(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190907 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.25

(22) Дата подачи заявки
2019.10.08

(51) Int. Cl. ***C07K 14/005*** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) РЕПЛИКОНЫ НА ОСНОВЕ АЛЬФАВИРУСА ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

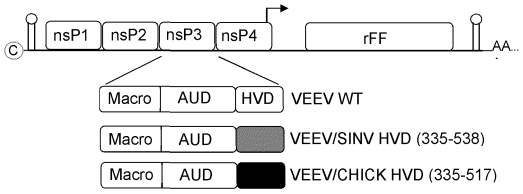
(31) **62/742,868**
(32) **2018.10.08**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/055125**
(87) **WO 2020/076775 2020.04.16**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дехарт Джейсон Л., Ван Натаниэль Стивен, Алиахмад Париназ, Мияке-Стоунер Сигеки, Камруд Курт Ивер (US)

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

(57) Изобретение относится к РНК репликонам, которые могут использоваться для введения гетерологичного белка или пептида млекопитающему и вызывающие сниженный иммунный ответ или не вызывающие иммунный ответ у млекопитающего. РНК репликоны имеют последовательности РНК, кодирующие гетерологичный белок или пептид, неструктурные белки nsP1, nsP2 и nsP4 альфавируса Нового Света; и макродомен, центральный домен и гипервариабельный домен nsP3 альфавируса. Кодируемый гипервариабельный домен может иметь аминокислотную последовательность, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света; или может иметь аминокислотную последовательность, происходящую из части гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, при этом другая часть происходит из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света.



202190907 A1

202190907 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567968EA/55

РЕПЛИКОНЫ НА ОСНОВЕ АЛЬФАВИРУСА ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США 62/742,868, поданной 8 октября 2018 года, описание которой полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

Ссылка на список последовательностей, представленный в электронном виде

[0002] Эта заявка содержит список последовательностей, представленный в электронном виде по сети EFS в виде списка последовательностей в формате ASCII в файле под названием "689405.107WO_SL", созданном 7 октября 2019 года и имеющим размер 147 КБ. Список последовательностей, представленный по сети EFS, является частью описания и полностью включен в настоящее описание путем ссылки.

Уровень техники

[0003] Самоамплифицирующиеся РНК на основе альфавируса (репликоны) использовались в течение многих десятилетий в качестве универсальной платформы для вакцин. Двумя особенностями, которые делают репликоны подходящими для такой платформы, являются: 1) высокая и длительная экспрессия белка и 2) самоадъювантная природа такой платформы, которая помогает стимулировать надежный клеточный, гуморальный и мукозальный иммунитет. Тогда как такие свойства заставляют репликон выделяться в качестве вакцинных платформ, они могут препятствовать его эффективности в других областях, особенно в качестве платформ экспрессии биотерапевтических средств in vivo.

[0004] Использование биотерапевтических средств в медицине сейчас растет. Однако эти рекомбинантно полученные белки часто распознаются как чужеродные и вызывают иммунный ответ и индукцию противолекарственных антител (ADA), что снижает терапевтическую эффективность белка. В то время как факторы, способствующие развитию ответа противолекарственных антител (ADA), могут варьировать, воспалительное окружение, в которое доставляют биологическое или биотерапевтическое средство, может стимулировать и/или усиливать ответ ADA. Таким образом, доставка биологического средства из репликона, который обычно является самоадъювантным и воспалительным, сопряжена с риском стимуляции ответа ADA и снижения клинической эффективности кодируемого биотерапевтического средства. Способность подавлять иммунный ответ против гетерологичного белка, экспрессируемого с репликона, может снижать риск генерации ADA и улучшать применимость репликонов для экспрессии биотерапевтических средств in vivo.

[0005] Таким образом, было бы желательно иметь композиции и способы, которые позволят вводить биотерапевтические молекулы человеку или животным со сниженным или устраненным риском провоцирования нежелательного иммунного ответа.

Сущность изобретения

[0006] Изобретение относится к РНК репликонам, пригодным для введения гетерологичной молекулы человеку или животному и снижения или устранения иммунного ответа у человека или животного против гетерологичной молекулы. РНК репликоны содержат последовательности РНК (например, ген, представляющий интерес (GOI)), кодирующие гетерологичную молекулу (например, белок или пептид), и последовательности РНК, которые кодируют неструктурные белки альфавируса Нового Света nsP1, nsP2 и nsP4; а также макродомен белка nsP3, центральный домен и гипервариабельный домен (HVD) альфавируса. Кодируемый гипервариабельный домен может иметь аминокислотную последовательность, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света или может иметь аминокислотную последовательность, полученную из части гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, и другую часть, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, т.е. химерного гипервариабельного домена nsP3. Было обнаружено, что в случае модификации репликона на основе альфавируса Нового Света, как описано в настоящем документе, иммунный ответ, вызванный кодируемым гетерологичным белком или пептидом, уменьшается или устраняется.

[0007] РНК репликоны используются для введения биотерапевтических молекул, таких как белки и пептиды, где репликоны согласно настоящему изобретению вводят человеку или животному, при этом биотерапевтическое средство кодируется репликоном, и кодируемое биотерапевтическое средство (например, гетерологичный белок или пептид) экспрессируется в организме человека или животного.

[0008] В первом аспекте изобретение относится к РНК репликону, содержащему последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид; 5' и 3'-нетранслируемые области альфавируса; последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, полученные из неструктурных белков nsP1, nsP2, и nsP4 альфавируса Нового Света; и последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из макродомена nsP3 альфавируса; последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из центрального домена nsP3 альфавируса; и последовательность РНК, кодирующую гипервариабельный домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, или аминокислотную последовательность, включающую часть, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, и часть, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света.

[0009] В некоторых вариантах осуществления макродомен nsP3 альфавируса и центральный домен nsP3 альфавируса получены из альфавируса Нового Света, а в других вариантах осуществления макродомен nsP3 альфавируса и центральный домен nsP3 альфавируса получен из альфавируса Старого Света. В различных вариантах осуществления альфавирус Старого Света выбран из группы, состоящей из: CHIKV, SINV

и SFV. Альфавирусом Нового света может быть вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) или вирус западного энцефалита лошадей (WEEV) или вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV). В различных вариантах осуществления альфавирус Старого Света может быть любым из вируса Синдбис (SINV), вируса Чикунгунья (CHIKV), вируса леса Семлики (SFV), вируса Росс-Ривер (RRV), вируса Сагияма (SAGV), вируса Гета (GETV), вируса Мидделбург (MIDV), вируса Бебару (BEBV), вируса О'Ньонг-ньонг (ONNV), Ндуму (NDUV) и вирус леса Барма (BFV).

[0010] В некоторых вариантах осуществления часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает мотив, выбранный из группы, состоящей из: FGDF (SEQ ID NO: 18) и FGSF (SEQ ID NO: 19). Часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, может содержать повтор, выбранный из группы, состоящей из: повтора FGDF/FGDF (SEQ ID NO: 20), повтора FGSF/FGSF (SEQ ID NO: 21), повтора FGDF/FGSF (SEQ ID NO: 22) и повтора FGSF/FGDF (SEQ ID NO: 23); и повторяющиеся последовательности могут быть разделены по меньшей мере 10 и не больше чем 25 аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления повторяющиеся последовательности разделены аминокислотной последовательностью, полученной из группы, состоящей из: NEGEIESLSSELLT (SEQ ID NO: 6), SDGEIDELSRRVTTESEPVL (SEQ ID NO: 7) и DEHEVDALASGIT (SEQ ID NO: 8).

[0011] В любом из вариантов осуществления РНК репликонов, часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, может содержать любую из аминокислот 479-482 или 497-500, или 479-500, или 335-517 из HVD nsP3 CHIKV; или любую из аминокислот 451-454 или 468-471, или 451-471 HVD nsP3 SFV; или аминокислот 490-493 или 513-516, или 490-516, или 335-538 из HVD nsP3 SINV. В любом из этих вариантов осуществления (или в любом варианте осуществления, описанном в настоящем документе), альфавирусом Нового Света может быть VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 478-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV; или не включает аминокислоты 478-545 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV; или не включает аминокислоты 335-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV. В других вариантах осуществления альфавирусом Нового Света может быть EEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 531-547 из гипервариабельного домена EEEV. Или альфавирусом Нового Света может быть WEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 504-520 из гипервариабельного домена WEEV.

[0012] В любом из вариантов осуществления РНК репликон может иметь субгеномный промотор, который функционально связан с последовательностью РНК, кодирующей гетерологичный белок, и регулирует ее трансляцию. РНК репликоны также могут иметь 5'-кэп и 3'-поли-А хвост. РНК репликон может иметь положительно-

смысловую одноцепочечную РНК. В различных вариантах осуществления РНК репликон может иметь 10-12 тн РНК и/или может иметь диаметр 30-50 нм.

[0013] В различных вариантах осуществления гетерологичный белок является биотерапевтическим белком или пептидом, который может быть, например, антителом или рекомбинантным химерным антителом или фрагментом антитела, антигенным полипептидом или любым другим терапевтическим или иммуногенным полипептидом или пептидом.

[0014] В некоторых конкретных вариантах осуществления репликонами альфавируса Нового Света является VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 335-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV; или альфавирусом Старого Света является SINV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 335-538 из HVD nsP3 SINV.

[0015] В любом из вариантов осуществления последовательность РНК, кодирующая гетерологичный белок или пептид, может быть функционально связана с последовательностью РНК, кодирующей nsP1, nsP2 и nsP4.

[0016] В другом аспекте изобретение относится к способам введения гетерологичного белка или пептида млекопитающему. Эти способы включают введение млекопитающему РНК репликона, описанного в настоящем документе, который кодирует гетерологичный белок или пептид, и где гетерологичный белок или пептид экспрессируется в организме млекопитающего. РНК репликон может быть любым, описанным в настоящем документе.

[0017] В другом аспекте изобретение относится к РНК репликону, содержащему последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид; последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, полученные из неструктурных белков nsP1, nsP2, и nsP4 альфавируса Нового Света; и последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из белка nsP3 альфавируса Старого Света, и где первых 1-6 аминокислот на N-концевой и/или С-концевой стороне белка nsP3, происходят из последовательности альфавируса Нового Света. Таким образом, эти 1-6 аминокислот могут присутствовать в соединении между nsP2 и nsP3; или эти 1-6 аминокислот могут присутствовать в соединении между nsP3 и nsP4. В различных вариантах осуществления альфавирус Старого Света может быть любым, описанным в настоящем документе. Если альфавирусом Нового Света является VEEV, соединительной последовательностью nsP2/nsP3 может быть LHEAGC/APSY (SEQ ID NO: 12); если соединением является соединение nsP3/nsP4, последовательностью может быть RFDAGA/YIFS (SEQ ID NO: 13). В любом из вариантов осуществления может быть сохранен предпоследний глицин (также обозначенный своим однобуквенным кодом "G"), и остальные аминокислоты nsP3

отличаются, как описано в настоящем документе. Перед соединительными последовательностями необязательно может располагаться стоп-кодон (TGA), который может быть сквозным стоп-кодоном. В других вариантах осуществления, где альфавирусом Нового Света является EEEV, соединительной последовательностью nsP2/nsP3 может быть QHEAGR/APAY (SEQ ID NO: 14), и при этом сохраняется предпоследний G. Когда альфавирусом Нового Света является EEEV, последовательностью в соединении nsP3/nsP4 может быть RYEAGA/YIFS (SEQ ID NO: 15), и при этом предпоследний глицин необязательно может быть сохранен, тогда как остальные аминокислоты nsP3 отличаются, как описано в настоящем документе. Перед этими последовательностями также может присутствовать сквозной стоп-кодон (TGA). В других вариантах осуществления альфавирусом Нового Света является WEEV, и соединительной последовательностью nsP2/nsP3 может быть RYEAGR/APAY (SEQ ID NO: 16), и предпоследний G сохраняется, тогда как остальные аминокислоты в соединении nsP2/nsP3 отличаются, как описано в настоящем документе. Для соединения nsP3/nsP4 VEEV последовательностью может быть RYEAGA/YIFS (SEQ ID NO: 17), при этом сохраняется предпоследний глицин, а остальные аминокислоты nsP3 отличаются, как описано в настоящем документе; перед этими последовательностями также может быть расположен сквозной стоп-кодон (TGA). В различных вариантах осуществления последовательности SEQ ID NO: 12-17 также могут содержать одну или две, или три замены на N-концевой и/или C-концевой сторонах.

[0018] Сущность изобретения, описанная выше, не является ограничивающей, и другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания изобретения и формулы изобретения. Заголовки или подзаголовки разделов представлены исключительно для удобства читателя и не означают отступление от обсуждения или обязательно совершенно новую область изобретения. Любой объект изобретения может обсуждаться или может быть раскрыт под любым заголовком или подзаголовком раздела.

Краткое описание чертежей

[0019] Приведенное выше изложение сущности, а также последующее подробное описание изобретения будет лучше понято при прочтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. Следует понимать, что изобретение не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[0020] На ФИГ. 1 представлена графическая иллюстрация альфавируса дикого типа. Вирусная частица показана с оболочкой, сферической икосаэдрической формы, имеющая капсид диаметром 65-70 нм с икосаэдрической симметрией T=4, состоящий из 240 мономеров. Оболочка содержит 80 шипов, каждый из которых представляет собой тример белков E1/E2.

[0021] ФИГ. 2A-ФИГ. 2C: ФИГ. 2A представляет собой графическую иллюстрацию альфавирусного репликона на основе VEEV, кодирующего красную люциферазу светляка (rFF). Изображены три варианта осуществления: один с HVD nsP3 VEEV дикого типа

(WT), один гибрид VEEV/SINV (VEEV/SINV) с частью HVD SINV (путем замены аминокислотных остатков 335-538 из HVD VEEV аминокислотами 335-538 из HVD SINV; и другой гибрид (VEEV/CHIKV), содержащий часть HVD CHIKV (путем замены аминокислотных остатков 335-518 из HVD VEEV аминокислотами 335-517 HVD CHIKV). ФИГ. 2B и 2C представляют собой графические иллюстрации, показывающие, что репликоны, содержащие мутантные белки nsP3, реплицировались на таких же уровнях (ФИГ. 2B) и экспрессировали такие же уровни rFF (ФИГ. 2C), как и репликоны, содержащие nsP3 дикого типа.

[0022] ФИГ. 3A-ФИГ. 3B: ФИГ. 3A является графиком, на котором показаны результаты мониторинга активности люциферазы in vivo и представлены как общий поток. По 10 мкг РНК каждого из трех альфавирусных репликонов на основе VEEV, показанных на ФИГ. 2A, доставляли в солевом растворе внутримышечно в четырехглавую мышцу мышей BALB/c, где α.SGI.rFF кодирует VEEV WT, α.SGI.SINV.rFF кодирует VEEV/SINV, и α.SGI.CHIKV.rFF кодирует VEEV/CHIKV. На ФИГ. 3B показаны результаты аналогичного мониторинга, но с 1 мкг РНК репликона. Репликоны, экспрессирующие мутантные формы nsP3, демонстрировали подобные уровни люциферазной активности, как и репликоны с nsP3 дикого типа.

[0023] ФИГ. 4 является графиком и гистограммой, на которой показаны результаты исследований in vivo репликонов на основе VEEV, экспрессирующих HA вируса гриппа H5N1. Данные показывают, что репликоны, кодирующие химерный HVD VEEV/CHIKV, не индуцировали титры HA-специфичных IgG по сравнению с репликоном, экспрессирующим HVD дикого типа.

[0024] ФИГ. 5A-ФИГ. 5B. На ФИГ. 5A представлена диаграмма в графическом формате, демонстрирующая частоту HA-специфичных короткоживущих эффекторных CD8+ Т-клеток (SLEC) у мышей BALB/c, иммунизированных указанными репликонами на основе VEEV, экспрессирующими HA H5N1. На ФИГ. 5B представлена диаграмма в графическом формате, демонстрирующая частоту HA-специфичных эффекторных CD8+ Т-клеток-предшественников памяти (MPEC) у мышей BALB/c, иммунизированных указанными репликонами на основе VEEV, экспрессирующими HA H5N1. WT относится к немодифицированному каркасу репликона, полученному из штамма TC-83 VEEV; SGI относится к каркасу репликона, модифицированному для устойчивости к интерферонам.

[0025] На ФИГ. 6 представлена часть доменной структуры и выравнивание последовательностей белков nsP3 репрезентативных представителей альфавирусов Нового Света и Старого Света. На схематическом изображении белка nsP3 показаны три предсказанных структурных домена: макродомен, альфа-домен и HVD. Выравнивание последовательностей белков nsP3 различных альфавирусов проводили с помощью ClustalOmega. Последовательности доменов выделены теми же цветами, что и на схематическом изображении. Проиллюстрированные последовательности белков nsP3 были получены из следующих вирусов: SFV (рег. номер в GenBank NP_740667.1) (показан белок SEQ ID NO: 24), SINV (рег. номер в GenBank P03317.1) (показан белок SEQ ID NO:

25), CHIKV (рег. номер в GenBank NP_690588.1) (показан белок SEQ ID NO: 26), VEEV (рег. номер в GenBank P27282.2) (показан белок SEQ ID NO: 27) и EEEV (рег. номер в GenBank Q4QXJ8.2) (показан белок SEQ ID NO: 28). Изображение взято из публикации Foy et al., Journal of Virology, Vol. 87, No. 4, стр. 1997-2010 (2013).

[0026] На ФИГ. 7 представлена иллюстрация, показывающая различные области в HVD кодируемых белков nsP3 различных вирусов Нового Света и Старого Света (воспроизведенные с Фиг.2 из публикации Gotte et al., Viruses, 2018, 10, 105). Для фигуры использовали следующие записи в Uniprot последовательностей nsP3: MAYV (Q8QZ73), RRV (P13887), SFV (P08411), CHIKV (Q8JUX6), ONNV (Q8QZ73), BFV (P87515), SINV (P03317), VEEV (P36328), EEEV (Q4QXJ8), WEEV (P13896). Сайты связывания G3BP присутствуют для следующих белков nsP3 вируса Старого Света: для MAYV, аминокислоты 470-473; для RRV, аминокислоты 512-515 и 523-526; для SFV, аминокислоты 451-454 и 468-471; для CHIKV, аминокислоты 479-482 и 497-500; для ONNV, аминокислоты 519-522 и 537-540; для BFV, аминокислоты 429-432 и 447-450; для SINV, аминокислоты 490-493 и 513-516. Для белка вируса Нового Света P1234 представлены следующие сайты связывания G3BP (и FXR): для VEEV, аминокислоты 478-545 содержат сайт связывания FXR; для EEEV, аминокислоты 471-483 содержат сайт связывания G3BP, и аминокислоты 531-547 кодируют сайт связывания FXR; для WEEV, аминокислоты 504-520 содержат сайт связывания FXR.

