунные ответы *in vivo* (фиг. 10).

### **Пример 6**

#### Оценка *in vivo* функциональных векторов срПНК с гетерологичными неструктурными белковыми генами или с гетерологичными UTR

[0208] В данном примере описаны результаты экспериментов *in vivo*, проведенных для оценки любых дифференциальных иммунных ответов после вакцинации функционализированными конструкциями срПНК, полученными из векторов срПНК, описанных в примере 1 и 2 выше.

[0209] В этих экспериментах были сконструированы и затем оценивали синтетические конструкции срПНК, полученные из вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE.TC83), штаммов вируса Чикунгунья S27 (CHIK.S27) и DRDE-06 (CHIK.DRDE), штаммов вируса Синдбис Girdwood (SIN.GW) и AR86 (SIN.AR86) и вируса восточного энцефалита лошадей (EEE.FL93).

[0210] Мыши и инъекции. Самок мышей BALB/c получали из питомника Charles River Labs или Jackson Laboratories. В день введения внутримышечно вводили 0,15-1,5 мкг материала, который разделяли на обе четырехглавые мышцы. Векторы вводили в виде формулированных в LNP. У животных контролировали массу тела и другие общие показатели в течение всего исследования. Для исследования иммуногенности животным вводили дозы на сутки 0 и сутки 21. Селезенки отбирали на сутки 35, и сыворотку выделяли на сутки 0, 14 и 35.

[0211] Формуляция в LNP. срРНК формулировали в липидных наночастицах (LNP) с использованием микрофлюидного смесителя и определяли размер частиц, полидисперсность с использованием динамического рассеяния света и эффективность инкапсуляции. LNP состояли из ионизированного липида, холестерина, ПЭГ-2К и DOPE.

[0212] ELISpot. Для измерения величины антигенспецифических ответов Т-клеток проводили анализ IFN $\gamma$  ELISpot с использованием набора Mouse IFN $\gamma$  ELISpot PLUS (HRP) (MabTech) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, спленоциты выделяли и ресуспендировали до титра  $1-5 \times 10^6$  клеток/мл в среде, содержащей либо пептидные пулы, соответствующие гликопротеину G вируса бешенства, РМА/иономицин в качестве положительного контроля, либо ДМСО в качестве имитации стимуляции.

[0213] Антитела. Ответную выработку нейтрализующих антител против вируса бешенства измеряли с помощью теста быстрого ингибирования флуоресцентного фокуса. Вкратце, разведения сыворотки смешивали со стандартным количеством живого вируса бешенства и инкубировали. Если присутствуют нейтрализующие антитела против вируса бешенства, то они нейтрализовали вирус. Затем добавляли культивированные клетки, и сыворотку/вирус/клетки инкубировали вместе. Непокрытый вирус бешенства (т. е. тот, который не был нейтрализован антителами) инфицирует клетки, и это можно визуализировать микроскопией. Расчет конечного титра проводили на основе процента инфицированных вирусом клеток, наблюдаемых на предметном стекле.

[0214] Иммуногенность *in vivo* множества функционализированных срРНК, кодирующих вирусный антиген, гликопротеин G вируса бешенства, измеряли оценкой антигенспецифических реакций Т-клеток селезенки с помощью ELISpot (фиг. 8A) и определением титров нейтрализующих антител против вируса бешенства из сыворотки (фиг. 8B) после двух иммунизаций. Все группы, иммунизированные срРНК, показали сильные реакции Т-клеток по сравнению с контрольными группами с физиологическим раствором (фиг. 8A), но между вакцинами на основе срРНК наблюдали различные реакции. Аналогичным образом, все группы, иммунизированные срРНК, показали титры защитных нейтрализующих антител с некоторыми вариациями между вакцинами на основе срРНК (фиг. 8B).

[0215] Несмотря на то, что были раскрыты конкретные альтернативы настоящего изобретения, следует понимать, что возможны различные модификации и комбинации, которые рассматриваются в рамках сущности и объема прилагаемой формулы изобретения. Поэтому не предполагается ограничивать точный реферат и раскрытие информации, представленные в настоящем изобретении.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения функциональной самореплицирующейся РНК (срРНК), включающий:

(а) получение одного или более вирусных одноцепочечных РНК-геномов с положительной смысловой цепью (+оцРНК) или нефункциональных срРНК, где по меньшей мере один из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК является нефункциональным;

(b) удаление одного или более сайтов терминации РНК-полимеразы или криптических сайтов терминации РНК-полимеразы из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК;

(с) получение множества фрагментов нуклеиновой кислоты, каждый из которых содержит нуклеотидную последовательность, полученную из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК; и

(d) сборку множества фрагментов нуклеиновой кислоты для получения функциональной собранной *de novo* срРНК.

2. Способ по п.1, где один или более сайтов терминации РНК-полимеразы или криптических сайтов терминации включают: (i) сайт терминации бактериофага T7 или криптический сайт терминации T7; и/или (ii) сайт терминации РНК-полимеразы SP6 или криптический сайт терминации РНК-полимеразы SP6.

3. Способ по любому из пп. 1-2, где множество фрагментов нуклеиновой кислоты имеют длину от приблизительно 60 нуклеотидов до приблизительно 5000 нуклеотидов.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где множество фрагментов нуклеиновой кислоты представляют собой одноцепочечные или двухцепочечные нуклеиновые кислоты.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где функциональная собранная *de novo* срРНК не содержит по меньшей мере участок последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где функциональная собранная *de novo* срРНК не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где функциональная собранная *de novo* срРНК не содержит значительный участок последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где функциональная собранная *de novo* срРНК не содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где по меньшей мере один из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК представляет собой вирус, относящийся к роду *Alphavirus* семейства *Togaviridae*.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где по меньшей мере один из одного или более вирусных +оцРНК геномов или срРНК представляет собой вид альфавируса,

относящегося к группе VEEV/EEEV, или группе SFV, или группе SINV.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где по меньшей мере один из вирусных +оцРНК геномов или срРНК представляет собой альфавирус, выбранный из вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вируса Эверглейдс (EVEV), вируса Мукамбо (MUCV), вируса Пиксуна (PIXV), вируса Миддлбург (MIDV), вируса Чикунгунья (CHIKV), вируса О'Ньонг-Ньонг (ONNV), вируса Росс-Ривер (RRV), вируса Барма-Форест (BF), вируса Гета (GET), вируса Сагияма (SAGV), вируса Бебару (BEBV), вируса Маяро (MAYV), вируса Уна (UNAV), вируса Синдбис (SINV), вируса Аура (AURAV), вируса Ватароа (WHAIV), вируса Бабанки (BABV), вируса Кызылагач (KYZV), вируса западного энцефалита лошадей (WEEV), вируса Хайленд J (HJV), вируса Форт-Морган (FMV), вируса Ндumu (NDUV), вируса Мадариага (MADV) и вируса Багги-Крик.

12. Способ по любому из пп. 1-10, где по меньшей мере один из вирусных +оцРНК геномов или срРНК представляет собой вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус Синдбис (SINV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), вирус Мадариага (MADV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV) или вирус леса Семлики (SFV).

13. Способ по любому из пп. 1-12, где способ дополнительно включает вставку последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный ген, в собранную *de novo* срРНК.

14. Способ по п.13, где гетерологичный ген функционально связан с субгеномным (sg) промотором.

15. Способ по п.14, где промотор sg является субгеномным промотором 26S.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где способ дополнительно включает удаление одного или более сайтов рестрикции из одного или более +оцРНК геномов или срРНК.

17. Способ по п.16, где по меньшей мере один из удаленных сайтов рестрикции распознается рестриктазой, подходящей для линеаризации собранной *de novo* срРНК или для вставки гетерологичного гена в собранную *de novo* срРНК.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где генерированная функциональная собранная срРНК включает 3'-полиаденилатный тракт (поли(A) хвост).

19. Способ по п.18, где 3'-поли(A) хвост включает по меньшей мере 11 адениннуклеотидов.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где способ дополнительно включает замену одной или более нетранслируемых областей (UTR) в собранной *de novo* срРНК на UTR из другого вида, подвида или штамма вирусного +оцРНК генома.

21. Способ по п.20, где способ включает замену 3'-UTR.