Подробное описание изобретения

[0027] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае некоторые термины, используемые в настоящем изобретении, имеют значения, указанные в описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, цитируемые в настоящем изобретении, включены посредством отсылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем изобретении. Следует отметить, что используемые в настоящем изобретении и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста прямо не следует иное.

[0028] Если не указано иное, любое числовое значение, такое как % идентичности последовательностей или диапазон % идентичности последовательностей, описанные в настоящем изобретении, следует понимать как определяемые во всех случаях термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение обычно включает ±10% от приведенного значения. Например, доза 10 мг включает от 9 мг до 11 мг. При использовании в настоящем изобретении числовой диапазон в явной форме включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа в пределах таких диапазонов, а также дробные значения, если из контекста прямо не следует иное.

[0029] По всему тексту настоящего описания и формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово "включает" и такие варианты, как "включающий",

следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение какого-либо другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий. При использовании в настоящем изобретении термин "включающий" может быть заменен термином "содержащий" или, в некоторых случаях при использовании в настоящем изобретении, термином "имеющий".

[0030] При использовании в настоящем изобретении термин "состоящий из" исключает любой элемент, стадия или ингредиент, не указанный в заявленном объекте. При использовании в настоящем изобретении термин "состоящий по существу из" не исключает материалов или стадий, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики в формуле изобретения. Любой из вышеуказанных терминов "включающий", "содержащий" и "имеющий", во всех случаях при использовании в настоящем изобретении, в контексте аспекта или варианта осуществления изобретения, может быть заменен термином "состоящий из" или "состоящий по существу из" для изменения объема изобретения.

[0031] В одном общем аспекте изобретение относится к РНК репликонам, которые кодируют гетерологичный белок или пептид, и к способам их введения человеку или животному с применением РНК репликонов. РНК репликоны согласно изобретению содержат последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид, и последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, полученные из белков nsP1, nsP2 и nsP4 альфавируса Нового Света. Репликоны также содержат последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из макродомена nsP3 альфавируса, и последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из центрального домена nsP3 альфавируса. РНК репликоны согласно настоящему изобретению дополнительно содержат последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, происходящую полностью из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, или аминокислотную последовательность, содержащую часть, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, и часть, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, то есть HVD может быть гибридной или химерной последовательностью Нового Света/Старого Света. При использовании в настоящем изобретении "полипептид", "пептид" или "белок" означает молекулу, которая включает по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида.

[0032] При использовании в настоящем изобретении, в отношении nsP3 альфавируса или гипервариабельного домена nsP3 альфавируса (HVD), аминокислотные остатки пронумерованы относительно аминокислотной последовательности nsP3 альфавируса дикого типа. Аминокислотная последовательность nsP3 альфавируса дикого типа описана в настоящем изобретении или может быть получена иным образом из общедоступных источников, таких как база данных GenBank. Например, в отношении nsP3 SFV, аминокислотные остатки пронумерованы относительно nsP3 SFV дикого типа

SEQ ID NO: 24; в отношении nsP3 SINV, аминокислотные остатки пронумерованы относительно nsP3 SINV дикого типа SEQ ID NO: 25; в отношении nsP3 CHIKV, аминокислотные остатки пронумерованы относительно nsP3 CHIKV дикого типа SEQ ID NO: 26; в отношении nsP3 VEEV, аминокислотные остатки пронумерованы относительно nsP3 VEEV дикого типа SEQ ID NO: 27; в отношении nsP3 EEEV, аминокислотные остатки пронумерованы относительно nsP3 EEEV дикого типа SEQ ID NO: 28; и в отношении nsP3 WEEV, аминокислотные остатки пронумерованы относительно nsP3 WEEV дикого типа SEQ ID NO: 29.

[0033] Белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, кодируемые репликоном, являются функциональными или биологически активными белками. РНК репликоны согласно изобретению также могут кодировать 3'-нетранслируемую область (UTR) и 5'-UTR, которые могут быть альфавирусными 3' и 5'-UTR. РНК репликоны также могут кодировать контрольные элементы (например, один или более субгеномных промоторов) и поли-А хвост. Промотор, 5' и/или 3'-UTR и последовательность РНК, кодирующая гетерологичный белок или пептид, могут быть функционально связаны таким образом, чтобы РНК репликон самоамплифицировался при введении в организм, и при этом гетерологичный белок или пептид экспрессировался в организме.

[0034] Авторы настоящей заявки неожиданно обнаружили, что в РНК репликоне, полученном из генома альфавируса Нового Света (NW), если хотя бы часть РНК, кодирующая белок nsP3, заменена РНК, кодирующей хотя бы часть nsP3, полученную из альфавируса Старого Света (OW), то иммуногенность у млекопитающих по отношению к гетерологичному белку или пептиду, кодируемому репликоном, значительно снижается или устраняется. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления репликона макродомен и центральный домен nsP3 могут быть получены из последовательностей альфавируса Нового Света, тогда как HVD: a) происходит из последовательности HVD альфавируса Старого Света, или b) содержит часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Старого Света, и часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Нового Света.

[0035] В другом варианте осуществления макродомен и центральный домен получены из последовательностей макродомена и центрального домена альфавируса Старого Света, и HVD: a) получен из последовательности HVD альфавируса Старого Света, или b) содержит часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Старого Света, и часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Нового Света.

[0036] В другом варианте осуществления макродомен получен из последовательности макродомена альфавируса Нового Света, центральный домен получен из последовательности центрального домена альфавируса Старого Света, и HVD: a) получен из последовательности HVD альфавируса Старого Света, или b) содержит часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Старого Света, и часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Нового Света.

[0037] В другом варианте осуществления макродомен получен из последовательности макродомена альфавируса Старого Света, центральный домен получен из последовательности центрального домена альфавируса Нового Света, и HVD: a) получен из последовательности HVD альфавируса Старого Света, или b) содержит часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Старого Света, и часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Нового Света.

[0038] В некоторых вариантах осуществления репликон кодирует HVD, который является гибридной или химерной последовательностью Нового Света/Старого Света, содержащей часть, полученную из последовательности HVD альфавируса Нового Света, и часть, полученную из последовательности HVD Старого Света. В различных вариантах осуществления часть Старого Света может включать по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 15, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 25, или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 52, или по меньшей мере 53, или по меньшей мере 75, или по меньшей мере 100, или по меньшей мере 125, или по меньшей мере 150, или по меньшей мере 175, или по меньшей мере 200 аминокислот. Части вместе могут составлять HVD, имеющий такую же длину, что и последовательность HVD альфавируса Старого Света или Нового Света дикого типа, или могут быть до 10 или до 20, или до 30 аминокислот короче; или могут быть до 10 или до 20, или до 30, или до 40, или до 50, или до 60, или до 70, или до 80, или до 90, или до 100 аминокислот длиннее, чем последовательность HVD альфавируса Старого Света или Нового Света дикого типа.

[0039] В некоторых вариантах осуществления N-концевая часть HVD может происходить из последовательности HVD nsP3 Нового Света, и C-концевые аминокислоты HVD могут происходить из аминокислотной последовательности HVD альфавируса OW дикого типа, например, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 15, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 25, или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 31, или по меньшей мере 32, или по меньшей мере 33, или по меньшей мере 34, или по меньшей мере 35, или 35-55, или 35-65, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 45, или по меньшей мере 50, или по меньшей мере 52, или по меньшей мере 53, или по меньшей мере 60, или по меньшей мере 70, или по меньшей мере 80, или по меньшей мере 100, или по меньшей мере 125, или по меньшей мере 150, или по меньшей мере 175 C-концевых аминокислот HVD могут быть аминокислотной последовательностью, полученной из (и необязательно соответствующей) аминокислот HVD OW; в любом из этих вариантов осуществления HVD также может иметь длину меньше 200 или меньше 175, или меньше 150, или меньше 125, или меньше 100, или меньше 80 аминокислот. В других вариантах осуществления могут быть сохранены C-концевые аминокислоты из C-концевой последовательности HVD альфавируса NW, такие как 1-5 или 5, или 5-10, или 10-12, или 10-13, или 10-15, или 15-20 концевых аминокислот, тогда как оставшиеся C-концевые аминокислоты могут быть получены из HVD альфавируса OW, как описано.

[0040] В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем изобретении,

альфавирусом Нового Света может быть VEEV, EEEV или WEEV, или любой альфавирус Нового Света, описанный в настоящем изобретении или известный в данной области техники, и альфавирусом Старого Света может быть CHIKV, SINV или SFV, или любой вирус Старого Света, описанный в настоящем изобретении или известный в данной области техники. Альфавирусы Нового Света и Старого Света могут применяться в изобретении в любой комбинации, при этом все возможные комбинации и подкомбинации раскрыты, как если бы они были полностью изложены в настоящем изобретении.

Альфавирусные репликоны

[0041] Альфавирусы относятся к IV группе семейства тогавирусов (Togaviridae). Эти вирусы несут геном из положительно-смысловой одноцепочечной РНК, который обычно имеет размер от 11 до 12 тн. Репликоны альфавирусов согласно изобретению могут иметь длину 11-12 тн или 10-13 тн, или 7-20 тн, или 7-25 тн, и могут иметь 5'-кэп и 3'-поли-А-хвост, который может быть альфавирусным 5'-кэпом и 3'-поли-А-хвостом. 5'-кэп может быть таким, который известен специалистам в данной области, например, 7-метилгуанилатным кэпом или антиреверсивным аналогом кэпа 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G, или другими аналогичными кэп-структурами. Обычно они являются оболочечными вирусами, имеют сферическую форму и диаметр около 70 нм. Они также могут иметь изометрический нуклеокапсид. Репликоны могут кодироваться на одной цепи РНК. Геном альфавируса и репликоны имеют две открытые рамки считывания (ORF), неструктурные и структурные. Неструктурная часть генома кодирует белки nsP1-nsP4, которые участвуют в транскрипции и репликации вирусной РНК, продуцируются в виде полипротеина и представляют репликационный аппарат вируса. Однако репликоны могут иметь одну, две или больше двух открытых рамок считывания. Любой из альфавирусных репликонов согласно настоящему изобретению может не иметь или не включать капсид, нуклеокапсид, белок оболочки или нуклеопротеин, или может не содержаться в них или может быть не ассоциирован с ними. Альфавирусные репликоны могут быть молекулой РНК.

[0042] Структурная часть генома кодирует кор-белок нуклеокапсида C и белки оболочки P62 и E1, которые связаны в виде гетеродимера. РНК репликоны согласно изобретению могут обладать любой одной или несколькими описанными особенностями альфавируса. В некоторых вариантах осуществления РНК репликоны согласно изобретению не содержат последовательностей, кодирующих альфавирусные структурные белки; или не кодируют альфавирусные (или, необязательно, какие-либо другие) структурные белки. В некоторых вариантах осуществления РНК репликоны согласно изобретению не кодируют один или более из белков C, P62, 6K и E1, включая все комбинации и подкомбинации, как если бы они были полностью представлены в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления РНК репликоны согласно изобретению не кодируют ни один из белков C, P62, 6K и E1.

[0043] Географическое разделение семейства альфавирусов может быть важным фактором эволюции и адаптации этих вирусов к их уникальному окружению.

Циркулирующие серокомплексы альфавирусов можно дополнительно разделить на альфавирусы Старого Света и Нового Света. Альфавирусы Старого Света и Нового Света имеют последовательности, которые могут применяться в изобретении, как описано в настоящем изобретении. Альфавирусы Нового Света включают любые альфавирусы Нового Света, например вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), Форт-Морган (FMV), вирус Хайлендс-Джи (HJV), вирус Багги-Крик (BCRV), вирус Мукамбо (MUCV) и вирус Пиксуна (PIXV). Альфавирусы Старого Света включают любой альфавирус Старого Света, например, вирус Синдбис (SINV), вирус леса Семлики (SFV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус Бебару (BEBV), вирус О'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус Росс-Ривер (RRV), вирус Сагияма (SAGV), вирус Гета (GETV), вирус Мидделбург (MIDV), вирус Ндуму (NDUV), вирус леса Барма (BFV), вирус Маяро (MAYV), вирус Аура (AURA), вирус Уна, вирус Ватароа, вирус Бабанк и вирус Кызылагач. Вирусы Нового Света и Старого Света и их последовательности могут применяться в любой комбинации или подкомбинации в РНК репликонах согласно изобретению и раскрыты во всех возможных комбинациях и подкомбинациях, как если бы они были полностью представлены в настоящем изобретении.

[0044] РНК репликоны согласно изобретению могут происходить из геномов альфавирусов, что означает, что они обладают некоторыми структурными свойствами геномов альфавирусов или могут быть подобны им. РНК репликоны согласно изобретению могут быть модифицированными геномами альфавирусов. В некоторых вариантах осуществления репликонов, раскрытых в настоящем изобретении, одна или более последовательностей репликона могут быть представлены в "трансконфигурации", т.е. последовательности репликона могут быть представлены больше чем на одной молекуле РНК. В других вариантах осуществления все последовательности репликона присутствуют на одной молекуле РНК, которую также могут вводить млекопитающему, подлежащему лечению, как описано в настоящем изобретении.

Происходит из

[0045] РНК репликоны согласно изобретению могут содержать последовательности РНК из генома альфавируса Нового Света или Старого Света дикого типа (или кодируемые ими аминокислотные последовательности). Любой из РНК репликонов согласно изобретению, раскрытых в настоящем изобретении, может содержать последовательности РНК, "происходящие из" или "на основе" геномных последовательностей альфавируса дикого типа, что означает, что они обладают по меньшей мере 60% или по меньшей мере 65%, или по меньшей мере 68%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100%, или 98-99%, или 97-99%, или 95-100%, или 95-99%, или 90-100%, или 80-99% идентичностью последовательности с последовательностью РНК (которая может быть соответствующей последовательностью РНК) из РНК генома

альфавируса дикого типа, который может быть геномом альфавируса Нового Света или Старого Света. Любая из нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем изобретении, может быть функциональной или биологически активной и функционально связанной с другой последовательностью, требуемой для аутерепликации альфавируса или репликона. Молекула является функциональной или биологически активной, если она демонстрирует по меньшей мере 50% такой же активности, что и соответствующая ей природная молекула (или молекула дикого типа), но при этом функциональная молекула также может демонстрировать по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или 100% такой же активности, что и соответствующая ей природная молекула (или молекула дикого типа). РНК репликоны также могут кодировать аминокислотную последовательность, полученную из или на основе аминокислотной последовательности альфавируса дикого типа, что означает, что они обладают по меньшей мере 60% или по меньшей мере 65%, или по меньшей мере 68%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100%, или 98-99%, или 97-99%, или 95-100%, или 95-99%, или 90-100%, или 80-99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью (которая может быть соответствующей последовательностью), кодируемой РНК геномом альфавируса дикого типа, который может быть геномом альфавируса Нового Света или Старого Света. Последовательности, происходящие из других последовательностей, могут быть до 5% или до 10%, или до 20%, или до 30% длиннее или короче, чем исходная последовательность. В любом из вариантов осуществления идентичность последовательностей может составлять по меньшей мере 95% или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% в отношении любой нуклеотидной последовательности, кодирующей (или аминокислотной последовательности, исмеющей) сайт связывания G3BP или FXR. Эти последовательности также могут быть до 5% или до 10%, или до 20%, или до 30% длиннее или короче, чем исходная последовательность.

[0046] Например, в некоторых вариантах осуществления последовательности РНК, кодирующие любой один или более из белков nsP1, nsP2, nsP3, центрального домена nsP3, гипервариабельного домена nsP3 и/или nsP4, могут происходить из соответствующих последовательностей альфавирусов дикого типа. "Соответствующая" последовательность может быть аналогичной последовательностью альфавируса другого типа. Соответствующие последовательности раскрыты в настоящем изобретении и также могут быть определены с помощью инструментов выравнивания последовательностей, известных специалистам в данной области (например, Clustal Omega). На Фигуре 6 показано выравнивание последовательностей, иллюстрирующее соответствующие последовательности белков nsP3 репрезентативных представителей альфавирусов Старого Света и Нового Света, которое было получены при использовании Clustal Omega.

Впрочем, также могут использоваться другие инструменты выравнивания последовательностей, признанные средними специалистами в данной области. Программы, полезные для выполнения выравнивания последовательностей, также можно найти в Molecular Systems Biology (2011) 7, 539. Таким образом, последовательности nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 альфавируса Нового Света "соответствуют" последовательностям nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 альфавируса Старого Света, соответственно. Последовательности также могут быть соответствующими последовательностями. Соответствующие аминокислотные последовательности могут включать по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 15, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 25, или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 52, или по меньшей мере 53, или по меньшей мере 75, или по меньшей мере 100, или по меньшей мере 125, или по меньшей мере 150, или по меньшей мере 175, или по меньшей мере 200 аминокислот, и до 5% или до 10%, или до 20%, или до 30% длиннее или короче, чем исходная последовательность; соответствующие последовательности нуклеиновых кислот могут включать по меньшей мере 15 или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 45, или по меньшей мере 60, или по меньшей мере 75, или по меньшей мере 90, или по меньшей мере 156, или по меньшей мере 159, или по меньшей мере 225, или по меньшей мере 300, или по меньшей мере 375, или по меньшей мере 450, или по меньшей мере 525, или по меньшей мере 600 нуклеотидов. Такие последовательности могут быть до 5% или до 10%, или до 20%, или до 30% длиннее или короче, чем исходная последовательность.

[0047] В некоторых вариантах осуществления репликонов каждая из последовательностей nsP1, nsP2 и nsP4 может быть получена из генома альфавируса Нового Света или на его основе. В некоторых вариантах осуществления РНК репликон, полученный из или на основе генома альфавируса Нового Света дикого типа, может содержать по меньшей мере одну последовательность РНК (помимо по меньшей мере одного гетерологичного белка или пептида), которая происходит не из генома альфавируса Нового Света дикого типа, которая может быть последовательностью nsP3 или центрального домена и/или макродомена nsP3, или, по меньшей мере, части HVD. В некоторых вариантах осуществления РНК репликон, полученный из генома альфавируса Нового Света, может иметь последовательность РНК, кодирующую nsP3 или домен nsP3, или часть домена nsP3, которая заменена соответствующей последовательностью из генома альфавируса Старого Света дикого типа. При указании целого репликона, который "получен из" или "на основе", не учитывают последовательность(и) РНК, которая кодирует(ют) по меньшей мере один гетерологичный белок или пептид, и, необязательно, также могут не учитывать последовательность, кодирующую белок nsP3, или любой один или больше макродомен, центральный домен и/или HVD домен nsP3 в любой комбинации или подкомбинации.

[0048] Термин "РНК репликон" относится к РНК, которая содержит всю генетическую информацию, требуемую для направления собственной амплификации или аутореплицирования внутри пермиссивной клетки, которая может быть клеткой человека,

млекопитающего или животного. РНК репликон: 1) кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая может взаимодействовать с белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, происходящими из вируса или клеток-хозяев, катализируя процесс амплификации РНК. Неструктурные белки включают nsP1, nsP2, nsP3, nsP4; и 2) содержат цис-действующие последовательности РНК, требуемые для репликации и транскрипции геномных и субгеномных РНК, такие как 3' и 5'-UTR (нуклеотидные последовательности альфавируса для амплификации, опосредованной неструктурными белками) и/или субгеномный промотор. Эти последовательности могут быть связаны в процессе репликации с самокодируемыми белками или несамокодируемыми клеточными белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами или комплексами между любыми из этих компонентов. В некоторых вариантах осуществления модифицированная молекула РНК репликона обычно содержит элементы в следующем порядке: 5'-последовательность(и) вирусной РНК, требуемая в цис-конфигурации для репликации (например, 5'-UTR и 5'-CSE), последовательности, кодирующие биологически активные неструктурные белки (например, nsP1234), промотор для транскрипции субгеномной РНК, 3'-вирусные последовательности, необходимые в цис-конфигурации для репликации (например, 3'-UTR), и полиаденилатный тракт, и, необязательно, последовательность (или две или более последовательностей), кодирующая гетерологичный белок или пептид после или под контролем субгеномного промотора. Кроме того, термин "РНК репликон" может относиться к положительносмысловой (или информационной смысловой) молекуле, при этом РНК репликон может иметь длину, отличающуюся от длины любых известных природных РНК-вирусов. В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения РНК репликон может не иметь (или не содержать) последовательность(и) по меньшей мере одного (или всех) структурных вирусных белков (например, нуклеокапсидного белка С и белков оболочки Р62, 6К и Е1). В этих вариантах осуществления последовательности, кодирующие один или более структурных генов, могут быть заменены одной или более гетерологичными последовательностями, такими как, например, кодирующая последовательность по меньшей мере одного гетерологичного белка или пептида (или другого представляющего интерес гена (GOI)).

[0049] В различных вариантах осуществления РНК репликоны, раскрытые в настоящем изобретении, могут быть сконструированными, синтетическими или рекомбинантными РНК репликонами. При использовании в настоящем изобретении термин рекомбинантный означает любую молекулу (например, ДНК, РНК и т.д.), которая получена в результате воздействия, хотя и непрямого, человека на полинуклеотид. В качестве неограничивающих примеров, кДНК представляет собой рекомбинантную молекулу ДНК, как и любая молекула нуклеиновой кислоты, полученную с помощью полимеразной реакции(й) in vitro, или к которой были присоединены линкеры, или которая была интегрирована в вектор, такой как клонирующий вектор или вектор экспрессии. В качестве неограничивающих примеров рекомбинантный РНК репликон может быть одним или более из следующего: 1) синтезирован или модифицирован in vitro,

например, с помощью химических или ферментных методов (например, при использовании химического синтеза нуклеиновой кислоты, или при использовании ферментов для репликации, полимеризации, экзонуклеолитического расщепления, эндонуклеолитического расщепления, лигирования, обратной транскрипции, транскрипции, модификации оснований (включая, например, метилирование) или рекомбинации (включая гомологичную и сайт-специфическую рекомбинацию) молекул нуклеиновой кислоты; 2) соединенные нуклеотидные последовательности, которые в природе не соединены; 3) сконструирован при использовании методов молекулярного клонирования таким образом, что он не имеет одного или более нуклеотидов по сравнению с природной нуклеотидной последовательностью; и 4) подвергнуту манипуляциям с использованием методов молекулярного клонирования, в результате чего он имеет одно или более изменений или перестановок последовательности по сравнению с природной нуклеотидной последовательностью.

[0050] При использовании в настоящем изобретении термины "процент идентичности" или "гомология" или "общая идентичность последовательности" или "процент (%) идентичности последовательности" по отношению к последовательностям нуклеиновых кислот или полипептидным последовательностям определяют как процент нуклеотидных или аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны с известными полипептидами, после выравнивания последовательностей с получением максимального процента идентичности и введения пропусков, при необходимости, для получения максимального процента гомологии. N-концевые или C-концевые вставки или делеции не должны рассматриваться как влияющие на гомологию, и внутренние делеции и/или вставки в полипептидную последовательность меньше чем приблизительно 30, меньше чем приблизительно 20 или меньше чем приблизительно 10, или меньше, чем 5 аминокислотных остатков не должны рассматриваться как влияющие на гомологию. Гомология или идентичность на уровне нуклеотидных или аминокислотных последовательностей можно определить с помощью анализа BLAST (от англ. Basic Local Alignment Search Tool - Средство поиска основного локального выравнивания) при использовании алгоритма, применяемого в программах blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx (Altschul (1997), Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402, и Karlin (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268), которые предназначены для поиска подобия последовательностей. Подход, используемый программой BLAST, состоит в том, чтобы сначала рассмотреть аналогичные сегменты, с пропусками и без них, между запрашиваемой последовательностью и последовательностью в базе данных, затем оценить статистическую значимость всех обнаруженных совпадений и, наконец, суммировать только те совпадения, которые удовлетворяют заранее выбранному порогу значимости. По поводу обсуждения основных вопросов поиска подобия в базах данных последовательностей см. Altschul (1994), Nature Genetics 6, 119-129. Параметры поиска для гистограммы, описаний, сопоставлений, ожидания (т.е. порога статистической значимости для сообщения о совпадениях с последовательностями в базе данных), порогового

значения, матрицы и фильтра (низкая сложность) могут быть установлены по умолчанию. Матрица замен, используемая по умолчанию в blastp, blastx, tblastn и tblastx, - матрица BLOSUM62 (Henikoff (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919), рекомендованная для запрашиваемых последовательностей длиной более 85 (нуклеотидных оснований или аминокислот).

[0051] В blastn, разработанном для сравнения нуклеотидных последовательностей, матрица замен задается отношениями M (т.е. оценки вознаграждения за пару совпадающих остатков) к N (т.е. оценке штрафа за несовпадающие остатки), где значения по умолчанию для M и N могут составлять +5 и -4 соответственно. Четыре параметра blastn могут быть установлены со следующими значениями: Q=10 (штраф за создание пропуска); R=10 (штраф за продолжение пропуска); wink=1 (генерирует совпадения слов в каждом wink-ом положении по длине запроса); и gapw=16 (задает ширину окна, в котором генерируют выравнивания с пропусками). Эквивалентные настройки параметра Blastp для сравнения аминокислотных последовательностей могут быть следующими: Q=9; R=2; wink=1; и gapw=32. В сравнении BESTFIT® между последовательностями, доступном в пакете GCG версии 10.0, могут использоваться параметры для ДНК GAP=50 (штраф за создание пропуска) и LEN=3 (штраф за продолжение пропуска), и эквивалентные настройки при сравнении белков могут включать GAP=8 и LEN=2.

[0052] При раскрытии последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов в настоящем изобретении, например последовательностей nsP1, nsP2, nsP3, макродомена nsP3, центрального домена nsP3, гипервариабельного домена nsP3, nsP4, RdRp, P1234, также раскрыты последовательности, которые считаются основанными на или происходящими из исходной последовательности. Таким образом, раскрытые последовательности включают полипептидные последовательности, имеющие значения идентичности последовательности по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%, или 98-99%, или 97-99%, или 95-99%, или 90-99%, или 85-95%, или 85-99% идентичность последовательности с полноразмерной полипептидной последовательностью любой полипептидной последовательности, описанной в настоящем изобретении, такой как SEQ ID NO: 1-29 (и нуклеотидные последовательности, кодирующие любой из SEQ ID NO: 1-29), и их фрагменты. Также раскрыты фрагменты или части любой из последовательностей, раскрытых в настоящем изобретении. Фрагменты или части последовательностей могут включать последовательности, содержащие по меньшей мере 5 или по меньшей мере 7, или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 30, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по

меньшей мере 125, 150 или больше, или 5-10, или 10-12, или 10-15, или 15-20, или 20-40, или 20-50, или 30-50, или 30-75, или 30-100 аминокислотных остатков полной последовательности (или нуклеиновой кислоты, кодирующей такие фрагменты), или по меньшей мере 100, или по меньшей мере 200, или по меньшей мере 300, или по меньшей мере 400, или по меньшей мере 500, или по меньшей мере 600, или по меньшей мере 700, или по меньшей мере 800, или по меньшей мере 900, или по меньшей мере 1000, или 100-200, или 100-500, или 100-1000, или 500-1000 аминокислотных остатков (или нуклеиновой кислоты, кодирующей такие фрагменты), или любое из указанных количеств, но меньше чем 500 или меньше чем 700, или меньше чем 1000, или меньше чем 2000 последовательных аминокислот любой из SEQ ID NO: 1-29 или любого фрагмента, раскрытого в настоящем изобретении, или нуклеиновой кислоты, кодирующей такие фрагменты. Также раскрыты варианты таких последовательностей, например, где по меньшей мере один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков были встроены на N- и/или С-конец, и/или внутри, раскрытой последовательности(ей), которые содержат вставку и замену, а также последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие такие варианты. Рассматриваемые варианты могут дополнительно или альтернативно включать такие варианты, которые содержат заданные мутации, например, посредством гомологичной рекомбинации, сайт-направленного или ПЦР-мутагенеза, и соответствующие полипептиды или нуклеиновые кислоты из других биологических видов, включая, без ограничения, полипептиды или нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем изобретении, аллели или другие природные варианты из семейства полипептидов или нуклеиновых кислот, которые содержат вставку и замену; и/или производные, в которых полипептид был ковалентно модифицирован путем замещения, с помощью химических, ферментативных или других подходящих способов, молекулой, которая отличается от природной аминокислоты, которая содержит вставку и замену (например, детектируемой молекулой, такой как фермент). Последовательности нуклеиновых кислот, описанные в настоящем изобретении, могут быть последовательностями РНК.

[0053] Любые из компонентов или последовательностей РНК репликона могут быть функционально связаны с любым другим из компонентов или последовательностей. Компоненты или последовательности РНК репликона могут быть функционально связаны для экспрессии по меньшей мере одного гетерологичного белка или пептида (или биотерапевтического средства) в клетке-хозяине или обработанном организме и/или для способности репликона к ауторепликации. Термин "функционально связанный" обозначает функциональную связь между двумя или более последовательностями, которые способны выполнять свою обычную функцию. Таким образом, промотор или UTR, функционально связанные с кодирующей последовательностью, способны вызывать транскрипцию и экспрессию кодирующей последовательности в случае присутствия подходящих ферментов. Промотор не должен обязательно примыкать к кодирующей последовательности, если он способен направлять ее экспрессию. Таким образом,

функциональная связь между последовательностью РНК, кодирующей гетерологичный белок или пептид, и регуляторной последовательностью (например, промотором или UTR) представляет собой функциональную связь, которая обеспечивает экспрессию представляющего интерес полинуклеотида. Функционально связанный также может относиться к последовательностям, таким как последовательности, кодирующие RdRp (например, nsP4), nsP1-4, UTR, промоторы и другие последовательности, кодирующие в РНК репликоне, которые связаны таким образом, что они обеспечивают транскрипцию и трансляцию биотерапевтической молекулы и/или репликацию репликона. UTR могут быть функционально связаны путем предоставления последовательностей и интервала, необходимых для распознавания и трансляции рибосомой других кодируемых последовательностей.

G3BP и FXR

[0054] G3BP (Ras-ГТФаза-активирующий белок (домен Src-гомологии 3 (SH3))-связывающий белок) и FXR (белки семейства fragile X) являются РНК-связывающими белками, которые самособираются с образованием рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP). Они оба связываются с доменами HVD. Комплексы RNP, образованные G3BP и FXR, выполняют различные функции в клетке. Например, G3BP важен для нуклеации и образования стрессовых гранул при иммунном ответе. Стрессовые гранулы вызывают блокирование и остановку трансляции мРНК, а также регулируют индукцию и секрецию интерферонов 1-го типа и других цитокинов. Вместе эти действия укрепляют противовирусное состояние в клетке и стимулируют адаптивный иммунный ответ. Белки семейства FXR, с другой стороны, как полагают, не играют роли во врожденном иммунитете, однако ассоциируют с полирибосомами и формируют РНК-транспортные гранулы в нейронах. На Фигуре 7 указаны области на различных HVD nsP3 альфавирусов, где такие РНК-связывающие белки связываются с альфавирусными последовательностями.

Неструктурные белки

[0055] Геномы альфавирусов кодируют неструктурные белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, которые синтезируются в виде единого полипротеина-предшественника, иногда обозначаемого P1234 (или nsP1-4 или nsP1234), который расщепляется с образованием зрелых белков в результате протеолитического процессинга. nsP1 может иметь размер приблизительно 60 кДа и может обладать метилтрансферазной активностью и участвовать в реакции вирусного кэпирования. nsP2 имеет размер приблизительно 90 кДа и может обладать геликазной и протеазной активностью, тогда как nsP3 имеет размер приблизительно 60 кДа и содержит три домена: макродомен, центральный (или уникальный для альфавирусов) домен и гипервариабельный домен (HVD) (см. Фигуру 6). nsP4 имеет размер приблизительно 70 кДа и содержит каталитический домен коровой РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp). После заражения альфавирусная геномная РНК транслируется с получением полипротеина P1234, который разрезается на отдельные белки.

nsP3

[0056] Альфавирусный белок nsP3 содержит три домена: a) макродомен, b) центральный (или альфа) домен и c) гипервариабельный домен (HVD). Соответствующие аминокислотные последовательности трех доменов некоторых репрезентативных представителей альфавирусов Старого Света и Нового Света показаны на Фигуре 6. В различных вариантах осуществления репликоны согласно изобретению имеют последовательность РНК, кодирующую макродомен nsP3, полученный из nsP3 альфавируса дикого типа, и центральный домен nsP3, полученный из nsP3 альфавируса дикого типа. В различных вариантах осуществления макродомен и центральный домен могут происходить из nsP3 альфавируса Нового Света дикого типа или могут происходить из белка nsP3 альфавируса Старого Света дикого типа. В некоторых вариантах осуществления макродомен может происходить из макродомена альфавируса Нового Света дикого типа, а центральный домен может происходить из альфавирус центрального домена Старого Света дикого типа, или наоборот. Различные домены могут иметь любую последовательность, описанную в настоящем изобретении.

Гипервариабельный домен (HVD)

[0057] В некоторых вариантах осуществления репликоны могут иметь HVD альфавируса Нового Света, где последовательность на С-концевой стороне аминокислоты, где начинается сайт связывания FXR, может быть удалена и заменена заменяющей последовательностью из последовательности HVD альфавируса Старого Света дикого типа или ее части. Заменяющие последовательности альфавируса Старого Света описаны в настоящем изобретении. Таким образом, если альфавирусом Нового Света является VEEV, эти аминокислоты на С-концевой стороне от аминокислоты 478 в nsP3 могут быть удалены; если альфавирусом Нового Света является EEEV, эти аминокислоты на С-концевой стороне от аминокислоты 531 в nsP3 могут быть удалены; и если альфавирусом Нового Света является WEEV, эти аминокислоты на С-конце от аминокислоты 504 в nsP3 могут быть удалены (см. Фигуру 7). В любом из этих вариантов осуществления заменяющая последовательность может быть заменена, как описано в настоящем изобретении. Как иначе описано в настоящем изобретении, часть С-концевых аминокислот HVD альфавируса Нового Света, тем не менее, может сохраняться на С-концевой стороне последовательности Старого Света.

[0058] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть последовательности, кодирующей сайт связывания FXR в альфавирусе Нового Света, может быть удалена и заменена заменяющей последовательностью, которая описана в настоящем изобретении. Таким образом, если альфавирусом Нового Света является VEEV, аминокислоты 478-517 или 478-545 в nsP3 могут быть удалены и заменены заменяющей последовательностью альфавируса Старого Света. Или, если альфавирусом Нового Света является VEEV, по меньшей мере один из повторов, присутствующих между аминокислотами 478-545 в nsP3, может быть удален и, необязательно, заменен заменяющей последовательностью из альфавируса Старого Света. Если альфавирусом

Нового Света является EEEV, аминокислоты 531-547 в nsP3 могут быть удалены и заменены заменяющей последовательностью Старого Света. Если альфавирусом Нового Света является WEEV, аминокислоты 504-520 в nsP3 могут быть удалены и заменены заменяющей последовательностью Старого Света. В других вариантах осуществления может быть удалена вся последовательность, кодирующая сайт связывания FXR, или по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% сайта связывания FXR может быть удалено и, необязательно, заменено заменяющей последовательностью. В любом из вариантов осуществления указанная последовательность может быть удалена без вставки заменяющей последовательности.

[0059] Заменяющие последовательности альфавируса Старого Света могут включать аминокислотные фрагменты, имеющие один или несколько сайтов связывания G3BP или по меньшей мере часть сайта связывания G3BP. Таким образом, заменяющей последовательностью может быть FGDF (SEQ ID NO: 18) или FGSF (SEQ ID NO: 19). Заменяющая последовательность также может быть получена, по меньшей мере, из части гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света дикого типа. Дополнительные примеры заменяющих последовательностей альфавируса Старого Света описаны ниже. Заменяющие последовательности альфавируса Старого Света могут использоваться в репликонах, содержащих последовательности любых последовательностей HVD альфавируса Нового Света, описанных в настоящем изобретении. В любом из вариантов осуществления альфавирусом Нового Света может быть VEEV, EEEV, WEEV или любой альфавирус Нового Света, описанный в настоящем изобретении.

[0060] Если альфавирусом Старого Света является CHIKV, заменяющая последовательность может быть аминокислотами 479-582 или 479-500, или 479-500 из nsP3 CHIKV.