22. Способ по п.20, где способ включает замену 5'-UTR.

23. Способ по п.20, где способ включает замену 3'-UTR и 5'-UTR.

24. Способ по любому из пп. 20-23, где способ дополнительно включает выбор UTR из вирулентного вида или авирулентного вида +оцРНК вируса.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где способ дополнительно включает замену неструктурного белка (nsP) или его участка в собранной *de novo* срРНК на гетерологичный nsP.

26. Способ по п.25, где гетерологичный nsP или его участок происходит из другого вида, подвида или штамма +оцРНК вируса.

27. Способ по п.25, где nsP или его участок происходит из другого штамма того же вида +оцРНК вируса.

28. Способ по любому из пп. 25-27, где nsP или его участок представляет собой nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 или участок любого из них.

29. Способ по любому из пп. 25-28, где способ дополнительно включает выбор nsP из вирулентного вида или авирулентного вида +оцРНК вируса.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где способ дополнительно включает оценку функциональности собранной *de novo* срРНК.

31. Способ по п.30, где оценка функциональности осуществляется *in vitro*, *in vivo* и/или *ex vivo*.

32. Способ по п.30 или 31, где оценка функциональности включает анализ собранной *de novo* срРНК на способность к саморепликации *in vivo* и/или *ex vivo*.

33. Способ по любому из пп. 30-32, где оценка функциональности включает анализ, выбранный из группы, состоящей из: детекции репликации РНК, детекции экспрессии вирусного белка, детекции цитопатического эффекта (CPE) и детекции экспрессии гетерологичного гена.

34. Способ по любому из пп. 30-33, где оценка функциональности собранной *de novo* срРНК не включает вставку последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный ген, в собранную *de novo* срРНК.

35. Функциональная самореплицирующаяся РНК (срРНК), полученная способом по любому из пп. 1-34, где функциональная срРНК включает гетерологичную UTR и/или гетерологичный nsP.

36. Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая срРНК по п.35.

37. Вектор, включающий конструкцию нуклеиновой кислоты по п.36.

38. Рекомбинантная клетка, включающая:

а) функциональную срРНК по п.35;

б) конструкцию нуклеиновой кислоты по п.36; и/или

с) вектор по п.37.

39. Рекомбинантная клетка по п.38, где рекомбинантная клетка является эукариотической клеткой.

40. Рекомбинантная клетка по п.39, где рекомбинантная клетка является клеткой животного.

41. Рекомбинантная клетка по п.40, где клетка животного является клеткой позвоночного животного или клеткой беспозвоночного животного.

42. Рекомбинантная клетка по п.40, где животная клетка является клеткой

насекомого.

43. Рекомбинантная клетка по п.42, где клетка насекомого является клеткой комара.

44. Рекомбинантная клетка по п.38, где рекомбинантная клетка является клеткой млекопитающего.

45. Рекомбинантная клетка по п.44, где рекомбинантная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки почки обезьяны CV1, трансформированной SV40 (COS-7), клетки эмбриональной почки человека (например, клетки НЕК 293 или НЕК 293), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки Сертоли мышцы (например, клетки ТМ4), клетки почки обезьяны (CV1), клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), клетки почки собаки (например, MDCK), клетки печени крысы-буйвола (например, BRL 3A), клетки легкого человека (например, W138), клетки печени человека (например, Hep G2), клетки опухоли молочной железы мышцы (ММТ 060562), клетки TRI, клетки FS4, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), клетки почки африканской зеленой мартышки (например, клетки Vero), клетки A549 человека, клетки шейки матки человека, клетки CHME5 человека, клетки PER.C6 человека, клетки миеломы NS0 мышцы, клетки эпидермоида 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 мышцы, клетки L929 мышцы, клетки соединительной ткани мышцы, мышечной клетки мышцы и клетки почки кролика.

46. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- a) функциональную срРНК по п.35; или
- b) конструкцию нуклеиновой кислоты по п.36;
- c) вектор по п.37; и/или
- c) рекомбинантную клетку по любому из пп. 38-45.

47. Фармацевтическая композиция по п.46, включающая функциональную срРНК по п.30 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

48. Фармацевтическая композиция по п.46, включающая конструкцию нуклеиновой кислоты по п.31 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

49. Фармацевтическая композиция по п.46, включающая вектор по п.32 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

50. Фармацевтическая композиция по п.46, включающая рекомбинантную клетку по любому из пп. 38-45 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

51. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 46-50, где композиция составлена в липосоме, липидной наночастице (LNP), полимерной наночастице, полиплексе, вирусной репликонной частице (VRP), микросфере, иммуностимулирующем комплексе (ISCOM), конъюгате биоактивного лиганда или комбинации любого из них.

52. Фармацевтическая композиция по любому из пп.46-51, где композиция представляет собой иммуногенную композицию.

53. Фармацевтическая композиция по п.52, где иммуногенная композиция составлена в качестве вакцины.

54. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 46-51, где композиция является по существу неиммуногенной для субъекта.

55. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 46-52, где фармацевтическая композиция составлена в качестве адьюванта.

56. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 46-55, где фармацевтическая композиция составлена для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутрибрюшинного введения, внутримышечного введения, интратрахеального введения, интранодального введения, интратуморального введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения, внутриглазного, ректального и перорального введения.

57. Набор для индукции фармакодинамического эффекта, продуцирующий представляющий интерес полипептид, для профилактики и/или лечения патологического состояния, включающий:

- a) функциональную срРНК по п.35;
- b) конструкцию нуклеиновой кислоты по п.36;
- c) вектор по п.37;
- d) рекомбинантную клетку по любому из пп. 38-45; и/или
- e) фармацевтическую композицию по любому из пп. 46-56.

58. Трансгенное животное, включающее:

- a) функциональную срРНК по п.5;
- b) конструкцию нуклеиновой кислоты по п.36;
- c) вектор по п.37; и/или
- d) рекомбинантную клетку по любому из пп. 38-45.

59. Трансгенное животное по п.58, где животное является позвоночным или беспозвоночным животным.

60. Трансгенное животное по п.58, где животное является насекомым.

61. Трансгенное животное по п.58, где животное является млекопитающим.

62. Трансгенное животное по п.61, где млекопитающее является млекопитающим, отличным от человека.

63. Способ получения представляющего интерес полипептида, включающий: (i) разведение трансгенного животного по любому из пп. 58-62 или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты по п.36, в условиях, в которых рекомбинантная клетка продуцирует полипептид, кодируемый срРНК.

64. Способ индукции фармакодинамического эффекта у субъекта, где способ включает введение субъекту композиции, содержащей:

- (a) функциональную срРНК по п.35;
- (b) конструкцию нуклеиновой кислоты по п.36;

- (c) рекомбинантную клетку по любому из пп. 38-45; и/или
- (d) фармацевтическую композицию по любому из пп. 46-56.

65. Способ по п.64, где фармакодинамический эффект включает индукцию иммунного ответа у субъекта.

66. Способ профилактики или лечения патологического состояния у субъекта, где способ включает введение субъекту композиции, содержащей:

- (a) функциональную срРНК по п.350;
- (b) конструкцию нуклеиновой кислоты по п.36;
- (c) рекомбинантную клетку по любому из пп. 38-45; и/или
- (d) фармацевтическую композицию по любому из пп. 46-56.

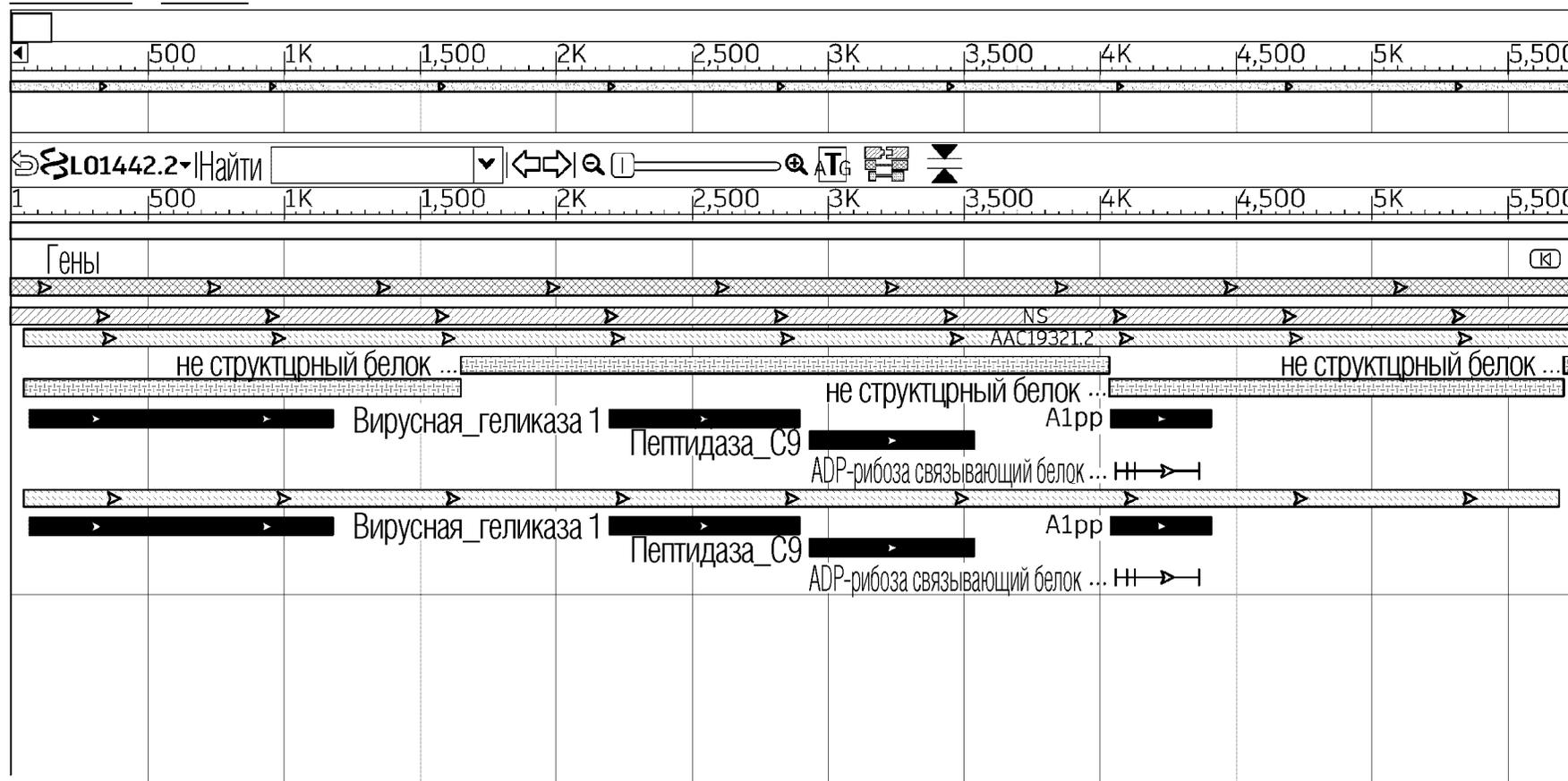
# ФИГ. 1А

Идентификация последовательностей

Вирус венесуэльского энцефалита лошадей, полный геном

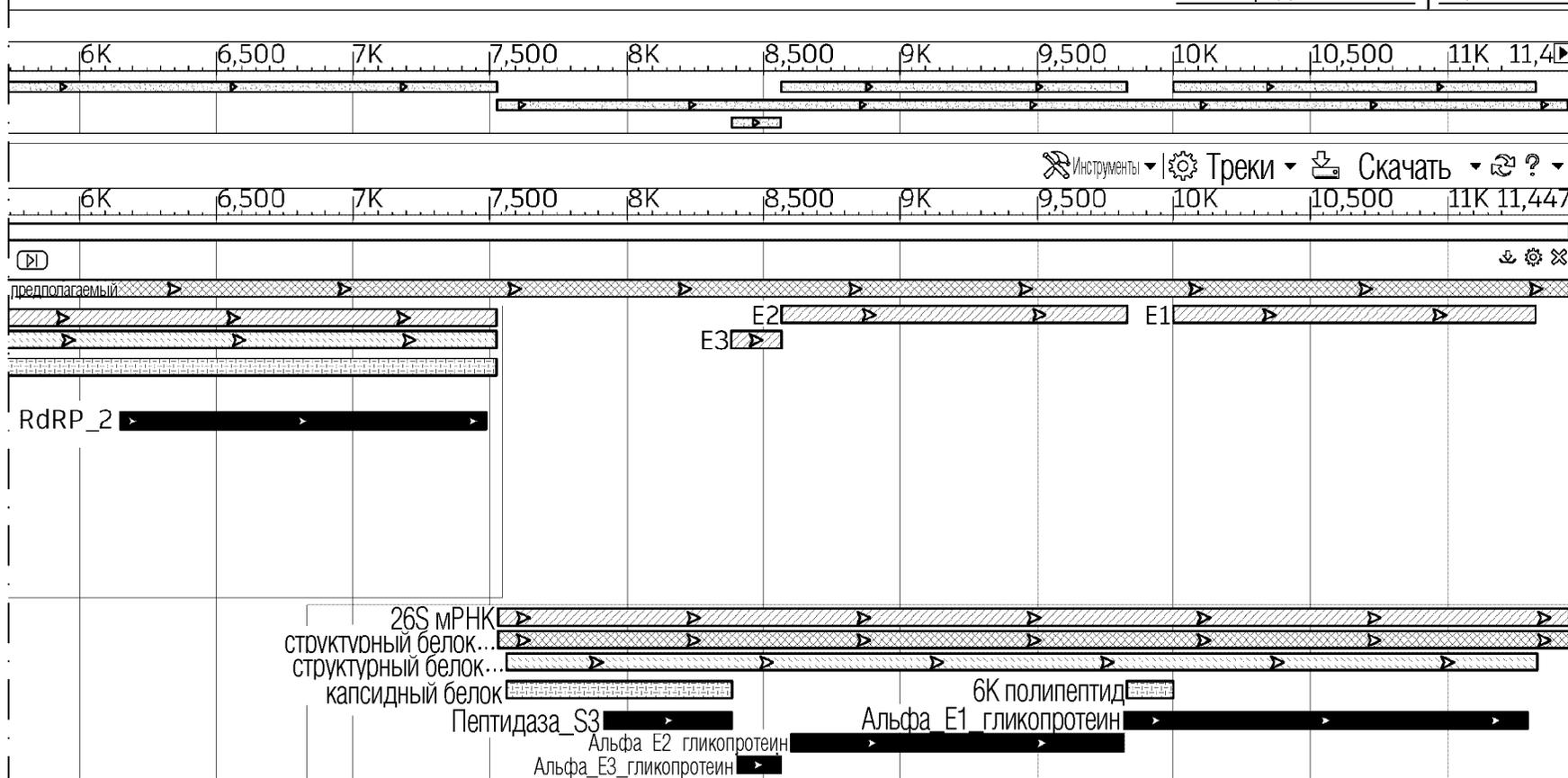
GenBank: L01442.2