[0061] Если альфавирусом Старого Света является SINV, заменяющая последовательность может быть последовательностью, включающей аминокислоты 490-493 или 513-516, или 490-516 из nsP3 SINV.

[0062] Если альфавирусом Старого Света является SFV, заменяющая последовательность может быть последовательностью, включающей аминокислоты 451-471 или 451-454, или 468-471 из nsP3 SFV.

[0063] Если альфавирусом Старого Света является MAYV, заменяющая последовательность может быть последовательностью, включающей аминокислоты 470-473 из nsP3 MAYV.

[0064] Если альфавирусом Старого Света является RRV, заменяющая последовательность может последовательностью, включающей аминокислоты 412-426 или 512-515, или 523-526 из nsP3 RRV.

[0065] Если альфавирусом Старого Света является ONNV, заменяющая последовательность может быть последовательностью, включающей аминокислоты 519-540 или 519-522, или 537-540 из nsP3 ONNV.

[0066] Если альфавирусом Старого Света является BFV, заменяющая последовательность может быть последовательностью, включающей аминокислоты 429-450 или 429-432, или 447-450 из nsP3 BFV.

[0067] Альфавирусы Нового Света и Старого Света могут быть любыми, описанными в настоящем изобретении, и могут быть объединены в любой возможной комбинации или подкомбинации, все из которых раскрыты, как если бы они были полностью представлены в настоящем изобретении.

[0068] Геном альфавируса кодирует коровую РНК-зависимую РНК-полимеразу в nsP4. Расщепление полипротеина может происходить по соединению nsP2/3 при воздействии на РНК-матрицу, используемую в процессе репликации генома. После расщепления, nsP3 может образовывать кольцевую структуру, которая окружает nsP2, и эти два белка имеют существенную область контакта. Таким образом, сохранение последовательностей около области соединений nsP2/3 и/или nsP3/4 может быть полезным.

[0069] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления макродомены и/или центральные и/или HVD домены белка nsP3 могут иметь С-концевые и/или N-концевые части (как описано в настоящем изобретении), которые являются аминокислотной последовательностью, происходящей из альфавируса Нового Света, тогда как остальная часть домена(ов) происходит(ят) из последовательности альфавируса Старого Света. Например, макродомен и/или центральный и/или HVD домены могут иметь последовательность, происходящую из соответствующего домена альфавируса Старого Света, но могут иметь первые 4 или 5, или 6, или 4-6, или 6-8, или 6-10 N-концевых и/или С-концевых аминокислот nsP3, происходящие из последовательности альфавируса Нового Света (который может быть альфавирусом Нового Света, из которого получены nsP1, nsP2 и nsP4). Таким образом, репликон может быть таким, как описано в настоящем изобретении, имеющим последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из макродомена и/или центрального и/или HVD домена nsP3 альфавируса Старого Света, при этом первые 1-3 или 1-4, или 1-5, или 1-6, или 1-7, или 1-8 аминокислот на N-концевой и/или С-концевой стороне домена(ов) получены из домена(ов) альфавируса Нового Света или могут иметь в нем одну или две, или три замены. При использовании в данном контексте термины "С-конец" и "N-конец" обозначают не фактический конец, а точку, в которой полипротеин (например, P1234) будет расщепляться на отдельные полипептиды (например, nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4). Последовательности, кодирующие nsP, имеют стоп-кодоном, и обычно в этой точке останавливается транскрипция. Однако когда стоп-кодон относится к стоп-кодону сквозного прочтения, концом может быть "/", указанный в SEQ ID NO: 12-17, который может представлять собой N-конец и/или С-конец nsP. Соединительные последовательности могут состоять из 1-6 аминокислот по обе стороны от конца, например на стороне nsP3. Такие варианты осуществления позволяют получить последовательность nsP3 из последовательностей Старого Света, но при этом с

сохранением соединения между nsP2/nsP3 и между nsP3/nsP4. Сохранение этих соединений может позволить расщеплять соединения белка P1234 с использованием ферментов альфавируса Нового Света. В некоторых вариантах осуществления сохраняется предпоследний глицин в соединении. Альфавирус Старого Света может быть любым, описанным в настоящем изобретении. Например, если альфавирусом Нового Света является VEEV, последовательностью nsP2/nsP3 может быть LHEAGC/APSY (SEQ ID NO: 12), где косая черта или слеш ("/") обозначает границу между nsP2 и nsP3, и сохранен предпоследний G, тогда как оставшиеся аминокислоты в соединении nsP2/nsP3 отличаются, как описано в настоящем изобретении. В случае соединения nsP3/nsP4 VEEV такой последовательностью может быть RFDAGA/YIFS (SEQ ID NO: 13), при этом предпоследний глицин снова сохраняется, а остальные аминокислоты nsP3 отличаются, как описано в настоящем изобретении. Перед этими последовательностями также может находиться стоп-кодон (TGA), который, как было отмечено выше, иногда может рассматриваться как стоп-кодон сквозного прочтения. Если альфавирусом Нового Света является EEEV, последовательностью nsP2/nsP3 может быть QHEAGR/APAY (SEQ ID NO: 14), где косая черта ("/") обозначает границу между nsP2 и nsP3, и сохраняется предпоследний G, при этом остальные аминокислоты в соединении nsP2/nsP3 отличаются, как описано в настоящем изобретении. В случае соединения nsP3/nsP4 EEEV последовательностью может быть RYEAGA/YIFS (SEQ ID NO: 15), при этом предпоследний глицин снова сохраняется, а оставшиеся аминокислоты nsP3 отличаются, как описано в настоящем изобретении. Перед этими последовательностями также может присутствовать стоп-кодон сквозного прочтения (TGA), как указано выше. Если альфавирусом Нового Света является WEEV, последовательностью nsP2/nsP3 может быть RYEAGR/APAY (SEQ ID NO: 16), где косая черта ("/")обозначает конец nsP2 (и соединения между nsP2 и nsP3), и с сохранением предпоследнего G, тогда как оставшиеся аминокислоты в соединении nsP2/nsP3 отличаются, как описано в настоящем изобретении. В случае соединения nsP3/nsP4 WEEV последовательностью может быть RYEAGA/YIFS (SEQ ID NO: 17), при этом предпоследний глицин снова сохраняется, а оставшиеся аминокислоты nsP3 отличаются, как описано в настоящем изобретении. Перед этими последовательностями также может присутствовать стоп-кодон сквозного прочтения (TGA), как описано в настоящем изобретении. Любая из этих последовательностей (SEQ ID NO: 12-17) также может содержать одну, две или три замены на N-концевой и/или C-концевой сторонах.

Повторяющиеся мотивы

[0070] Альфавирусы могут содержать консервативные элементы последовательностей (CSE), которые являются подобными или идентичными последовательностями в последовательностях нуклеиновых кислот или полипептидов у разных видов. CSE могут появляться в HVD nsP3 альфавирусов Нового Света или Старого Света и известны в данной области.

[0071] Альфавирусы Старого Света также могут содержать аминокислотные

мотивы FGDF (SEQ ID NO: 18) или FGSF (SEQ ID NO: 19), которые могут повторяться в последовательности с образованием последовательность повторов или повторяющегося мотива. В любом из вариантов осуществления РНК репликона согласно изобретению HVD альфавируса Старого Света может содержать повтор FGDF/FGDF (SEQ ID NO: 20) или повтор FGSF/FGSF (SEQ ID NO: 21), или повтор FGDF/FGSF (SEQ ID NO: 22), или повтор FGSF/FGDF (SEQ ID NO: 23). Во всех вариантах осуществления, когда присутствует повтор, два повторяющихся мотива могут быть отделены одним или более аминокислотными остатками. В различных вариантах осуществления два повторяющихся мотива могут быть отделены 5 или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или по меньшей мере 10, или 11, или 12, или 13, или 14, или 15, или 16, или 17, или 18, или 19, или 20, или 21, или 22, или 23, или 24, или 25 аминокислотными остатками или больше чем 25 аминокислотными остатками, которые в одном варианте осуществления могут быть случайными аминокислотами. В одном варианте осуществления мотивы или повторяющиеся мотивы отделены по меньшей мере 10 и не больше чем 25 аминокислотами, которые также могут быть случайными аминокислотами. В различных вариантах осуществления два повторяющихся мотива могут быть отделены последовательностью NEGEIESLSSELLT (SEQ ID NO: 6), SDGEIDELSRRVTTESEPVL (SEQ ID NO: 7) или DEHEVDALASGIT (SEQ ID NO: 8), или последовательностью, полученной из любой из них, которые могут иметь такую же длину; таким образом, раскрыты повторяющиеся мотивы, отделенные SEQ ID NO: 6, 7 или 8, имеющие: 1) мотив FGDF (SEQ ID NO: 18) на обоих концах; 2) мотив FGSF (SEQ ID NO: 19) на обоих концах; 3) мотив FGDF (SEQ ID NO: 18) на 3' или на 5'-конце и мотив FGSF (SEQ ID NO: 19) на противоположном конце. В различных вариантах осуществления аминокислотные последовательности также могут следовать за вторым мотивом. Примеры включают аминокислотную последовательность DDVLRLGRAGA (SEQ ID NO: 11) или EPGEVNSIISSRSAVSFPLRKQRRRRRSRRTEY (SEQ ID NO: 10), или LPGEVDDLTDSDWSTCSDTDDELRLDRAGG (SEQ ID NO: 9), или последовательность, полученную из любой из них, любая из которых может следовать за мотивом или повторяющимся мотивом, раскрытым в настоящем изобретении.

Нетранслируемые области

[0072] Любой из репликонов согласно изобретению также может включать 5' и 3'-нетранслируемую область (UTR). Области UTR могут быть последовательностями UTR альфавирусов Нового Света или Старого Света дикого типа или производными последовательностями любой из них. В различных вариантах осуществления 5'-UTR может иметь любую подходящую длину, такую как приблизительно 60 нт или 50-70 нт, или 40-80 нт. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR также может иметь консервативные первичные или вторичные структуры (например, одну или более стебель-петель) и может участвовать в репликации альфавируса или РНК репликона. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR может иметь длину до нескольких сотен нуклеотидов, например, длину 50-900 или 100-900, или 50-800, или 100-700, или 200-700 нт. 3'-UTR

также может иметь вторичные структуры, например ступенчатую петлю, после которой может следовать полиаденилатный тракт или поли-А-хвост. В любом из вариантов осуществления изобретения 5' и 3'-нетранслируемые области могут быть функционально связаны с любой из других последовательностей, кодируемых репликоном. UTR могут быть функционально связаны с промотором и/или последовательностью, кодирующей гетерологичный белок или пептид, путем предоставления последовательностей и интервалов, необходимых для распознавания и транскрипции других кодируемых последовательностей.

[0073] В одном варианте осуществления РНК репликон согласно изобретению может иметь последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид (например, моноклональное антитело или биотерапевтический белок или пептид), последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, полученные из последовательностей белков nsP1, nsP2 и nsP4 альфавируса Нового Света дикого типа, и последовательности 5' и 3'-UTR (для амплификации, опосредованной неструктурными белками). РНК репликоны также могут иметь 5'-кэп и полиаденилатный (или поли-А) хвост. РНК репликон также может кодировать аминокислотную последовательность, происходящую из макродомена альфавируса Нового Света, аминокислотную последовательность, происходящую из центрального домена альфавируса Нового Света, и аминокислотную последовательность, происходящую из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света. В альтернативных вариантах осуществления РНК репликон может кодировать часть, имеющую аминокислотную последовательность, полученную из гипервариабельного домена Нового Света, и другую часть, имеющую аминокислотную последовательность, полученную из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, как описано в настоящем изобретении.

[0074] Иммуногенность гетерологичного белка или пептида может быть определена с помощью ряда анализов, известных средним специалистам, например, иммуноокрашивания внутриклеточных цитокинов или секретируемых цитокинов популяциями эпитоп-специфичных Т-клеток, или путем количественного определения частоты и общего количества эпитопов-специфичных Т-клеток и исследования их состояния дифференцировки и активации, например, короткоживущих эффекторных Т-клеток и эффекторных CD8+ Т-клеток-предшественников памяти. Иммуногенность также может быть определена путем измерения антителоопосредованного иммунного ответа, например, продукции антител путем измерения титров IgA или IgG в сыворотке.

Гетерологичные белки и пептиды

[0075] РНК репликоны согласно настоящему изобретению включают последовательность РНК, кодирующую по меньшей мере один белок или пептид, который является гетерологичным для альфавируса, а также может (но не обязательно) быть гетерологичным для человека, млекопитающего или животного, у которых последовательность РНК экспрессируется в организме. В любом варианте осуществления репликоны могут иметь последовательность(и) РНК, кодирующую два, три или более

гетерологичных белков или пептидов. В различных вариантах осуществления гетерологичный белок или пептид является биотерапевтической молекулой, как описано в настоящем изобретении. Хотя введение биотерапевтических молекул человеку, млекопитающему или животному сопряжено с риском провоцирования иммунного ответа с продукцией противолекарственных антител, изобретение позволяет вводить репликон в организм человека, млекопитающего или животного, и для экспрессии биотерапевтического средства в организме человека, млекопитающего или животного, при этом в клетках человека, млекопитающего или животного, получающих репликон и экспрессирующих биотерапевтическую молекулу, возникает существенно сниженный иммунный ответ или не возникает. В любом из вариантов осуществления последовательность, кодирующая гетерологичный белок или пептид, может быть функционально связана с одной или более другими последовательностями репликона (например, с промотором или 5' или 3'-UTR последовательностями) и может находиться под контролем субгеномного промотора, в результате чего гетерологичный белок или пептид экспрессируется в организме человека, млекопитающего или животного.

[0076] Гетерологичный белок или пептид может быть любым белком или пептидом, и примеры включают цитокины, факторы роста, иммуноглобулины, моноклональные антитела (включая Fab-антигенсвязывающие фрагменты, Fc слитые белки), гормоны, интерфероны, интерлейкины, регуляторные пептиды и белки. Конкретные примеры моноклональных антител, которые могут быть гетерологичным белком, включают раксибакумаб, тоцилизумаб, брентузимаб ведотин, фактор IX-Fc слитый белок, рилонацепт, офатумумаб, бевацизумаб, белимумаб, цертолизумаба пэгол, рамуцирумаб, фактор VIII-Fc слитый белок, этанерцепт, ведолизумаб, цетуксимаб, афлиберцепт, обинутузумаб, трастузумаб, адалимумаб, канакинумаб, инфликсимаб, адо-трастузумаб эмтанзин, пембролизумаб, алемтузумаб, ранибизумаб, ромиплостим, белатацепт, абатацепт, пертузумаб, деносумаб, инфликсимаб, катумаксомаб, абциксимаб, ритуксимаб, голимумаб, базиликсимаб, экулизумаб, устекинумаб, силтуксимаб, паливизумаб, натализумаб, панитумумаб, омализумаб, ипилимумаб, зивафлиберцепт и ибритумомаб тиуксетан. В других вариантах осуществления гетерологичный белок или пептид может быть эндотелиальным фактором роста (например, EGF сосудов, гормоном (например, инсулином, релаксином), олигонуклеотидом, вызывающим пропуск экзона, морфолиноолигомером, антисмысловым морфолиноолигомером или РНК, кодирующими опухолеспецифические антигены. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок или пептид может кодироваться последовательностью РНК размером до 5 тн или до 6 тн, или до 7 тн, или до 8 тн, или до 9 тн, или до 10 тн, или до 11 или до 12 тн. Гетерологичный белок также может быть молекулой одноцепочечного антитела.

[0077] Альфавирусные репликоны согласно изобретению также могут иметь субгеномный промотор для экспрессии гетерологичного белка или пептида. Термин "субгеномный промотор" при использовании в настоящем изобретении относится к промотору субгеномной мРНК вирусной нуклеиновой кислоты. При использовании в

настоящем изобретении "альфавирусный субгеномный промотор" представляет собой промотор, изначально определенный в геноме альфавируса дикого типа, который направляет транскрипцию субгеномной информационной РНК в качестве части процесса репликации альфавируса.

[0078] Термин "гетерологичный" при использовании в отношении полинуклеотида, гена, нуклеиновой кислоты, полипептида, белка или фермента относится к полинуклеотиду, гену, нуклеиновой кислоте, полипептиду, белку или ферменту, которые происходят не из вида хозяина. Например, "гетерологичный ген" или "гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты" при использовании в настоящем изобретении относятся к последовательности гена или нуклеиновой кислоты из другого вида, отличающегося от вида организма-хозяина, в который их ввели. Гетерологичные последовательности также могут быть синтетическими и не происходить из организма или не существовать в природе. При упоминании регуляторной последовательности гена или вспомогательной последовательности нуклеиновой кислоты, используемой для манипуляции экспрессией последовательности гена (например, 5'-нетранслируемая область, 3'-нетранслируемая область, последовательность присоединения поли-А, интронная последовательность, сайт сплайсинга, участок связывания рибосомы, последовательность внутренней посадки рибосомы, область гомологии генома, сайт рекомбинации и т.д.) или к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белковый домен или последовательность локализации белка, "гетерологичный" означает, что регуляторная или вспомогательная последовательность или последовательность, кодирующая белковый домен или последовательность локализации, происходит из другого источника, нежели ген, с которым регуляторная или вспомогательная последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белковый домен или последовательность локализации, соседствует в геноме, хромосоме или эписоме. Таким образом, промотор, функционально связанный с геном, с которым он функционально не связан в своем естественном состоянии (например, в геноме генетически не модифицированного организма), именуется в настоящем изобретении "гетерологичным промотором", даже если промотор может быть получен от того же вида (или, в некоторых случаях, из того же организма), что и ген, с которым он связан. Аналогичным образом, когда речь идет о последовательности локализации белка или белкового домена сконструированного белка, "гетерологичный" означает, что последовательность локализации или белковый домен получены из белка, который отличается от того белка, в который их включают с помощью методов генной инженерии.