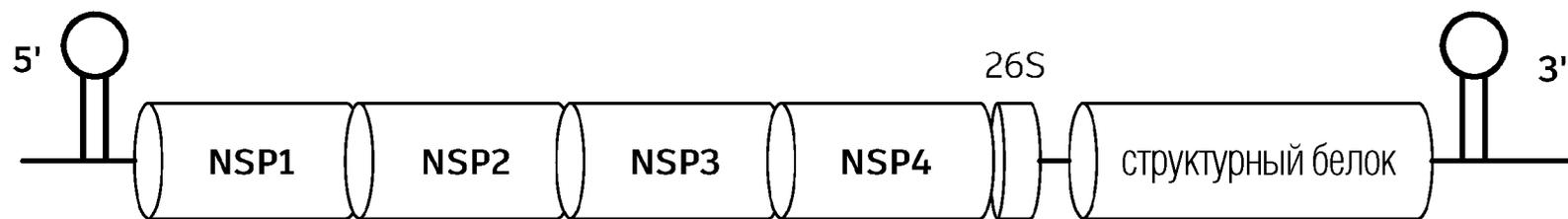
GenBank FASTA



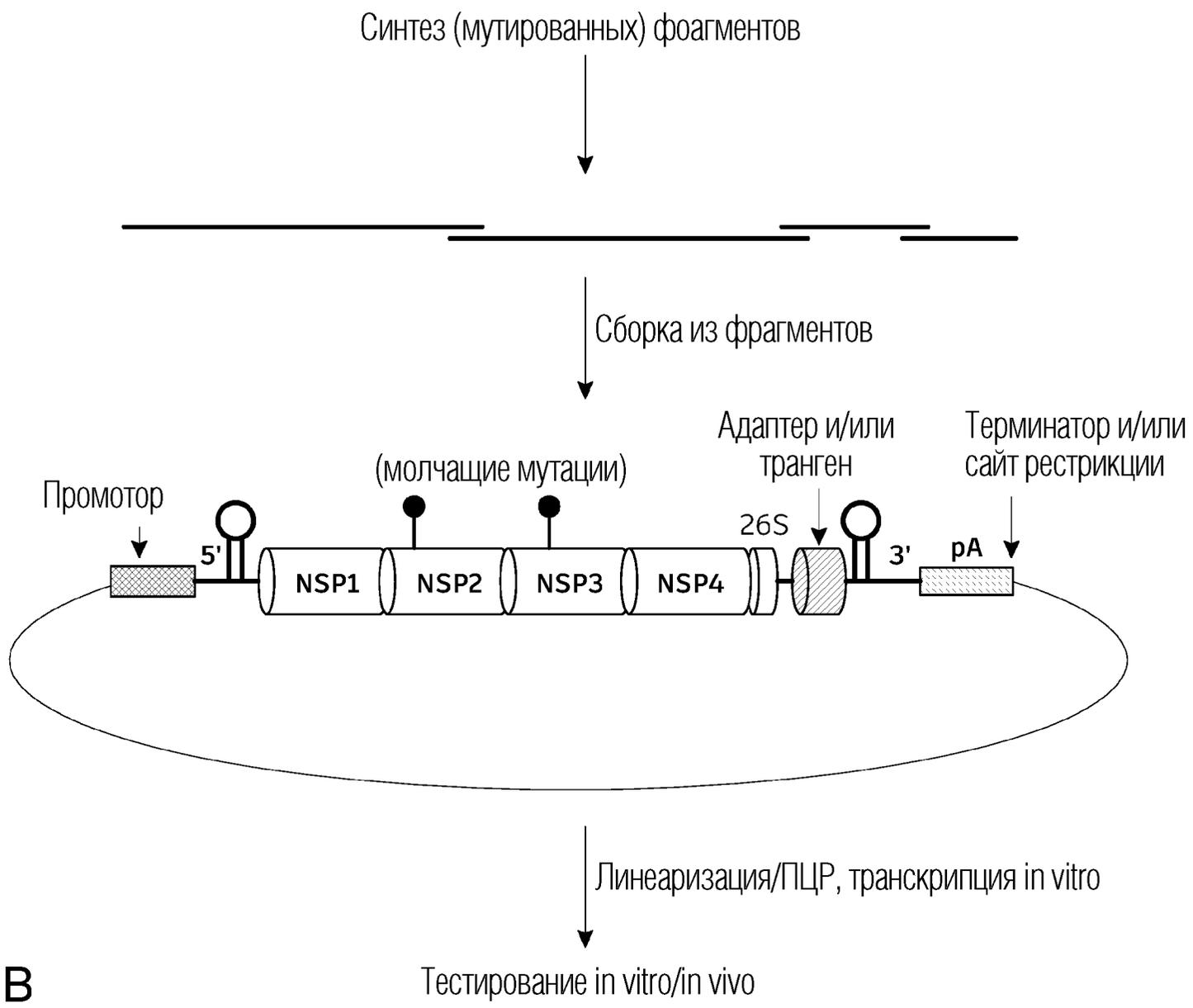
# ФИГ. 1А (продолжение)

[Связать с этим представлением](#) | [Обратная связь](#)





ФИГ. 1А (продолжение)

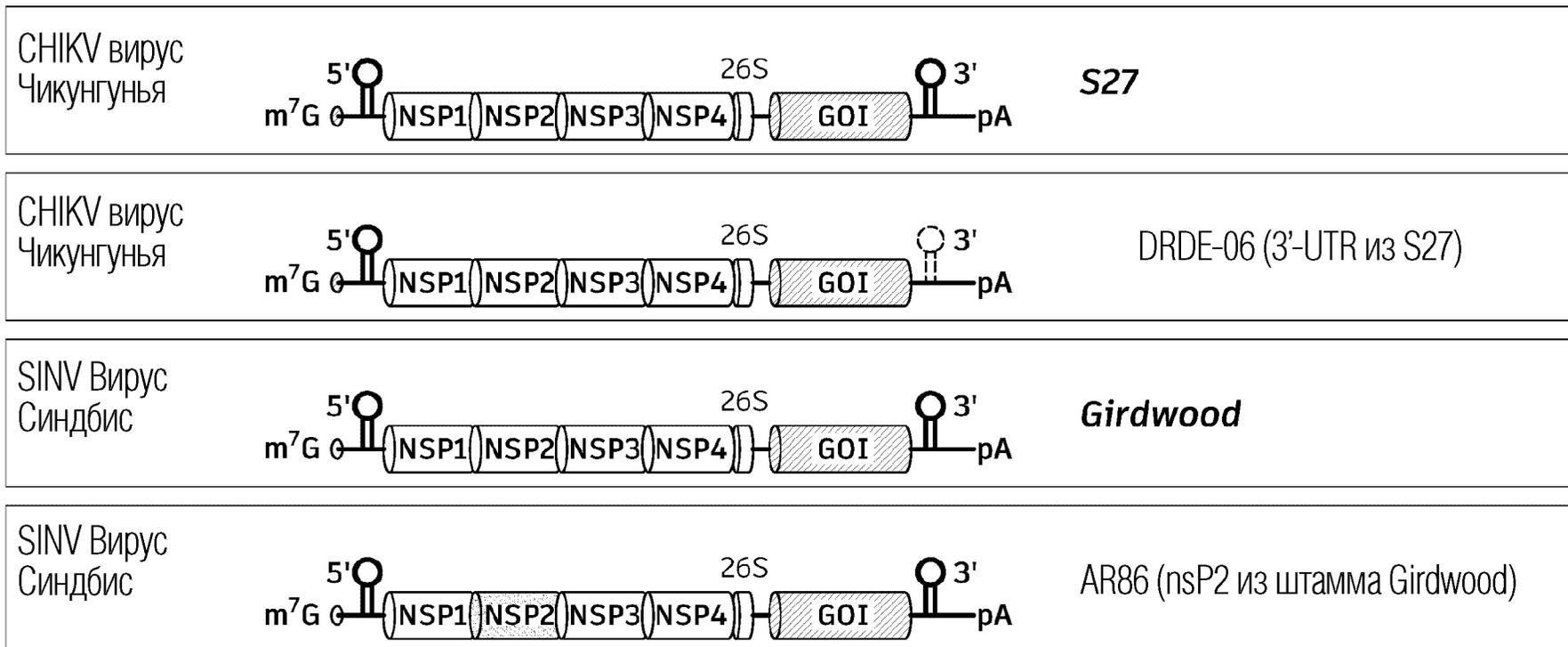


ФИГ. 1В

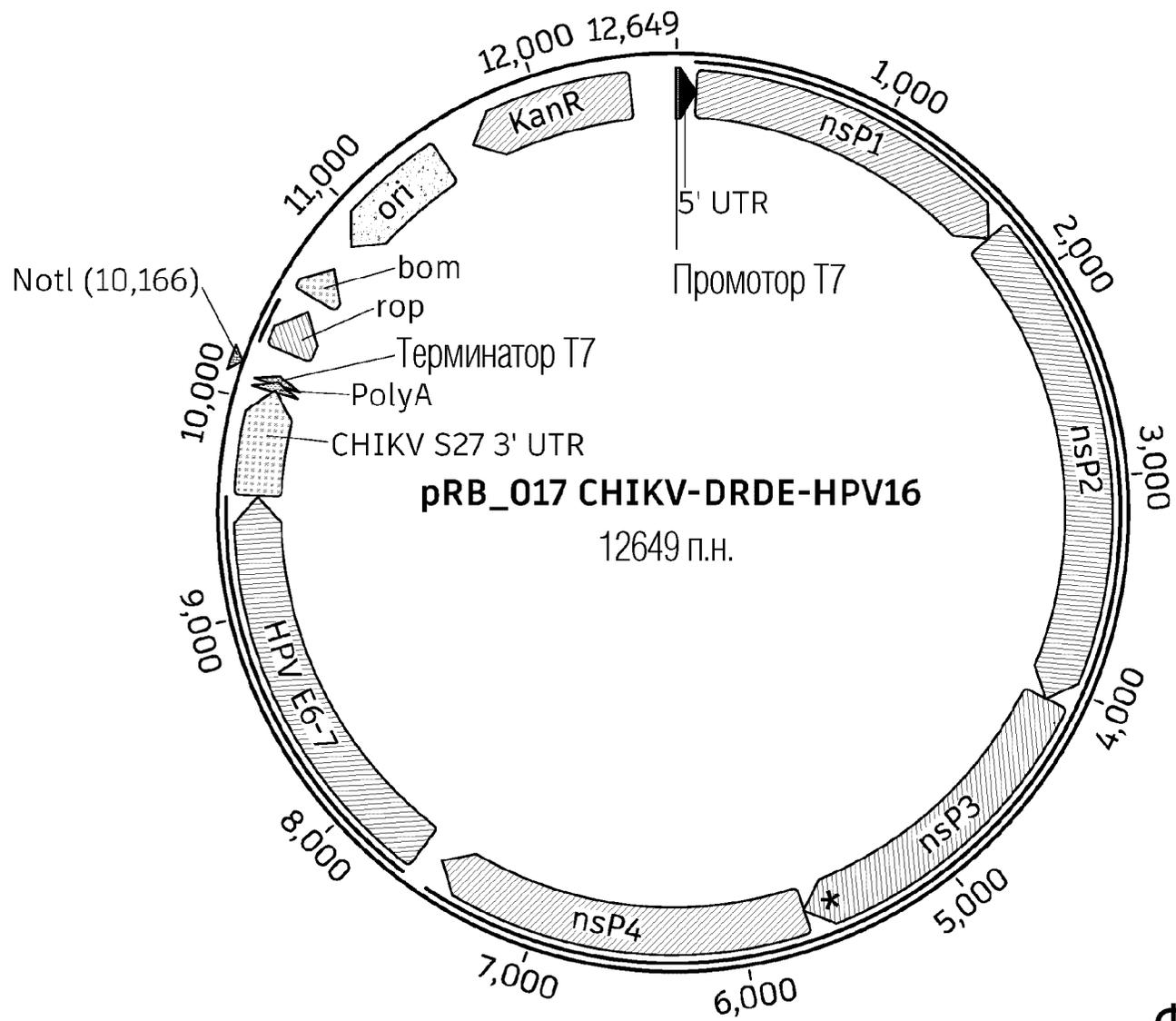


Схема

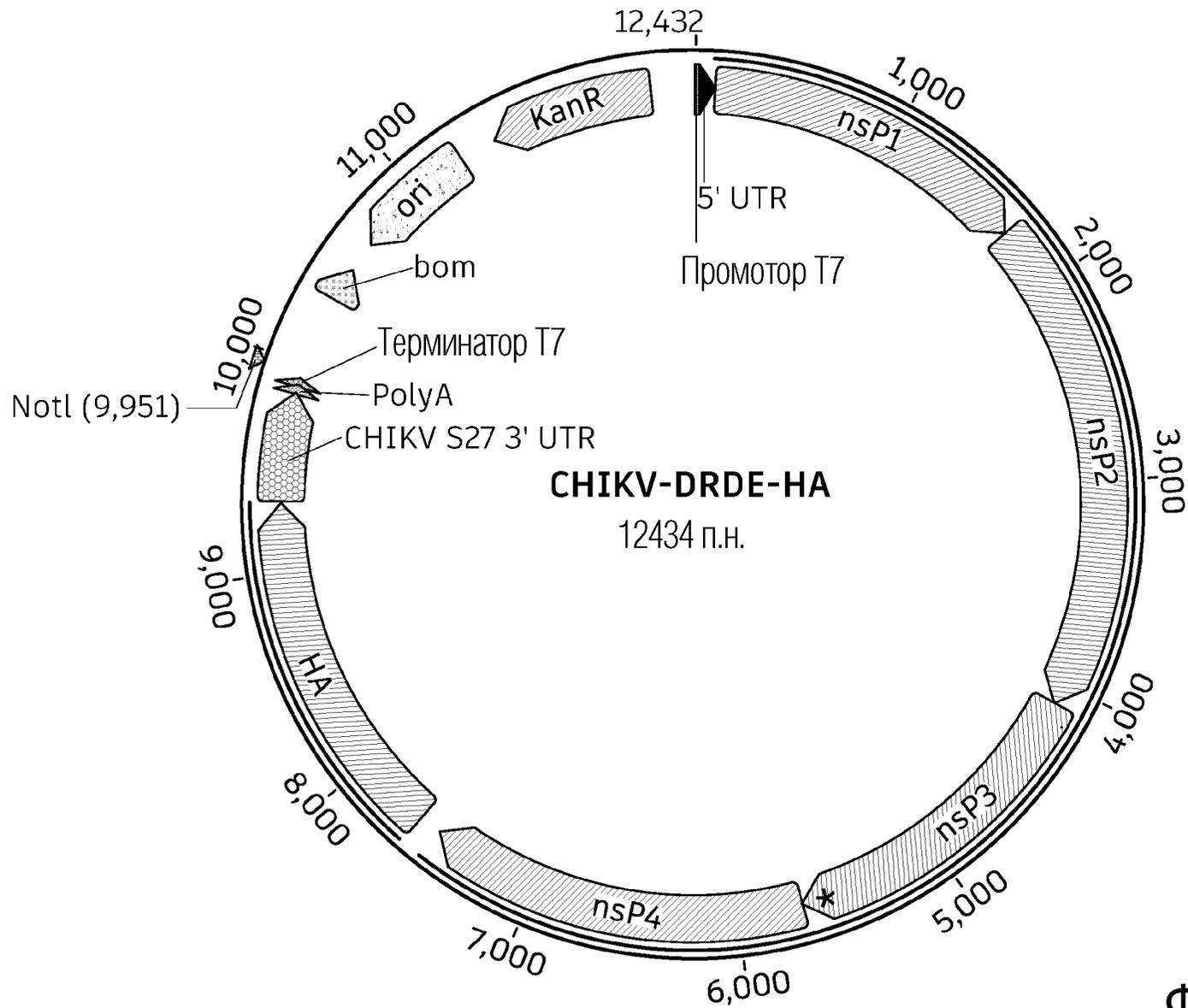
Штамм



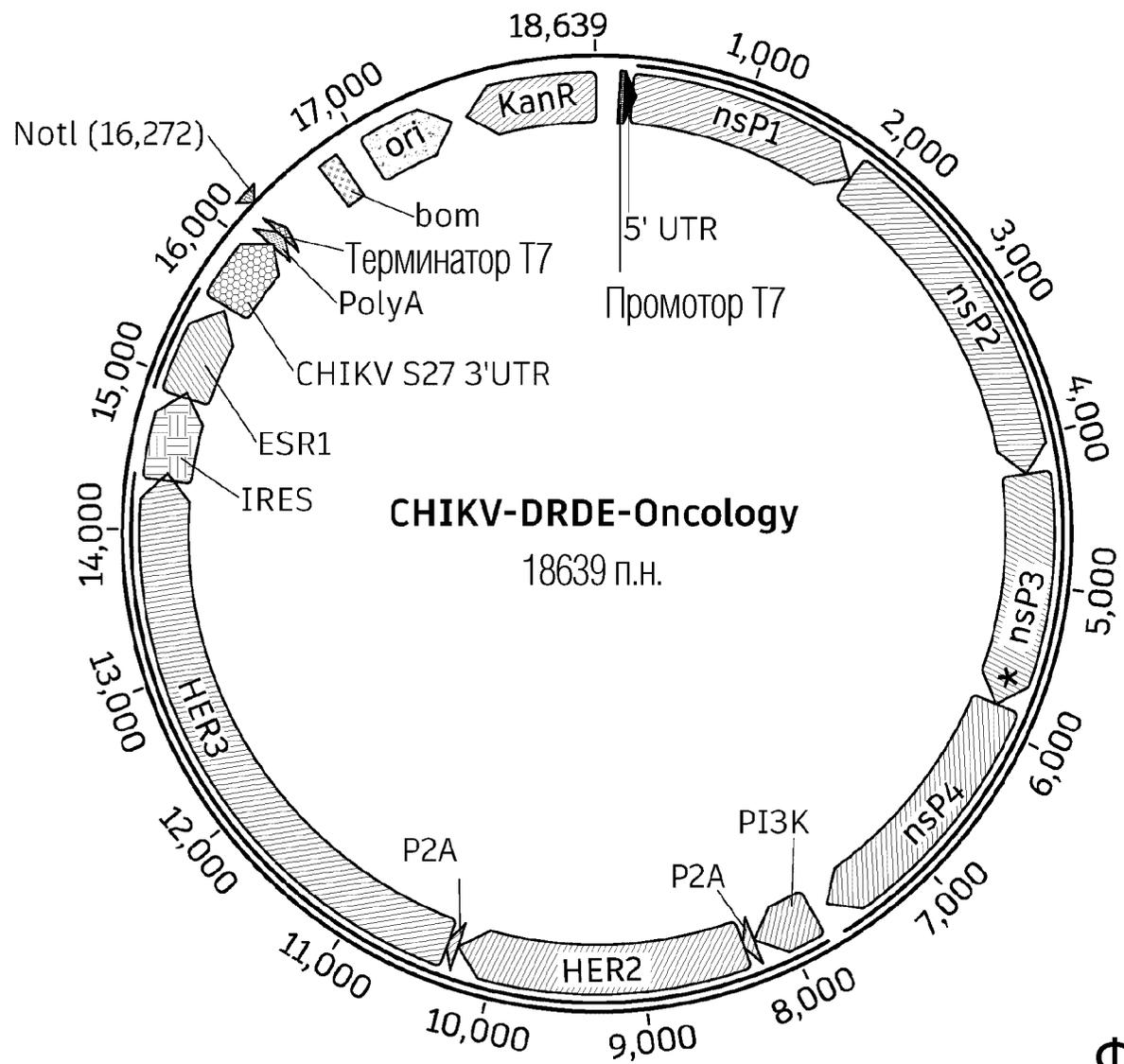
ФИГ. 3



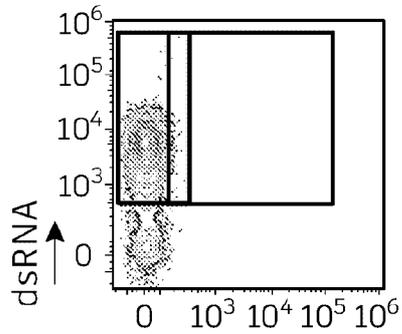
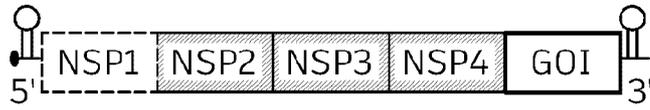
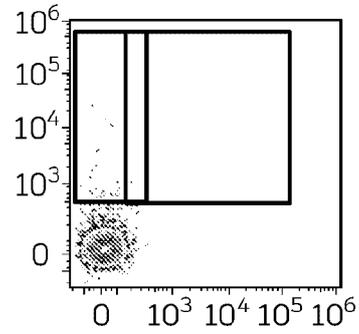
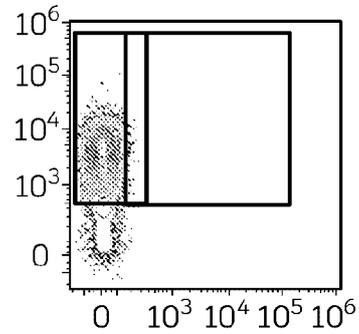
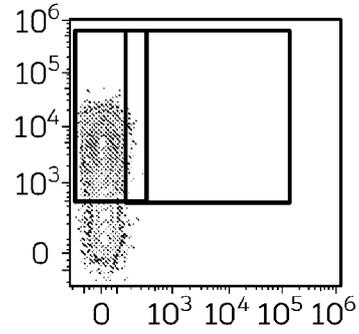