[0079] Термин "рекомбинантная" или "сконструированная" молекула нуклеиновой кислоты при использовании в настоящем изобретении относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была изменена в результате вмешательства человека. В качестве неограничивающих примеров, кДНК представляет собой молекулу рекомбинантной ДНК, как и любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая была создана с помощью полимеразной реакции(й) in vitro, или к которой были присоединены линкеры, или

которая была интегрирована в вектор, такой как клонирующий вектор, вектор экспрессии или репликон. В качестве неограничивающих примеров молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты: 1) была синтезирована или модифицирована in vitro, например, с помощью химических или ферментативных методов (например, при использовании химического синтеза нуклеиновых кислот или при использовании ферментов для репликации, полимеризации, экзонуклеолитического расщепления, эндонуклеолитического расщепления, лигирования, обратной транскрипции, транскрипции, модификации оснований (включая, например, метилирование) или рекомбинации (включая гомологичную и сайт-специфическую рекомбинацию)) молекул нуклеиновых кислот; 2) включает соединенные нуклеотидные последовательности, которые не соединены в природе, 3) была сконструирована с использованием методов молекулярного клонирования таким образом, что в ней отсутствует один или более нуклеотидов по сравнению с природной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты, и/или 4) была подвергнута манипуляциям с использованием методов молекулярного клонирования таким образом, что она имеет одну или более изменений или перестроек последовательностей по сравнению с природной последовательностью нуклеиновой кислоты. В качестве неограничивающих примеров, кДНК представляет собой молекулу рекомбинантной ДНК, как и любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая была создана с помощью полимеразной реакции(й) in vitro, или к которой были присоединены линкеры, или которая была интегрирована в вектор, такой как клонирующий вектор или вектор экспрессии, или которая была интегрирована в РНК репликон.

Методы

[0080] Изобретение также относится к способам введения нуклеиновой кислоты человеку, млекопитающему или животному. Нуклеиновая кислота может быть последовательностью РНК, кодирующей белок или пептид (который может быть гетерологичным белком или пептидом). Способы включают введение пациенту РНК репликона, описанного в настоящем изобретении, где белок или пептид, кодируемый репликоном, экспрессируется (или транскрибируется) у пациента, что может быть выполнено с использованием клеточных компонентов из организма пациента. В любом из (неограничивающих) вариантов осуществления в настоящем изобретении млекопитающее может быть человеком, домашним животным, животными, выращиваемыми в продовольственных целях, или животным-компаньоном. Животное также может быть любой птицей, рыбой (например, из семейства лососевых), сельскохозяйственной птицей или домашней птицей, например, курицей, уткой, гусем, индейкой, страусом, эму, лебедем, павлином, фазаном, куропаткой или цесаркой. Репликон можно вводить в фармацевтически приемлемом носителе, например, растворе хлорида натрия, воде или другом приемлемом носителе.

[0081] При использовании в настоящем изобретении "фармацевтически приемлемый носитель" означает любое вещество, подходящее для применения при

введении индивиду. Например, фармацевтически приемлемый носитель может быть стерильным водным раствором, таким как фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) или вода для инъекций. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель может быть буфером, консервантом, изотоническим веществом, стабилизатором, поверхностно-активным веществом, увлажняющим веществом, эмульгатором, антиоксидантом, наполнителем или хелатообразователем. Такие дополнительные ингредиенты, конечно же, не должны отрицательно влиять на общую стабильность фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

[0082] Репликон также можно вводить в виде фармацевтически приемлемой соли. При использовании в настоящем изобретении "фармацевтически приемлемые соли" означают физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений, таких как соединения нуклеиновых кислот или полинуклеотиды, то есть соли, которые сохраняют требуемую биологическую активность исходного соединения и не придают ему нежелательных токсикологических свойств. Фармацевтически приемлемые кислые/анионные соли для использования в изобретении включают, без ограничения перечисленными, ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат, эдизилат, эстолат, эзилат, фумарат, глицептат, глюконат, глутамат, гликоллиларсанилат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, иодид, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, мукат, напсилат, нитрат, памоат, пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат и триэтиодид. Органические или неорганические кислоты также включают, без ограничения перечисленными, иодоводородную, хлорную, серную, фосфорную, пропионовую, гликолевую, метансульфоновую, гидроксиэтансульфоновую, щавелевую, 2-нафталинсульфоновую, толуолсульфоновую, циклогексан-сульфаминовую, сахариновую или трифторуксусную кислоты. Фармацевтически приемлемые основные/катионные соли включают, без ограничения перечисленными, алюминий, 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (также известный как трис(гидроксиметил)-аминометан, трометан или Трис), аммиак, бензатин, трет-бутиламин, кальций, хлорпрокаин, холин, циклогексиламин, диэтаноламин, этилендиамин, литий, L-лизин, магний, меглумин, N-метил-D-глюкамин, пиперидин, калий, прокаин, хинин, натрий, триэтаноламин или цинк.

[0083] Изобретение также относится к способам введения гетерологичного белка или пептида млекопитающему, включающим введение млекопитающему РНК репликона, описанного в настоящем изобретении, который кодирует гетерологичный белок или пептид, и где гетерологичный белок или пептид экспрессируется в организме млекопитающего. Способ обеспечивает введение гетерологичного белка или пептида млекопитающему с более низким иммунным ответом у млекопитающего против введения "голого" гетерологичного белка и пептида или отсутствием такого иммунного ответа.

Варианты осуществления

[0084] Вариант осуществления 1 представляет собой РНК репликон, включающий:

последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид;

5' и 3'-нетранслируемые области альфавируса;

последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, происходящие из неструктурных белков nsP1, nsP2 и nsP4 альфавируса Нового Света; и

последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, происходящую из макродомена nsP3 альфавируса;

последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, происходящую из центрального домена nsP3 альфавируса; и

последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса, включающего

a. аминокислотную последовательность, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света; или

b. аминокислотную последовательность, включающую часть, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, и часть, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света.

[0085] Вариант осуществления 2 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 1, где макродомен nsP3 альфавируса и центральный домен nsP3 альфавируса происходят из альфавируса Нового Света.

[0086] Вариант осуществления 3 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 1, где макродомен nsP3 альфавируса и центральный домен nsP3 альфавируса происходят из альфавируса Старого Света.

[0087] Вариант осуществления 4 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-3, где гипервариабельный домен nsP3 альфавируса включает аминокислотную последовательность, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света.

[0088] Вариант осуществления 5 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-4, где альфавирус Старого Света выбран из группы, состоящей из CHIKV, SINV и SFV.

[0089] Вариант осуществления 6 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-5, где альфавирус Нового Света является вирусом венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV).

[0090] Вариант осуществления 7 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-5, где альфавирус Нового Света является вирусом восточного энцефалита лошадей (EEEV).

[0091] Вариант осуществления 8 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-5, где альфавирус Нового Света выбран из группы, состоящей из: вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вируса западного энцефалита лошадей (WEEV) и вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV).

[0092] Вариант осуществления 9 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-8, где альфавирус Старого Света выбран из группы, состоящей из вируса Синдбис (SINV), вируса Чикунгунья (CHIKV), вируса леса Семлики (SFV), вируса Росс-Ривер (RRV), вируса Сагияма (SAGV), вируса Гета (GETV), вируса Мидделбург (MIDV), вируса Бебару (BEBV), вируса О'Ньонг-ньонга (ONNV), Ндуму (NDUV) и вируса леса Барма (BFV).

[0093] Вариант осуществления 10 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-9, где часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает мотив, выбранный из группы, состоящей из FGDF (SEQ ID NO: 18) и FGSF (SEQ ID NO: 19).

[0094] Вариант осуществления 11 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-10, где часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает повтор, выбранный из группы, состоящей из повтора FGDF/FGDF (SEQ ID NO: 20), повтора FGSF/FGSF (SEQ ID NO: 21), повтора FGDF/FGSF (SEQ ID NO: 22) и повтора FGSF/FGDF (SEQ ID NO: 23); и где дополнительно повторяющиеся последовательности разделены по меньшей мере 10 и не больше чем 25 аминокислотами.

[0095] Вариант осуществления 12 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 11, где повторяющиеся последовательность отделена аминокислотной последовательностью, полученной из группы, состоящей из NEGEIESLSSELLT (SEQ ID NO: 6), SDGEIDELSRRVTTESEPVL (SEQ ID NO: 7) и DEHEVDALASGIT (SEQ ID NO: 8).

[0096] Вариант осуществления 13 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-12, где часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает:

аминокислоты 479-482 или 497-500, или 479-500, или 335-517 из HVD nsP3 CHIKV; или

аминокислоты 451-454 или 468-471, или 451-471 из HVD nsP3 SFV; или

аминокислоты 490-493 или 513-516, или 490-516, или 335-538 из HVD nsP3 SINV.

[0097] Вариант осуществления 14 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-12, где часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает:

аминокислоты 479-500 или 335-517 из HVD nsP3 CHIKV; или

аминокислоты 451-471 из HVD nsP3 SFV; или

аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV.

[0098] Вариант осуществления 15 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 13, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домено альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 478-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV.

[0099] Вариант осуществления 16 представляет собой РНК репликон варианта

осуществления 13, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 478-545 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV.

[0100] Вариант осуществления 17 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 13, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 335-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV.

[0101] Вариант осуществления 18 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 14, где альфавирусом Старого Света является CHIKV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 335-517 из nsP3 CHIKV.

[0102] Вариант осуществления 19 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 14, где альфавирусом Старого Света является SINV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 335-538 из nsP3 SINV.

[0103] Вариант осуществления 20 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 13, где альфавирусом Нового Света является EEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 531-547 из гипервариабельного домена nsP3 EEEV.

[0104] Вариант осуществления 21 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 20, где альфавирусом Нового Света является EEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 531-547 из гипервариабельного домена nsP3 EEEV, и где часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает:

аминокислоты 479-500 из HVD nsP3 CHIKV;

аминокислоты 451-471 из HVD nsP3 SFV; или

аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV.

[0105] Вариант осуществления 22 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 13, где альфавирусом Нового Света является WEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 504-520 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV.

[0106] Вариант осуществления 23 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 22, где альфавирусом Нового Света является WEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 504-520 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV, и где часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает:

аминокислоты 479-500 из HVD nsP3 CHIKV; или

аминокислоты 451-471 из HVD nsP3 SFV; или

аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV.

[0107] Вариант осуществления 24 представляет собой РНК репликон любого из

вариантов осуществления 1-23, дополнительно включающий субгеномный промотор, функционально связанный с последовательность РНК, кодирующей гетерологичный белок, и регулирующий ее трансляцию.

[0108] Вариант осуществления 25 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-24, дополнительно включающий 5'-кэп и 3'-поли-А-хвост.

[0109] Вариант осуществления 26 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-25, где репликон включает положительносмысловую одноцепочечную РНК.

[0110] Вариант осуществления 27 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-26, где репликон включает 10-12 тн РНК и имеет диаметр 30-50 нм.

[0111] Вариант осуществления 28 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-27, где гетерологичный белок является биотерапевтическим белком или пептидом.

[0112] Вариант осуществления 29 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-28, где гетерологичный белок является антителом.

[0113] Вариант осуществления 30 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 1, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и гипервариабельный домен nsP3 альфавируса включает часть, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, не включающую аминокислоты 335-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV, и часть, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включающую аминокислоты 490-493 или 513-516, или 490-516, или 335-538 из HVD nsP3 SINV.

[0114] Вариант осуществления 31 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 30, где часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV.

[0115] Вариант осуществления 32 представляет собой РНК репликон варианта осуществления 30, где альфавирусом Старого Света является SINV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 335-538 из HVD nsP3 SINV.

[0116] Вариант осуществления 33 представляет собой РНК репликон любого из вариантов осуществления 1-32, где последовательность РНК, кодирующая гетерологичный белок или пептид, функционально связана с последовательностью РНК, кодирующей nsP1, nsP2 и nsP4.

[0117] Вариант осуществления 34 представляет собой способ введения гетерологичного белка или пептида млекопитающему, включающий введение млекопитающему РНК репликона любого из вариантов осуществления 1-33, который кодирует гетерологичный белок или пептид, и где гетерологичный белок или пептид экспрессируется у млекопитающего.

[0118] Вариант осуществления 35 представляет собой способ варианта

осуществления 34, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и РНК репликон является репликоном варианта осуществления 14.

[0119] Вариант осуществления 36 представляет собой способ варианта осуществления 34, где РНК репликон является репликоном варианта осуществления 19.

[0120] Вариант осуществления 37 представляет собой способ варианта осуществления 34, где РНК репликон является репликоном варианта осуществления 22.

[0121] Вариант осуществления 38 представляет собой способ варианта осуществления 34, где РНК репликон является репликоном варианта осуществления 25.

[0122] Вариант осуществления 39 представляет собой РНК репликон, включающий:

последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид;

последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, происходящие из неструктурных белков nsP1, nsP2 и nsP4 альфавируса Нового Света; и

последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, происходящую из белка nsP3 альфавируса Старого Света, и где первых 1-6 аминокислот на N-концевой и/или С-концевой стороне белка nsP3 происходят из последовательности альфавируса Нового Света.

[0123] Вариант осуществления 40 представляет собой РНК репликон альфавируса, включающий, в порядке от 5' до 3'-конца:

(1) 5'-нетранслируемую последовательность альфавируса, направляющую репликацию репликона альфавируса;

(2) последовательность РНК, кодирующую альфавирусные неструктурные белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4;

(3) последовательность субгеномного промотора альфавируса,

(4) последовательность РНК, кодирующую один или более гетерологичных белков или пептидов, и

(5) 3'-нетранслируемую последовательность альфавируса,

где nsP1, nsP2 и nsP4 происходят из одного или более альфавирусов Нового Света, и

nsP3 включает, в порядке от N-конца к С-концу, макродомен, центральный домен и гипервариабельный домен (HVD), где:

макродомен и центральный домен происходят из одного или более альфавирусов Нового Света и/или альфавирусов Старого Света; и

HVD происходит из альфавируса Старого Света, или HVD включает часть HVD из альфавируса Нового Света и часть HVD из альфавируса Старого Света.

[0124] Вариант осуществления 41 представляет собой РНК репликон альфавируса варианта осуществления 40, где nsP1, nsP2 и nsP4 происходят из одного или более альфавирусов Нового Света, выбранных из группы, состоящей из вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вируса западного энцефалита лошадей (WEEV) и вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV).

[0125] Вариант осуществления 42 представляет собой РНК репликон альфавируса варианта осуществления 40, где nsP1, nsP2 и nsP4 происходят из вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV).

[0126] Вариант осуществления 43 представляет собой РНК репликон альфавируса любого из вариантов осуществления 40-42, где альфавирус Старого Света выбран из группы, состоящей из вируса Синдбис (SINV), вируса Чикунгунья (CHIKV), вируса леса Семлики (SFV), вируса Росс-Ривер (RRV), вируса Сагияма (SAGV), вируса Гета (GETV), вируса Мидделбург (MIDV), вируса Бебару (BEBV), вируса О'Ньонг-ньонг (ONNV), Ндуму (NDUV) и вируса леса Барма (BFV).

[0127] Вариант осуществления 44 представляет собой РНК репликон альфавируса варианта осуществления 43, где альфавирус Старого Света является вирусом Синдбис (SINV), вирусом Чикунгунья (CHIKV) или вирусом леса Семлики (SFV).

[0128] Вариант осуществления 45 представляет собой РНК репликон альфавируса любого из вариантов осуществления 40-44, где макродомен и центральный домен происходят из одного или более альфавирусов Старого Света.

[0129] Вариант осуществления 46 представляет собой РНК репликон альфавируса любого из вариантов осуществления 40-44, где макродомен и центральный домен происходят из одного или более альфавирусов Нового Света.

[0130] Вариант осуществления 47 представляет собой РНК репликон альфавируса варианта осуществления 40, где nsP1, nsP2 и nsP4, макродомен и центральный домен происходят из вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), и HVD включает часть HVD из VEEV и часть HVD из альфавируса Старого Света, выбранного из группы, состоящей из вируса Синдбис (SINV), вируса Чикунгунья (CHIKV) и вируса леса Семлики (SFV).

[0131] Вариант осуществления 48 представляет собой РНК репликон альфавируса варианта осуществления 47, где HVD включает HVD из VEEV, за исключением того, что аминокислотные остатки 335-538 из nsP3 VEEV заменены аминокислотными остатками 335-538 из nsP3 SINV.

[0132] Вариант осуществления 49 представляет собой РНК репликон альфавируса варианта осуществления 47, где HVD включает HVD из VEEV, за исключением того, что аминокислотные остатки 335-518 из nsP3 VEEV заменены аминокислотными остатками 335-517 из nsP3 CHIKV.

Пример 1 - Иммуногенность репликона на основе VEEV

[0133] Репликон на основе альфавируса VEEV, кодирующий мутантный nsP3, был сконструирован путем замены нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислоты 335-518 nsP3 VEEV, нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислоты 335-517 nsP3 Чикунгунья (CHIKV), с получением репликона на основе VEEV, экспрессирующего химерный nsP3 VEEV/CHIKV (SEQ ID NO: 30). Такая замена приводила к удалению первого мотива повторяющейся последовательности из VEEV и его замене повторяющейся последовательностью FGDF/FGDF (SEQ ID NO: 20) из генома

CHIKV (по аминокислотам 479-482 и 497-500). В параллельном эксперименте аминокислоты 335-538 nsP3 VEEV (область HVD) заменяли аминокислотами 335-538 из nsP3 вируса Синдбис (SINV) (область HVD) с получением репликона, кодирующего химерный nsP3 VEEV/SINV (SEQ ID NO: 31) (см. Фигуры 2 и 7). Такая замена приводила к удалению повторяющейся последовательности из VEEV и ее замене повторяющейся последовательностью FGSF/FGSF (SEQ ID NO: 21) из SINV. Репликоны, содержащие nsP3 WT или химерный nsP3 VEEV/CHIKV или VEEV/SINV и экспрессирующие в качестве репортера красную люциферазу светляка (rFF) с субгеномной РНК (SGIα-rFF), доставляли в клетки BHK-21 с помощью электропорации в тройной повторности. После электропорации часть клеток сеяли в одну лунку 6-луночного планшета и одну лунку 96-луночного планшета и оставляли для восстановления на 20 часов. Электропорированные клетки окрашивали на присутствие дцРНК и исследовали с помощью проточной цитометрии для определения частоты клеток, положительных на дцРНК, в качестве показателя амплификации репликона. Репликоны, содержащие мутантный nsP3, как было обнаружено, реплицировались на том же уровне, что и репликон, содержащий (Фигура 2B) nsP3WT. При анализе на люциферазную активность между репликонами, содержащими WT или указанные мутантные формы nsP3, никакого различия не наблюдали (Фигура 2C).