ФИГ. 4



ФИГ. 5



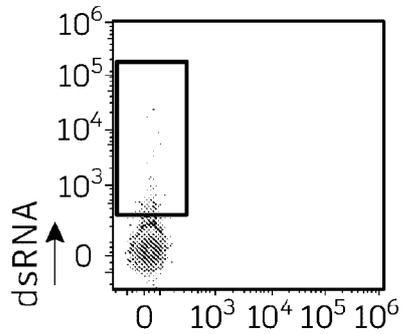
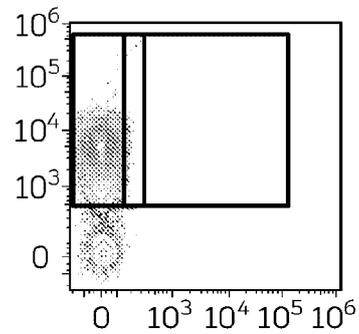
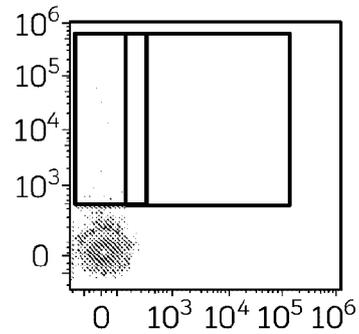
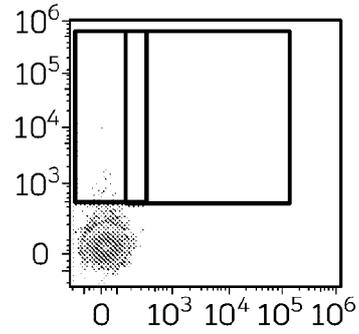
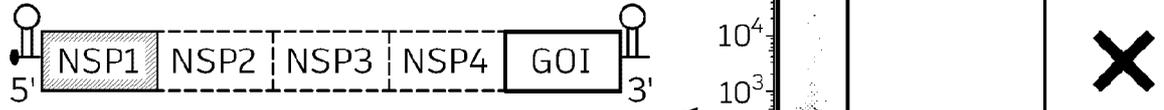
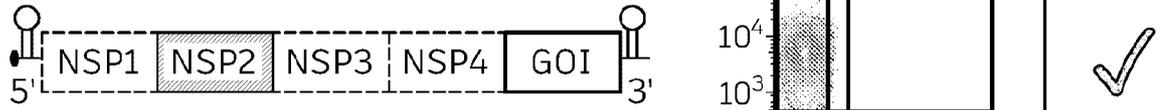
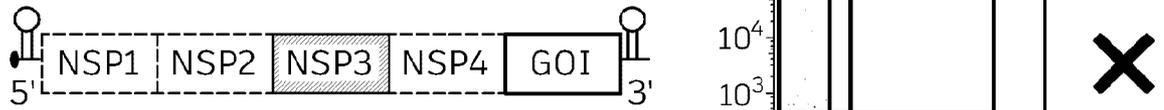
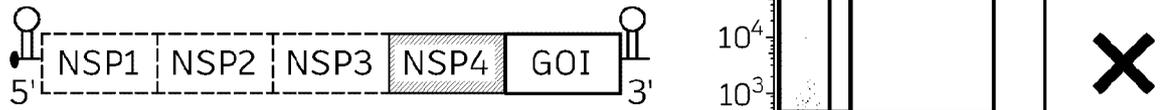
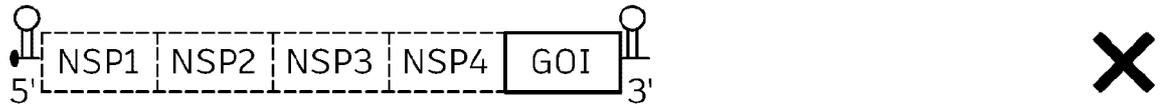
ФИГ. 6



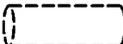
 Girdwood

 AR86

ФИГ. 7

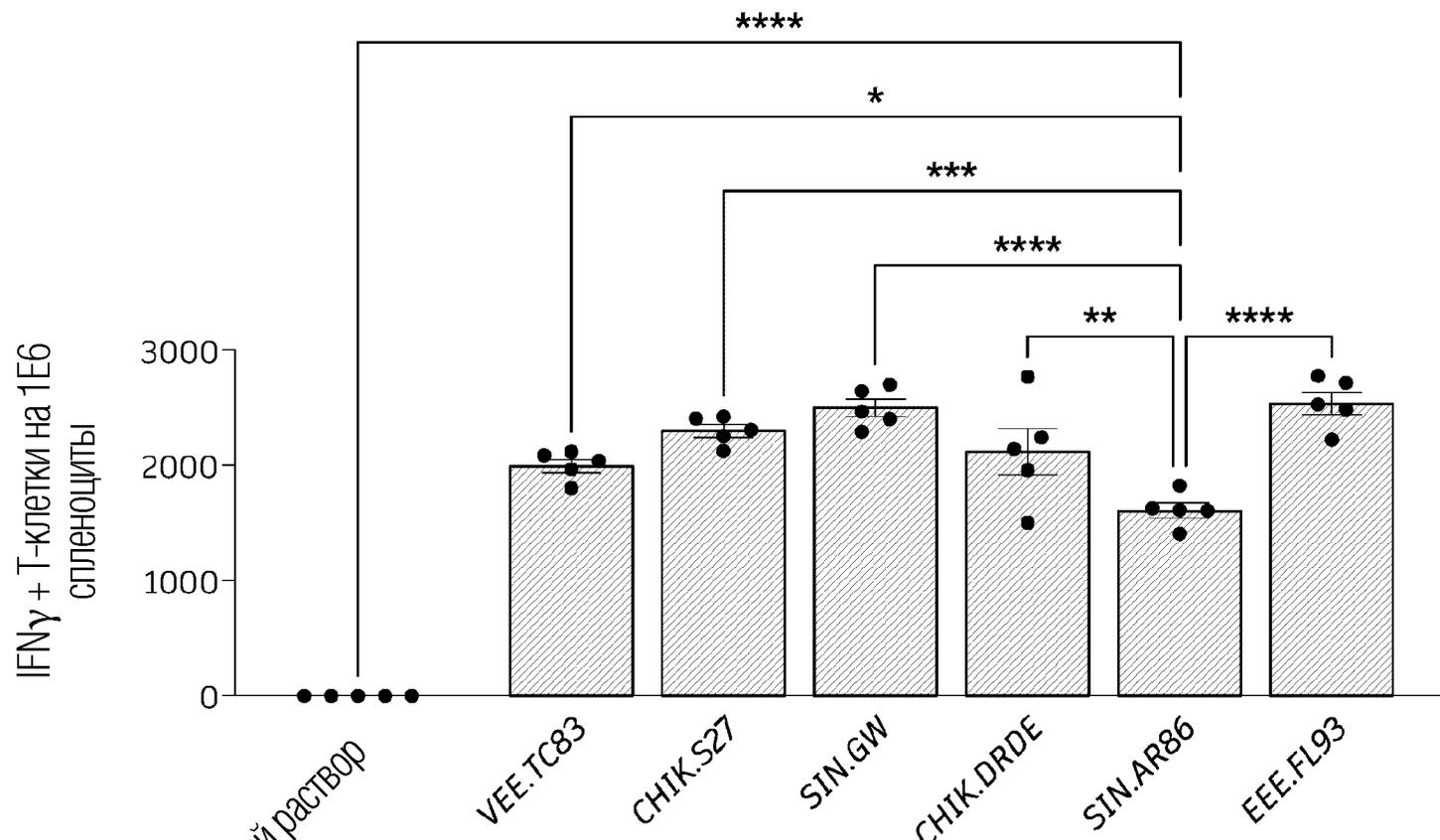


 Girdwood

 AR86

ФИГ. 7 (продолжение)

# Иммуногенность различных срРНК-векторов к вирусным антигенам



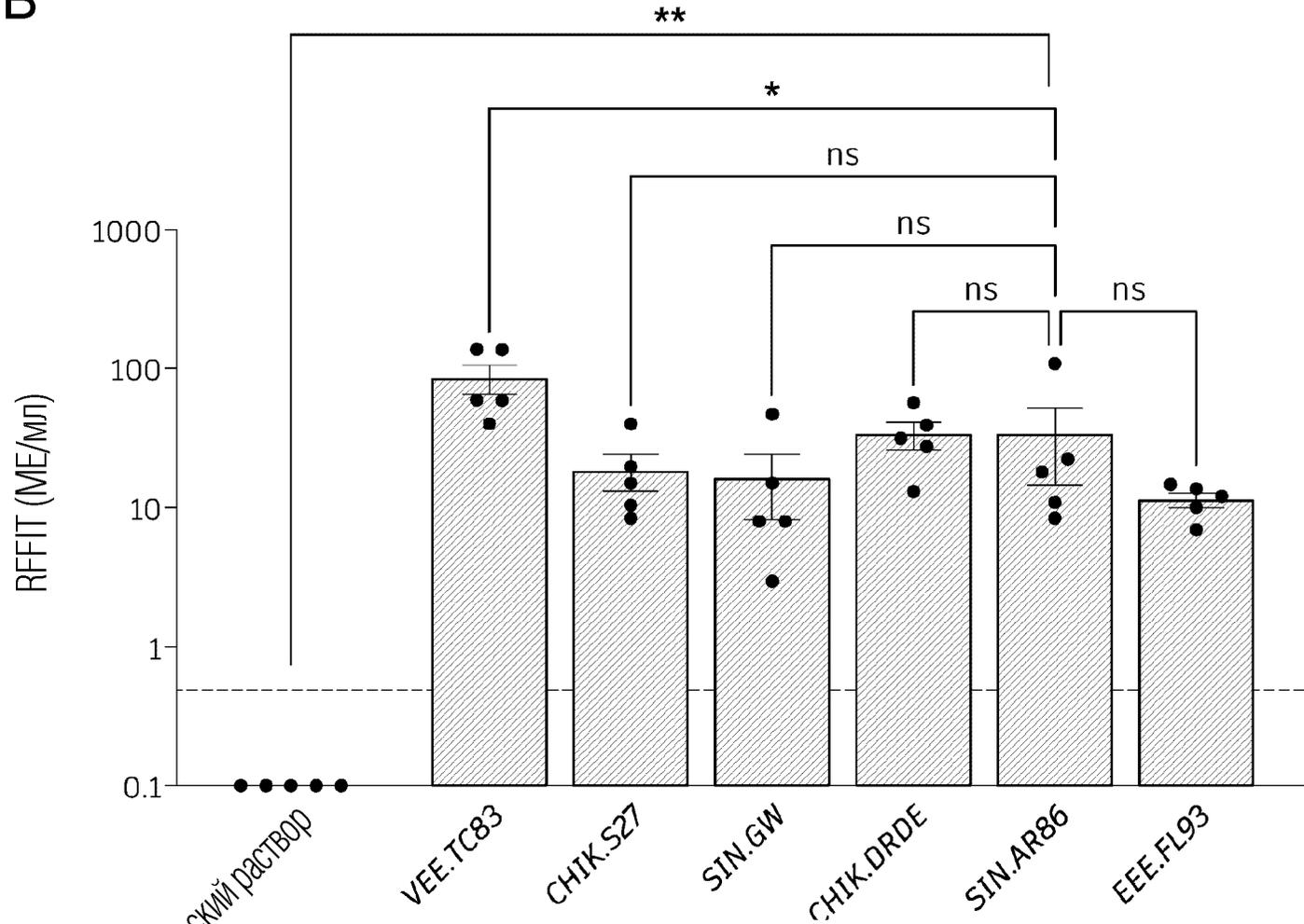
Физиологический раствор

Пул пептидной стимуляции: гликопротеин G вируса бешенства  
Дисплей: символы представляют отдельных животных, столбцы представляют среднее значение с SEM  
Статистика: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA)