Пример 2 - Экспрессия гетерологичного белка с репликона

[0134] В данном примере исследовали экспрессию in vivo рекомбинантной люциферазы светляка (rFF) с репликонов (Пример 1), кодирующих мутантный nsP3, как описано на Фигуре 2A. Один или десять микрограммов РНК репликона в растворе хлорида натрия вводили внутримышечно (в/м) в четырехглавую мышцу мышей BALB/c. В указанные точки времени люциферазную активность мониторировали in vivo при использовании коммерческой системы визуализации in vivo и регистрировали как общий поток (Фигуры 3A и 3B). Данные показывают, что репликоны, экспрессирующие мутантные формы nsP3, демонстрируют аналогичные уровни люциферазной активности in vivo по сравнению с репликоном, содержащим nsP3 дикого типа из VEEV.

Пример 3 - Иммуногенность

[0135] В данном примере исследовали иммуногенность репликона на основе VEEV, кодирующего химерную форму nsP3 VEEV/CHIKV (из Примера 1), в сравнении с иммуногенностью репликона с nsP3 VEEV дикого типа (WT). Каждый репликон кодировал и экспрессировал гемагглютинин (HA) вируса гриппа штамма H5N1 в качестве гетерологичного белка. По 2,0 мкг или 0,2 мкг РНК в растворе хлорида натрия доставляли внутримышечно в четырехглавую мышцу мышей BALB/c в день 0 и делали повторную инъекцию того же РНК репликона в такой же дозе в день 28. Через две недели после бустерной инъекции (день 42 после примирования) собирали селезенку и сыворотку. Сыворотку исследовали на HA-специфичные антитела с помощью ИФА (Фигура 4). Данные показывают, что репликоны, кодирующие химерный nsP3 VEEV/CHIKV, демонстрировали значимо сниженные титры HA-специфичных IgG по сравнению с

репликоном с nsP3 дикого типа.

[0136] Напротив, анализ короткоживущих эффекторных эффекторных CD8+ Т-клеток и эффекторных CD8+ Т-клеток-предшественников памяти не показал различий в частоте HA-специфичных клеток между различными протестированными репликонами (Фигуры 5A и 5B). На Фигуре 5A показана аналогичная частота HA-специфичных короткоживущих эффекторных CD8+ Т-клеток между РНК репликонами nsP3 дикого типа, nsP3 VEEV/SINV и nsP3 VEEV/CHIKV. На Фигуре 5B показан аналогичный результат для эффекторных CD8+ Т-клеток памяти.

[0137] Для специалиста в данной области будет очевидно, что различные замены и модификации могут быть внесены в изобретение, раскрытое в настоящем изобретении, без отступления от объема и сущности изобретения.

[0138] Все патенты и публикации, указанные в описании, отражают уровень специалистов в области, к которой относится изобретение.

[0139] Изобретение, иллюстративно описанное в настоящем изобретении, может быть подходящим образом реализовано на практике при отсутствии какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, которые конкретно не раскрыты в настоящем изобретении. Таким образом, например, в каждом случае в настоящем описании любой из терминов "включающий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменен любым из двух других терминов. Термины и выражения, которые были использованы, используются в качестве описательных терминов, а не ограничивающих, и при этом нет намерения, чтобы при использовании таких терминов и выражений исключались какие-либо эквиваленты показанных и описанных признаков или их частей, и при этом нужно понимать, что в рамках объема заявленного изобретения возможны различные модификации. Кроме того, если признаки или аспекты изобретения описаны посредством групп Маркуша, специалистам в данной области техники будет понятно, что изобретение также описано на примерах любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша. Например, если X описан как выбранный из группы, состоящей из брома, хлора и иода, будут полностью описаны пункты формулы изобретения, где X является бромом, и пункты формулы изобретения, где X является бромом и хлором. Другие варианты осуществления находятся в рамках следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. РНК репликон, включающий:

последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид;

5' и 3'-нетранслируемые области альфавируса;

последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, происходящие из неструктурных белков nsP1, nsP2 и nsP4 альфавируса Нового Света; и

последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, происходящую из макродомена альфавируса nsP3;

последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, происходящую из центрального домена nsP3 альфавируса; и

последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 (HVD) альфавируса, включающую:

a. аминокислотную последовательность, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света; или

b. аминокислотную последовательность, включающую часть, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, и часть, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света.

2. РНК репликон альфавируса, включающий, в порядке от 5' к 3'-концу:

(1) 5'-нетранслируемую последовательность альфавируса для направления репликации альфавирусного репликона;

(2) последовательность РНК, кодирующую альфавирусные неструктурные белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4;

(3) последовательность субгеномного промотора альфавируса,

(4) последовательность РНК, кодирующую один или более гетерологичных белков или пептидов, и

(5) 3'-нетранслируемая последовательность альфавируса,

где nsP1, nsP2 и nsP4 происходят из одного или более альфавирусов Нового Света, и

nsP3 включает, в порядке от N-конца к С-концу, макродомен nsP3 альфавируса, центральный домен nsP3 альфавируса и гипервариабельный домен (HVD) nsP3 альфавируса, где:

макродомен и центральный домен происходят из одного или более альфавирусов Нового Света и/или альфавирусов Старого Света; и

HVD включает HVD альфавируса Старого Света, или HVD включает часть HVD из альфавируса Нового Света и часть HVD из альфавируса Старого Света.

3. РНК репликон по п.1 или п.2, где макродомен nsP3 альфавируса и центральный домен nsP3 альфавируса происходят из альфавируса Нового Света.

4. РНК репликон по п.1 или п.2, где макродомен nsP3 альфавируса и центральный домен nsP3 альфавируса происходят из альфавируса Старого Света.

5. РНК репликон по любому из пп. 1-4, где nsP3 альфавируса включает

аминокислотную последовательность гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света или аминокислотную последовательность, происходящую из него.

6. РНК репликон по любому из пп. 1-5, где альфавирус Старого Света выбран из группы, состоящей из CHIKV, SINV и SFV.

7. РНК репликон по любому из пп. 1-6, где альфавирус Нового Света является вирусом венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV).

8. РНК репликон по любому из пп. 1-6, где альфавирус Нового Света выбран из группы, состоящей из вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вируса западного энцефалита лошадей (WEEV) и вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV).

9. РНК репликон по п.8, где альфавирус Старого Света выбран из группы, состоящей из вируса Синдбис (SINV), вируса Чикунгунья (CHIKV), вируса леса Семлики (SFV), вируса Росс-Ривер (RRV), вируса Сагияма (SAGV), вируса Гета (GETV), вируса Мидделбург (MIDV), вируса Бебару (BEBV), вируса О'Ньонг-ньонг (ONNV), Ндуму (NDUV) и вируса леса Барма (BFV).

10. РНК репликон по любому из пп. 1-9, где гипервариабельный домен включает часть, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, содержащего мотив, выбранный из группы, состоящей из FGDF (SEQ ID NO: 18) и FGSF (SEQ ID NO: 19).

11. РНК репликон по п.10, где часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает повтор, выбранный из группы, состоящей из повтора FGDF/FGDF (SEQ ID NO: 20), повтора FGSF/FGSF (SEQ ID NO: 21), повтора FGDF/FGSF (SEQ ID NO: 22) и повтора FGSF/FGDF (SEQ ID NO: 23); и где дополнительно повторяющиеся последовательности разделены по меньшей мере 10 и не больше чем 25 аминокислотами.

12. РНК репликон по п.11, где повторяющаяся последовательность отделена аминокислотной последовательностью, полученной из группы, состоящей из NEGEIESLSSELLT (SEQ ID NO: 6), SDGEIDELSRRVTTESEPVL (SEQ ID NO: 7) и DEHEVDALASGIT (SEQ ID NO: 8).

13. РНК репликон по п.10, где часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает:

a. аминокислоты 479-482 или 497-500, или 479-500, или 335-517 из HVD nsP3 CHIKV; или

b. аминокислоты 451-454 или 468-471, или 451-471 из HVD nsP3 SFV; или

c. аминокислоты 490-493 или 513-516, или 490-516, или 335-538 из HVD nsP3 SINV.

14. РНК репликон по п.11, где часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает:

a. аминокислоты 479-500 или 335-517 из HVD nsP3 CHIKV; или

b. аминокислоты 451-471 из HVD nsP3 SFV; или

c. аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV.

15. РНК репликон по любому из пп. 10-14, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 478-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV.

16. РНК репликон по любому из пп. 10-14, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислот 478-545 из VEEV nsP3 гипервариабельный домен.

17. РНК репликон по любому из пп. 1-14, где альфавирус Нового Света является VEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 335-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV.

18. РНК репликон по п.17, где альфавирусом Старого Света является CHIKV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 335-517 из CHIKV.

19. РНК репликон по п.17, где альфавирусом Старого Света является SINV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 335-538 из SINV.

20. РНК репликон по любому из пп. 10-14, где альфавирусом Нового Света является EEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 531-547 из гипервариабельного домена nsP3 EEEV.

21. РНК репликон по п.20, где альфавирусом Нового Света является EEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 531-547 из гипервариабельного домена nsP3 EEEV, и где часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает:

a. аминокислоты 479-500 из HVD nsP3 CHIKV;

b. аминокислоты 451-471 из HVD nsP3 SFV; или

c. аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV.

22. РНК репликон по любому из пп. 10-14, где альфавирусом Нового Света является WEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 504-520 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV.

23. РНК репликон по п.22, где альфавирусом Нового Света является WEEV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Нового Света, не включает аминокислоты 504-520 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV, и где часть, происходящая из гипервариабельного домена альфавируса Старого Света, включает:

a. аминокислоты 479-500 из HVD nsP3 CHIKV;

b. аминокислоты 451-471 из HVD nsP3 SFV; или

c. аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV.

24. РНК репликон по любому из пп. 1-23, дополнительно включающий субгеномный промотор, функционально связанный с последовательностью РНК, кодирующей гетерологичный белок, и регулирующий ее трансляцию.

25. РНК репликон по любому из пп. 1-24, дополнительно включающий 5'-кэп и 3'-поли-А-хвост.

26. РНК репликон по любому из пп. 1-25, где репликон включает положительносмысловую одноцепочечную РНК.

27. РНК репликон по любому из пп. 1-26, где репликон включает 10-12 тн РНК и имеет диаметр 30-50 нм.

28. РНК репликон по любому из пп. 1-27, где гетерологичный белок является биотерапевтическим белком или пептидом.

29. РНК репликон по любому из пп. 1-28, где гетерологичный белок является антителом.

30. РНК репликон по п.1 или 2, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и HVD включает часть, полученную из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Нового Света, не включающую аминокислоты 335-518 из гипервариабельного домена nsP3 VEEV, и часть, происходящую из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, содержащую аминокислоты 490-493 или 513-516, или 490-516, или 335-538 из HVD nsP3 SINV.

31. РНК репликон по п.30, где часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 490-516 из HVD nsP3 SINV.

32. РНК репликон по п.30, где альфавирусом Старого Света является SINV, и часть, происходящая из гипервариабельного домена nsP3 альфавируса Старого Света, включает аминокислоты 335-538 из HVD nsP3 SINV.

33. РНК репликон по п.1 или 2, где последовательность РНК, кодирующая гетерологичный белок или пептид, функционально связана с последовательностью РНК, кодирующей nsP1, nsP2 и nsP4.

34. Способ введения гетерологичного белка или пептида млекопитающему, включающий введение млекопитающему РНК репликона по любому из пп. 1-33, кодирующего гетерологичный белок или пептид, и где гетерологичный белок или пептид экспрессируется у млекопитающего.

35. Способ по п.34, где альфавирусом Нового Света является VEEV, и РНК репликон является репликоном по п.14.

36. Способ по п.34, где РНК репликон является репликоном по п.19.

37. Способ по п.34, где РНК репликон является репликоном по п.22.

38. Способ по п.34, где РНК репликон является репликоном по п.25.

39. РНК репликон, включающий:

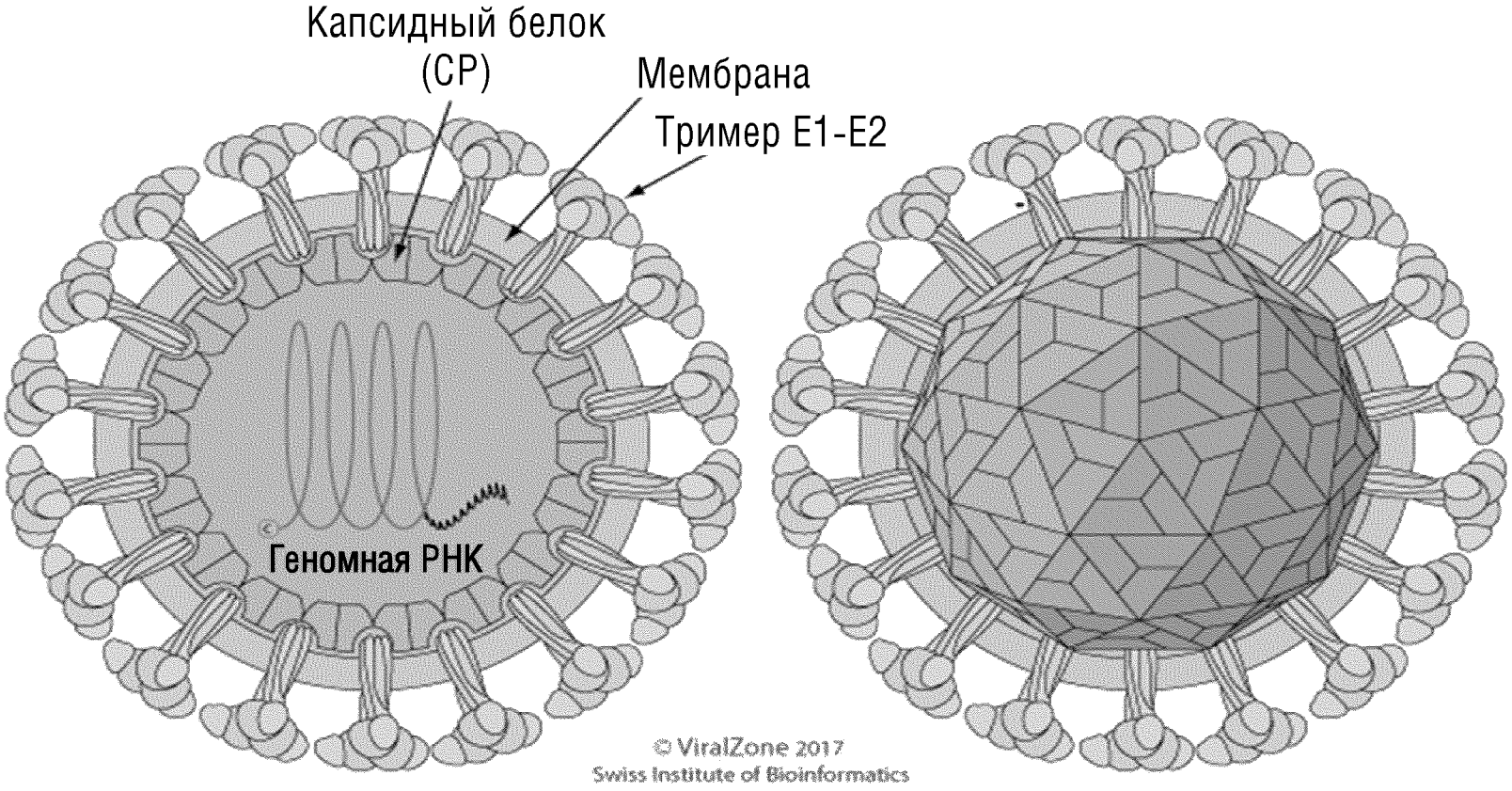
последовательность РНК, кодирующую гетерологичный белок или пептид;

последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, происходящие из неструктурных белков nsP1, nsP2 и nsP4 альфавируса Нового Света; и

последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из белка nsP3 альфавируса Старого Света, и где первых 1-6 аминокислот на N-концевой и/или С-концевой стороне белка nsP3, происходят из последовательности альфавируса Нового Света.