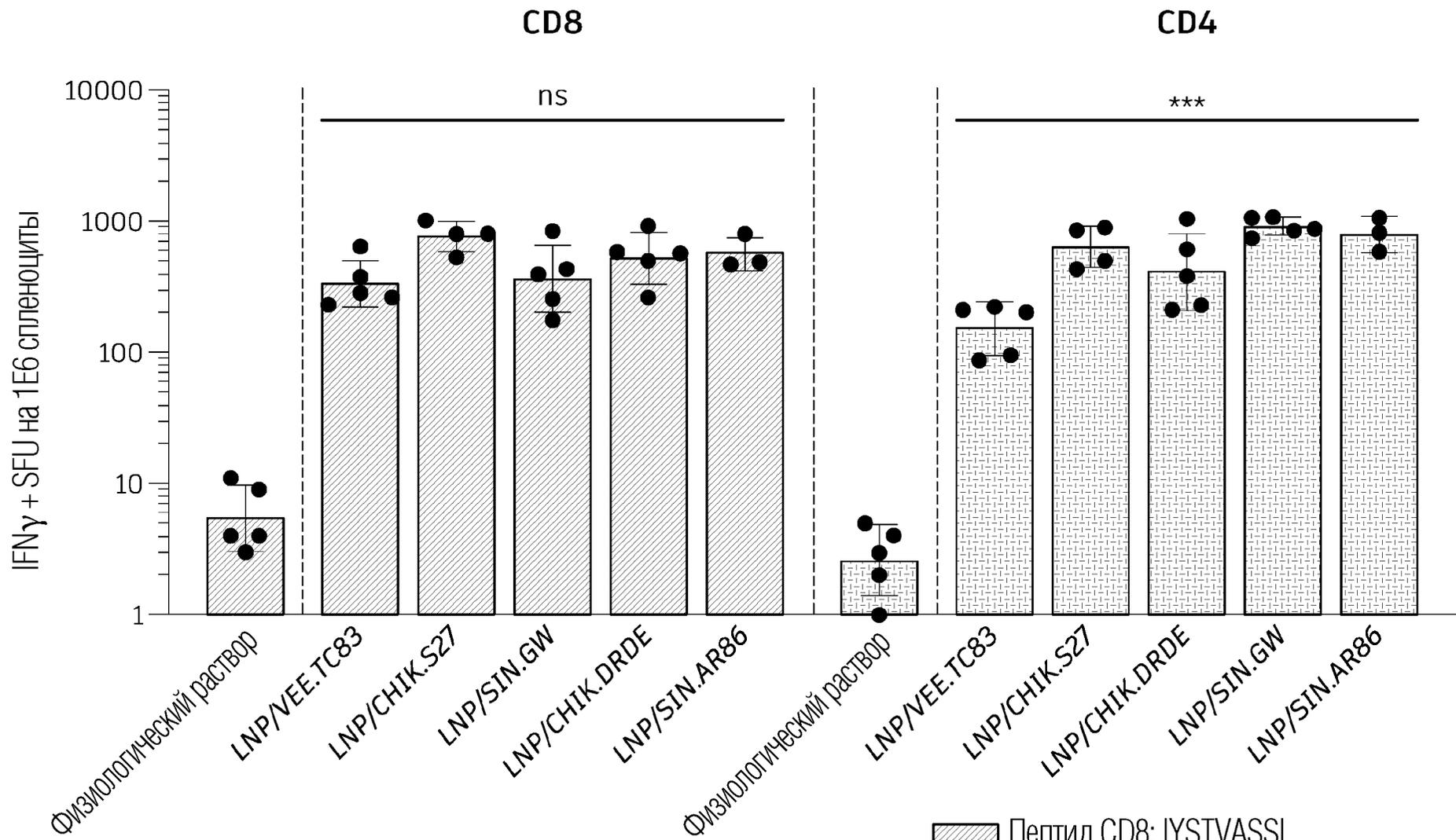
ФИГ. 8А

ФИГ. 8В

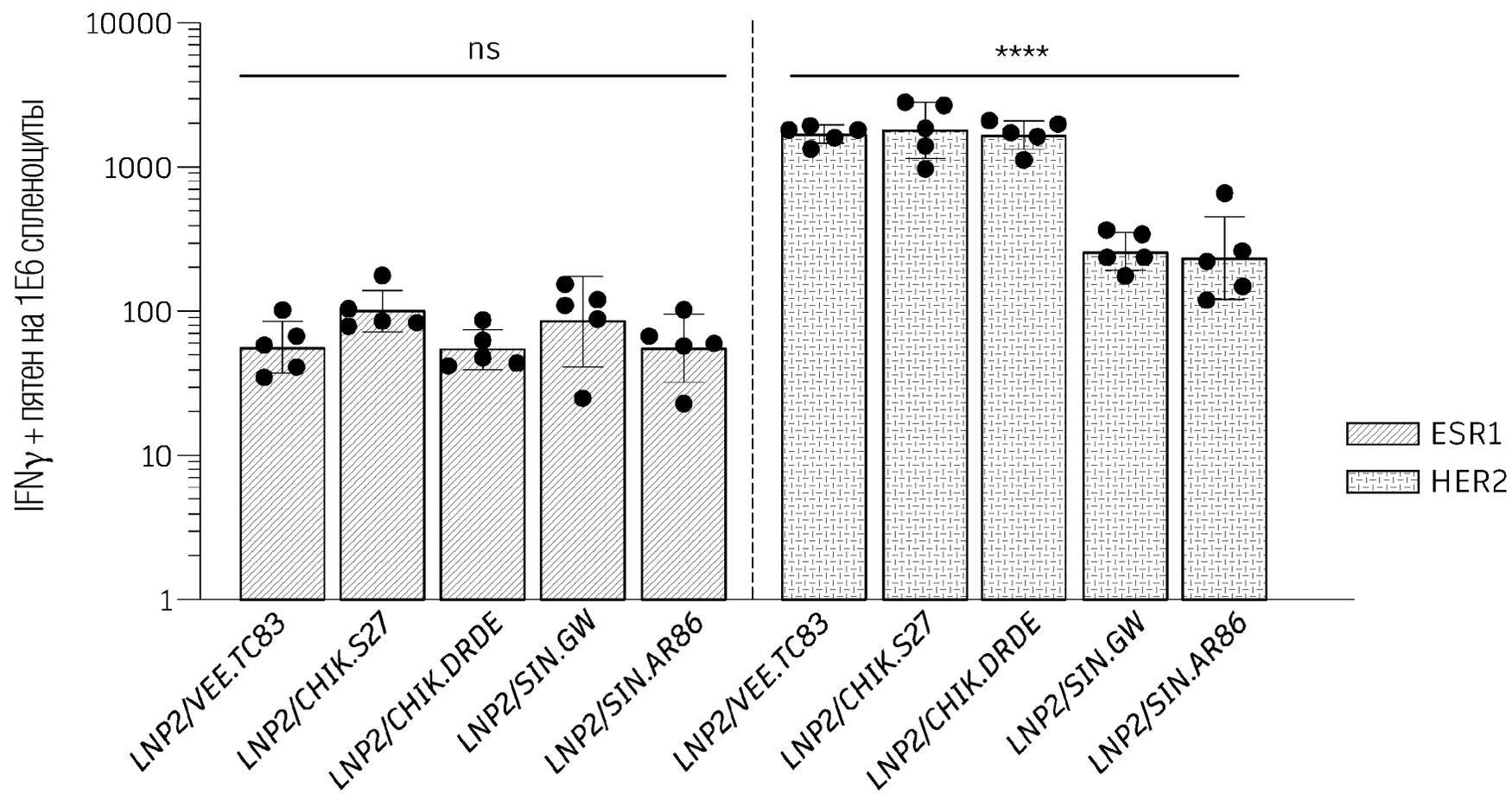
Иммуногенность различных срРНК-векторов к вирусным антигенам



Пунктирная линия представляет защитный титр 0,5 ME/мл  
Дисплей: символы представляют отдельных животных, столбцы представляют среднее геометрическое значение со средним геометрическим SD  
Статистика: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для всех, за исключением группы с физиологическим раствором (тест Манн-Уитни)



ФИГ. 9



15/15

ФИГ. 10