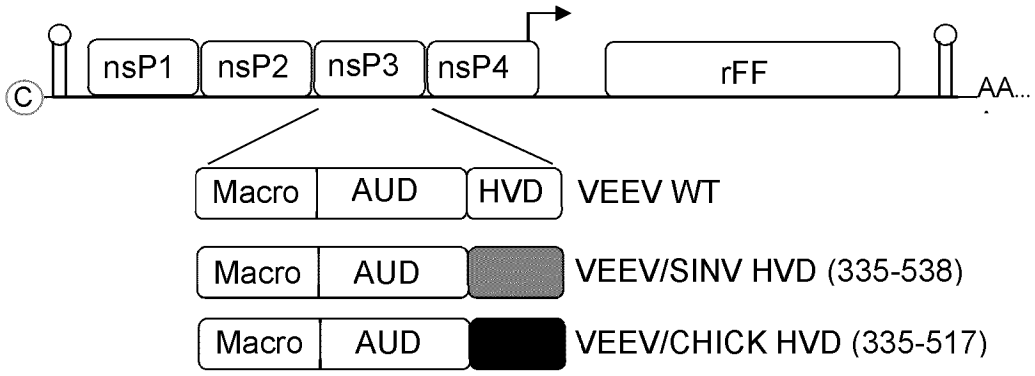
По доверенности

ФИГ.1

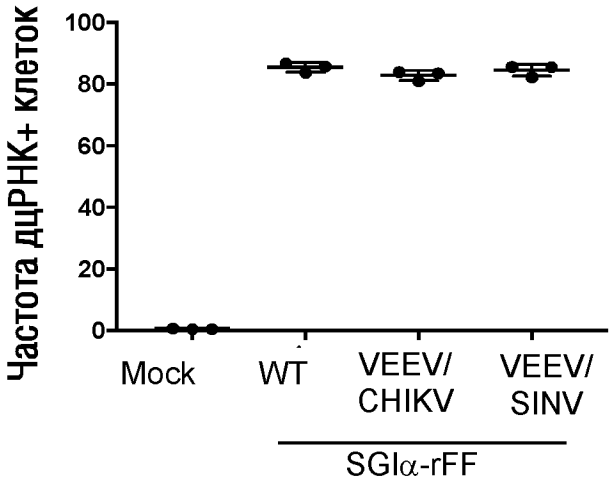

Капсидный белок
(CP)
Мембрана
Тример E1-E2
Геномная РНК
© ViralZone 2017
Swiss Institute of Bioinformatics

567968

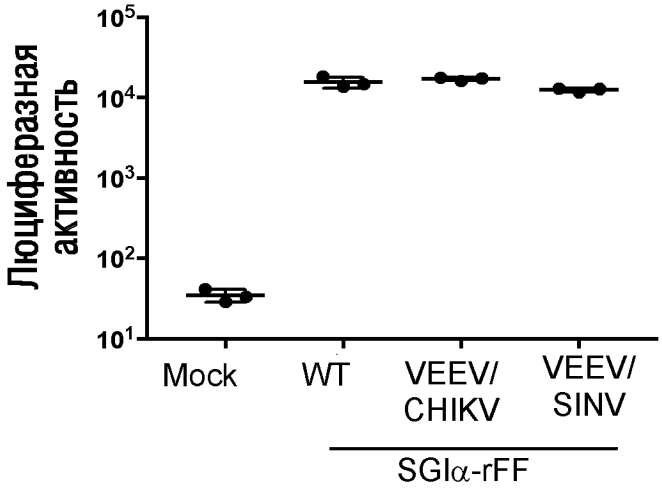
ФИГ.2А



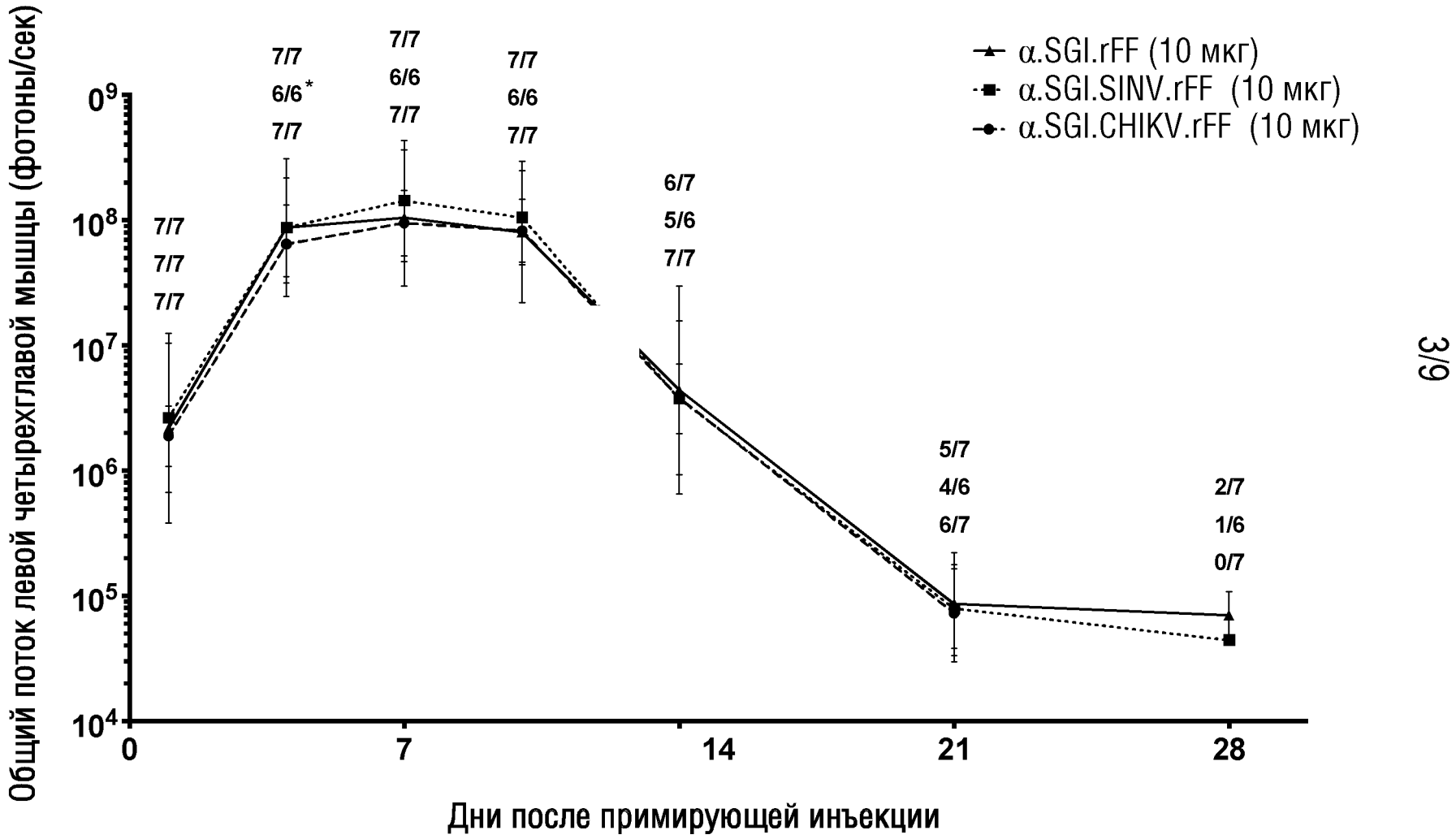
ФИГ.2В



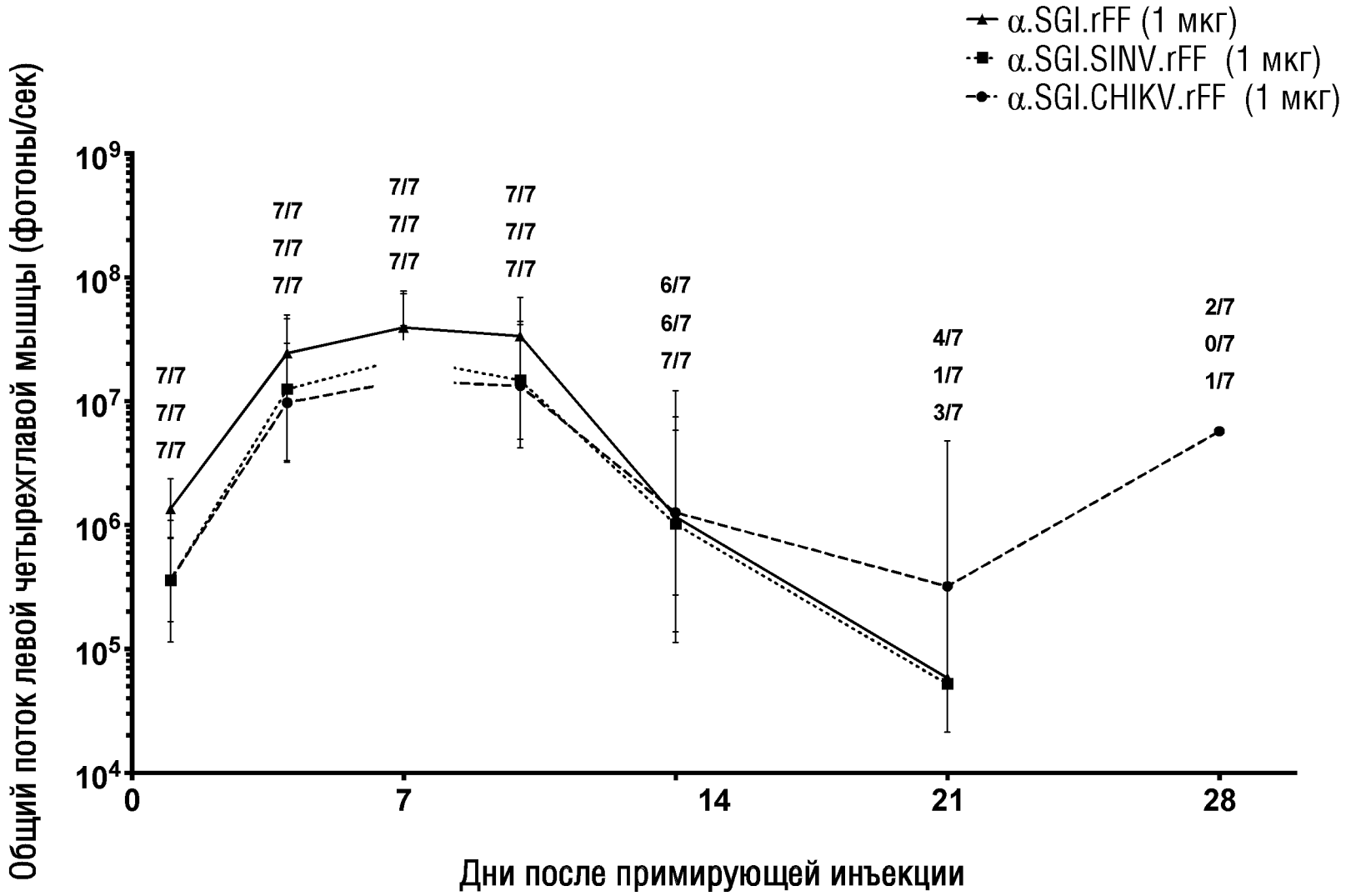
ФИГ.2С



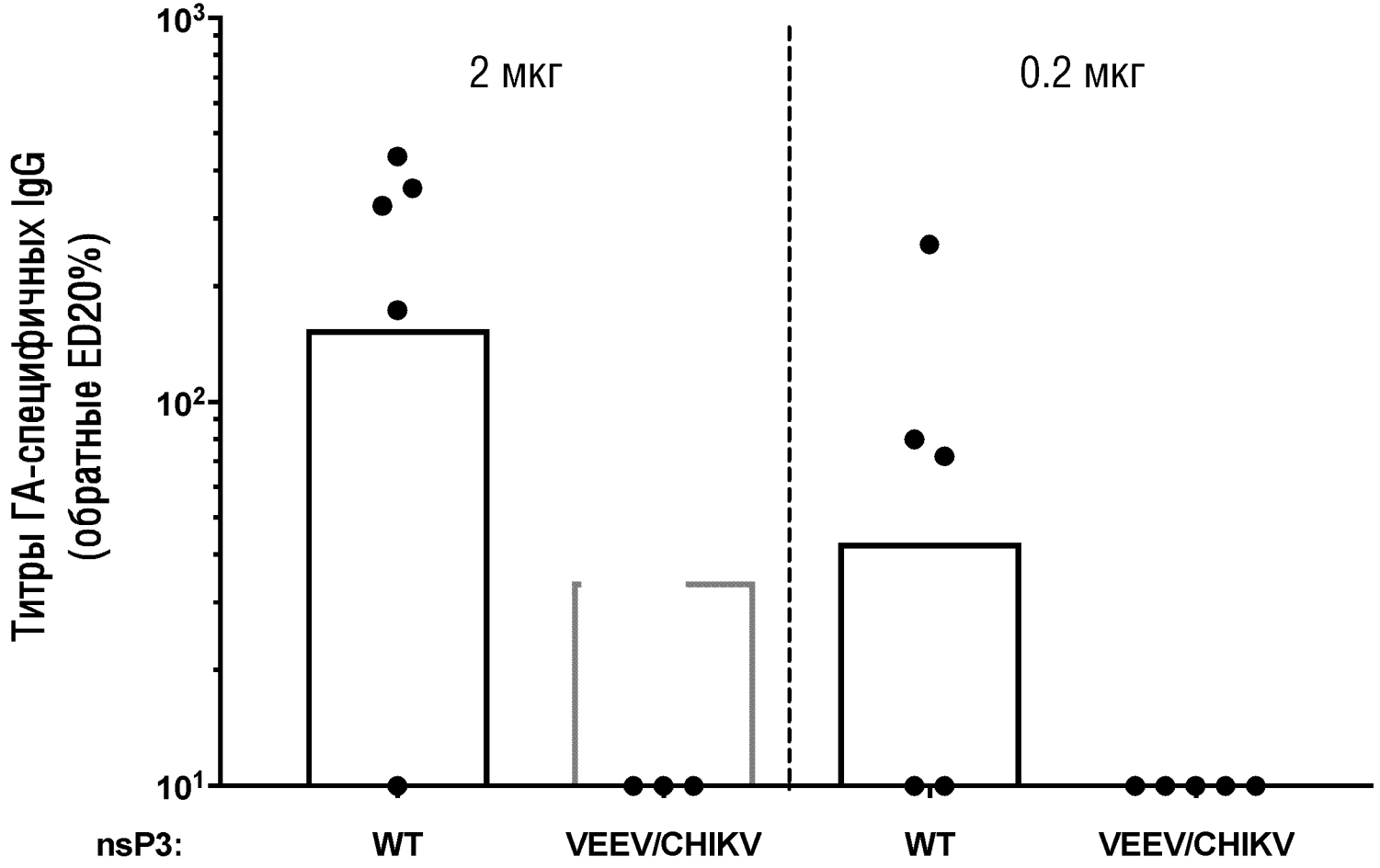
ФИГ.3А


α.SGI.rFF (10 мкг)
α.SGI.SINV.rFF (10 мкг)
α.SGI.CHIKV.rFF (10 мкг)
Общий поток левой четырехглавой мышцы (фотоны/сек)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
7/7
7/7
7/7
7/7
6/6*
7/7
7/7
6/6
7/7
7/7
6/6
7/7
6/7
5/6
7/7
5/7
4/6
6/7
2/7
1/6
0/7
0
7
14
21
28
Дни после примирующей инъекции

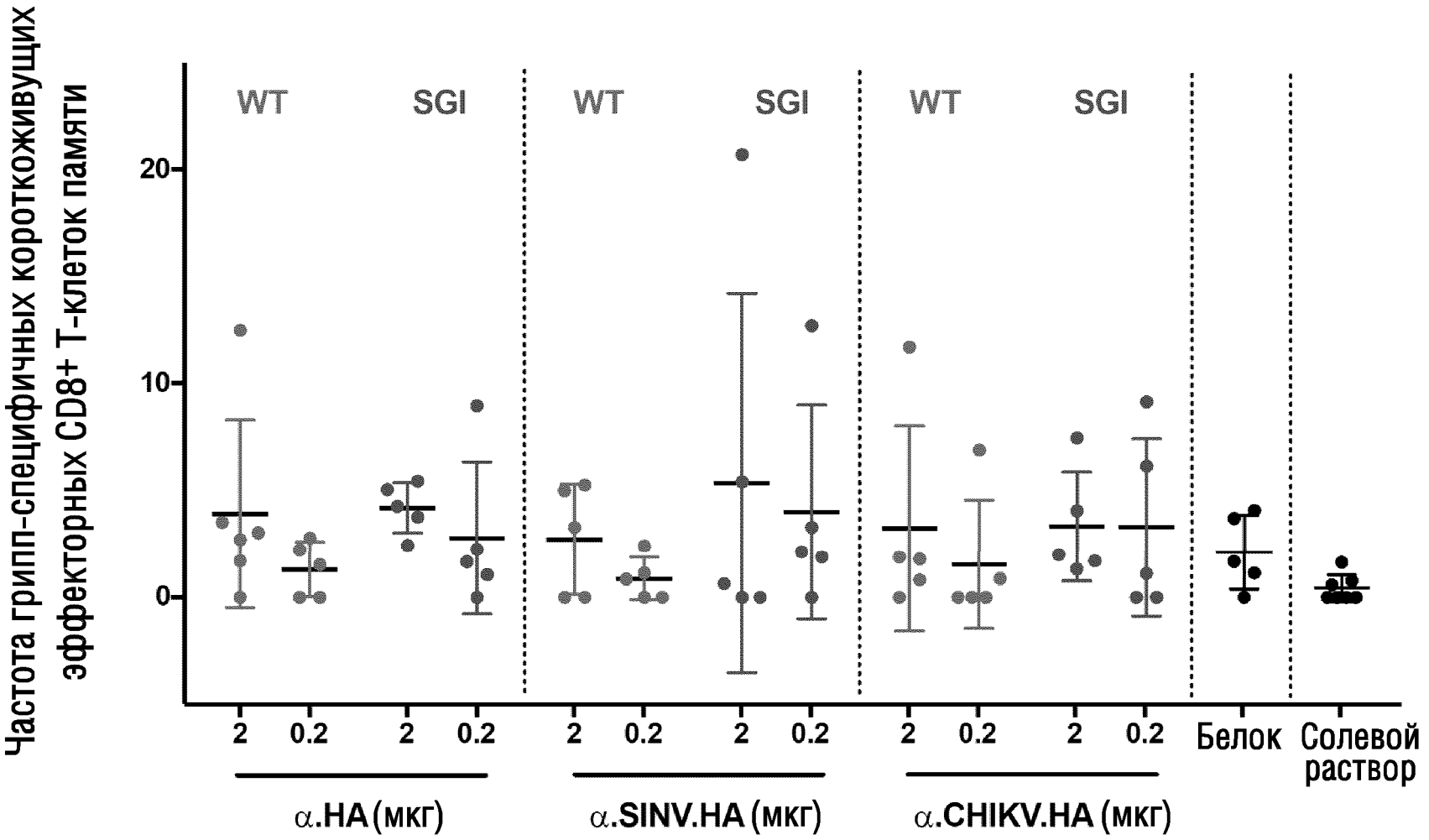
ФИГ.3В


α.SGI.rFF (1 мкг)
α.SGI.SINV.rFF (1 мкг)
α.SGI.CHIKV.rFF (1 мкг)
Общий поток левой четырехглавой мышцы (фотоны/сек)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
7/7 7/7 7/7
7/7 7/7 7/7
7/7 7/7 7/7
7/7 7/7 7/7
6/7 6/7 7/7
4/7 1/7 3/7
2/7 0/7 1/7
0
7
14
21
28
Дни после примирующей инъекции

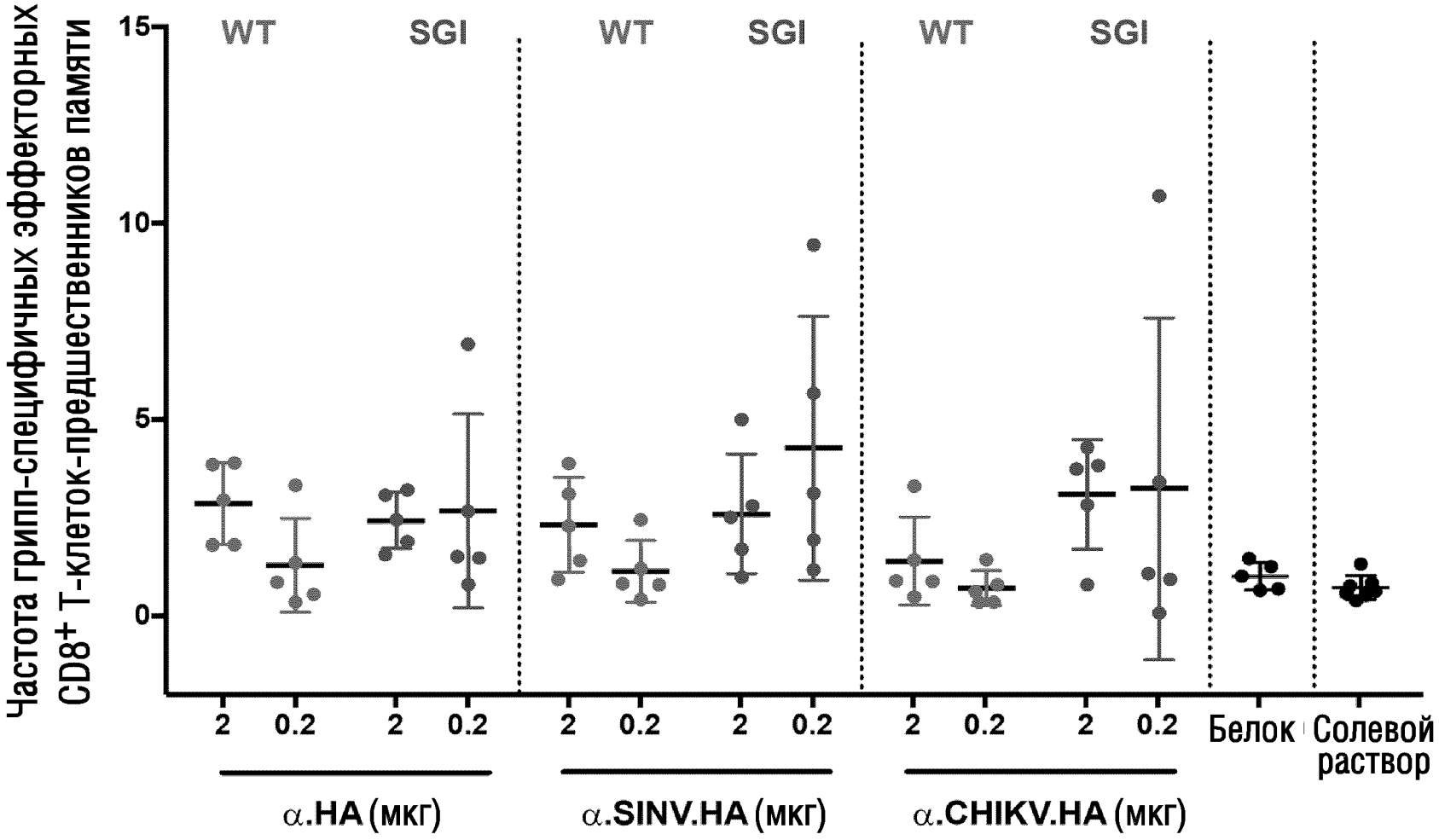
ФИГ.4


Титры ГА-специфичных IgG
(обратные ED20%)
10^3
10^2
10^1
2 мкг
0.2 мкг
nsP3:
WT
VEEV/CHIKV
WT
VEEV/CHIKV

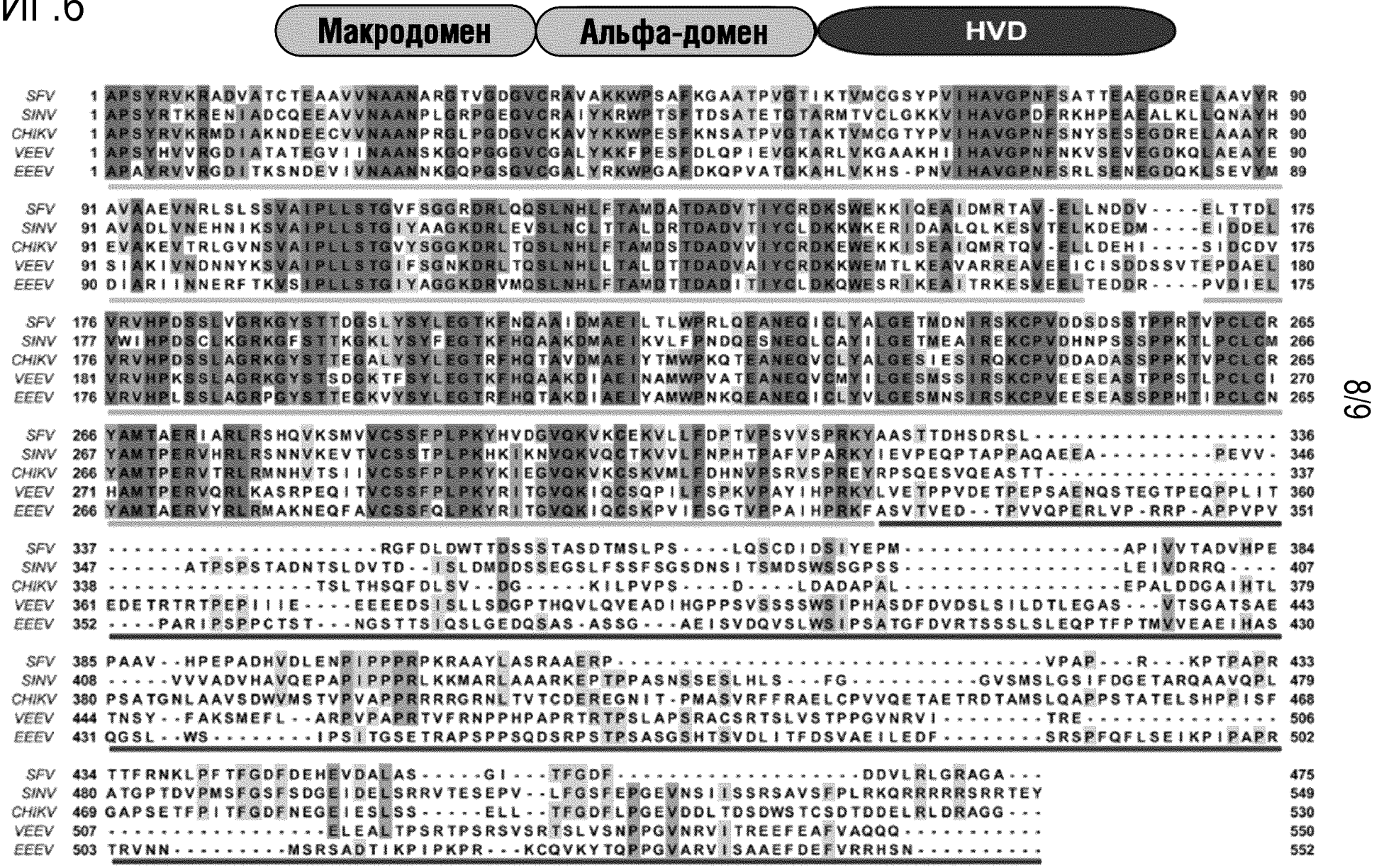
ФИГ.5А


Частота грипп-специфичных короткоживущих эффекторных CD8+ Т-клеток памяти
WT
SGI
WT
SGI
WT
SGI
20
10
0
2
0.2
2
0.2
2
0.2
2
0.2
2
0.2
2
0.2
Белок
Солевой раствор
α.HA (мкг)
α.SINV.HA (мкг)
α.CHIKV.HA (мкг)

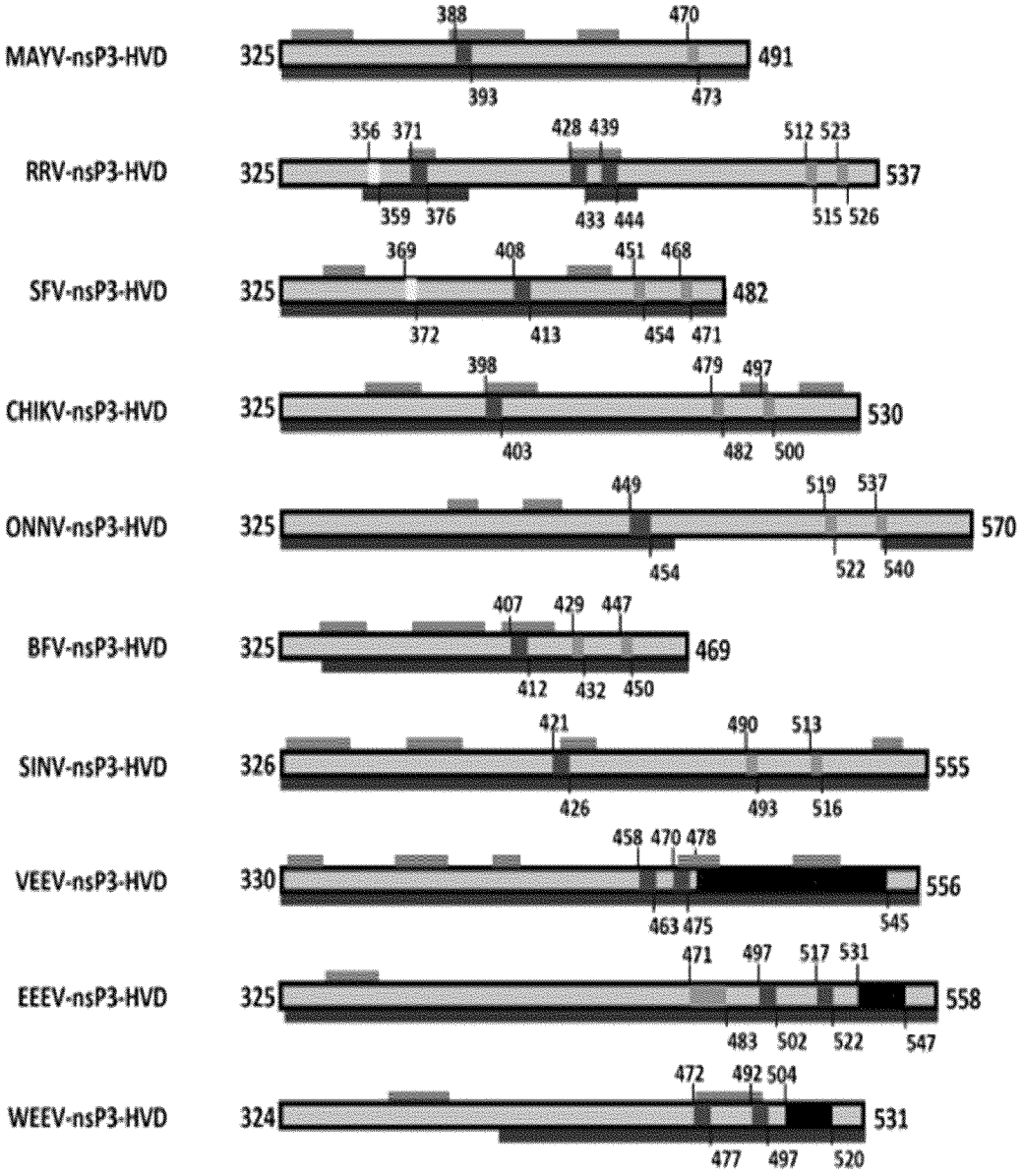
ФИГ.5В


Частота грипп-специфичных эффекторных CD8+ Т-клеток-предшественников памяти
15
10
5
0
WT
SGI
WT
SGI
WT
SGI
2
0.2
2
0.2
2
0.2
2
0.2
2
0.2
2
0.2
Белок
Солевой раствор
α.HA (мкг)
α.SINV.HA (мкг)
α.CHIKV.HA (мкг)

ФИГ.6


Макродомен
Альфа-домен
HVD
SFV 1 APSYRVKRADVATCTEAAVVNAANARGTVGDGVCRAVAKKWPSAFKGAATPVGTIKTVMCGSYPVIHAVGPNFSATTEAEGDRELAAVYR 90
SINV 1 APSYRTKRENIADCQEEAVVNAANPLGRPGEGVCRAIYKRWPTSFTDSATETGTARMTVCLGKKVIHAVGPDFRKHPEAEALKLLQNAYH 90
CHIKV 1 APSYRVKRMDIAKNDEECVVNAANPRGLPGDGVCKAVYKKWPESFKNSATPVGTAKTVMCGTYPVIHAVGPNFSNYSESEGDRELAAAYR 90
VEEV 1 APSYHVVRGDIATATEGVIINAANSKGQPGGGVCGALYKKFPESFDLQPIEVGKARLVKGAAKHIIHAVGPNFNKVSEVEGDKQLAEAYE 90
EEEV 1 APAYRVVRGDITKSNDEVIVNAANNKGQPGSGVCGALYRKWPGAFDKQPVATGKAHLVKHS-PNVIHAVGPNFSRLSENEGDQKLSEVYM 89
SFV 91 AVAAEVNRLSLSSVAIPLLSTGVFSGGRDRLQQSLNHLFTAMDATDADVTIYCRDKSWEKKIQEAIDMRTAV-ELLNDDV----ELTTDL 175
SINV 91 AVADLVNEHNIKSVAIPLLSTGIYAAGKDRLEVSLNCLTTALDRTDADVTIYCLDKKWKERIDAALQLKESVTELKDEDM----EIDDEL 176
CHIKV 91 EVAKEVTRLGVNSVAIPLLSTGVYSGGKDRLTQSLNHLFTAMDSTDADVVIYCRDKEWEKKISEAIQMRTQV-ELLDEHI----SIDCDV 175
VEEV 91 SIAKIVNDNNYKSVAIPLLSTGIFSGNKDRLTQSLNHLLTALDTTDADVAIYCRDKKWEMTLKEAVARREAVEEICISDDSSVTEPDAEL 180
EEEV 90 DIARIINNERFTKVSIPLLSTGIYAGGKDRVMQSLNHLFTAMDTTDADITIYCLDKQWESRIKEAITRKESVEELTEDDR----PVDIEL 175
SFV 176 VRVHPDSSLVGRKGYSTTDGSLYSYLEGTKFNQAAIDMAEILTLWPRLQEANEQICLYALGETMDNIRSKCPVDDSDSSTPPRTVPCLCR 265
SINV 177 VWIHPDSCLKGRKGFSTTKGKLYSYFEGTKFHQAAKDMAEIKVLFPNDQESNEQLCAYILGETMEAIREKCPVDHNPSSSPPKTLPCLCM 266
CHIKV 176 VRVHPDSSLAGRKGYSTTEGALYSYLEGTRFHQTAVDMAEIYTMWPKQTEANEQVCLYALGESIESIRQKCPVDDADASSPPKTVPCLCR 265
VEEV 181 VRVHPKSSLAGRKGYSTSDGKTFSYLEGTKFHQAAKDIAEINAMWPVATEANEQVCMYILGESMSSIRSKCPVEESEASTPPSTLPCLCI 270
EEEV 176 VRVHPLSSLAGRPGYSTTEGKVYSYLEGTRFHQTAKDIAEIYAMWPNKQEANEQICLYVLGESMNSIRSKCPVEESEASSPPHTIPCLCN 265
SFV 266 YAMTAERIARLRSHQVKSMVVCSSFPLPKYHVDGVQKVKCEKVLLFDPTVPSVVSPRKYAASTTDHSDRSL---------- 336
SINV 267 YAMTPERVHRLRSNNVKEVTVCSSTPLPKHKIKNVQKVQCTKVVLFNPHTPAFVPARKYIEVPEQPTAPPAQAEEA---------PEVV- 346
CHIKV 266 YAMTPERVTRLRMNHVTSIIVCSSFPLPKYKIEGVQKVKCSKVMLFDHNVPSRVSPREYRPSQESVQEASTT---------- 337
VEEV 271 HAMTPERVQRLKASRPEQITVCSSFPLPKYRITGVQKIQCSQPILFSPKVPAYIHPRKYLVETPPVDETPEPSAENQSTEGTPEQPPLIT 360
EEEV 266 YAMTAERVYRLRMAKNEQFAVCSSFQLPKYRITGVQKIQCSKPVIFSGTVPPAIHPRKFASVTVED--TPVVQPERLVP-RRP-APPVPV 351
SFV 337 ----------RGFDLDWTTDSSSTASDTMSLPS----LQSCDIDSIYEPM----------APIVVTADVHPE 384
SINV 347 ------ATPSPSTADNTSLDVTD--ISLDMDDSSEGSLFSSFSGSDNSITSMDSWSSGPSS----------LEIVDRRQ---- 407
CHIKV 338 ----------TSLTHSQFDLSV--DG-----KILPVPS----D----LDADAPAL----------EPALDDGAIHTL 379
VEEV 361 EDETRTRTPEPIIIE----EEEEDSISLLSDGPTHQVLQVEADIHGPPSVSSSSWSIPHASDFDVDSLSILDTLEGAS---VTSGATSAE 443
EEEV 352 ----PARIPSPPCTST---NGSTTSIQSLGEDQSAS-ASSG---AEISVDQVSLWSIPSATGFDVRTSSSLSLEQPTFPTMVVEAEIHAS 430
SFV 385 PAAV--HPEPADHVDLENPIPPPRPKRAAYLASRAAERP----------VPAP---R---KPTPAPR 433
SINV 408 -----VVVADVHAVQEPAPIPPPRLKKMARLAAARKEPTPPASNSSESLHLS---FG----------GVSMSLGSIFDGETARQAAVQPL 479
CHIKV 380 PSATGNLAAVSDWVMSTVPVAPPRRRRGRNLTVTCDEREGNIT-PMASVRFFRAELCPVVQETAETRDTAMSLQAPPSTATELSHPPISF 468
VEEV 444 TNSY--FAKSMEFL--ARPVPAPRTVFRNPPHPAPRTRTPSLAPSRACSRTSLVSTPPGVNRVI--------TRE---------- 506
EEEV 431 QGSL--WS--------IPSITGSETRAPSPPSQDSRPSTPSASGSHTSVDLITFDSVAEILEDF--------SRSPFQFLSEIKPIPAPR 502
SFV 434 TTFRNKLPFTFGDFDEHEVDALAS-----GI---TFGDF----------DDVLRLGRAGA--- 475
SINV 480 ATGPTDVPMSFGSFSDGEIDELSRRVTESEPV--LFGSFEPGEVNSIISSRSAVSFPLRKQRRRRRSRRTEY 549
CHIKV 469 GAPSETFPITFGDFNEGEIESLSS-----ELL--TFGDFLPGEVDDLTDSDWSTCSDTDDELRLDRAGG--- 530
VEEV 507 ----------ELEALTPSRTPSRSVSRTSLVSNPPGVNRVITREEFEAFVAQQQ---------- 550
EEEV 503 TRVNN---------MSRSADTIKPIPKPR---KCQVKYTQPPGVARVISAAEFDEFVRRHSN---------- 552

ФИГ.7



Низкая сложность

Внутренне неструктурированные области

Сайт связывания G3BP

YXXM

Богатая пролином область

Сайт связывания FXR