

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293394** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.03.29

(22) Дата подачи заявки
2021.05.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИГЕНА КОРОНАВИРУСА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/027,932; 63/034,704; 63/068,936;
63/074,442; 63/125,778**

(32) **2020.05.20; 2020.06.04; 2020.08.21;
2020.09.03; 2020.12.15**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/033490**

(87) **WO 2021/236980 2021.11.25**

(71) Заявитель:

**ФЛАГШИП ПИОНИРИНГ
ИННОВЕЙШНС VI, ЛЛС (US)**

(72) Изобретатель:

**Кахведжян Авак, Де Бур Александра
София, Эшелар Ян Поль Ги Регис,
Плугис Николас Маккартни, Хаджар
Роджер Джозеф, Мелфи Майкл
Донатто, Нельсон Дженифер А. (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены композиции и способы, предусматривающие кольцевые полирибонуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую антиген коронавируса, и композиции и способы, предусматривающие линейные полирибонуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую антиген коронавируса. Представлены композиции и способы, которые связаны с обеспечением образования поликлональных антител, например, с применением раскрытых кольцевых полирибонуклеотидов или раскрытых линейных полирибонуклеотидов.

A1

202293394

202293394

A1

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИГЕНА КОРОНАВИРУСА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в
5 электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей
своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 20 мая 2021 года, называется
51509-020WO6_Sequence_Listing_5.20.21_ST25 и имеет размер 207385 байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Существует острая потребность в вакцинах и терапевтических средствах, которые
являются активными в отношении коронавирусов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом относится к кольцевым полирибонуклеотидам,
содержащим последовательность, кодирующую антиген коронавируса, и к иммуногенным
композициям, содержащим кольцевой полирибонуклеотид. Настоящее изобретение
15 дополнительно относится к способам применения кольцевых полирибонуклеотидов,
содержащих последовательность, кодирующую антиген коронавируса, и иммуногенной
композиции. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды и
иммуногенные композиции по настоящему изобретению применяются в способах
обеспечения образования поликлональных антител. Полученные поликлональные антитела
20 можно применять в способах профилактики у субъектов (например, субъектов,
представляющих собой людей) или способах лечения для субъектов (например, субъектов,
представляющих собой людей), у которых имеется коронавирусная инфекция. Полученные
поликлональные антитела можно вводить субъектам, подверженным высокому риску
воздействия коронавирусной инфекции.

25 Настоящее изобретение также относится к линейным полирибонуклеотидам,
содержащим последовательность, кодирующую последовательность под SEQ ID NO,
выбранным из таблицы 3, и к иммуногенным композициям, содержащим линейный
полирибонуклеотид. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам
применения линейного полирибонуклеотида, содержащего последовательность,
30 кодирующую антиген коронавируса, и иммуногенной композиции, содержащей линейный
полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления линейные
полирибонуклеотиды и иммуногенные композиции по настоящему изобретению
применяются в способах обеспечения образования поликлональных антител. Полученные
поликлональные антитела можно применять в способах профилактики у субъектов

(например, подлежащих лечению субъектов, представляющих собой людей) или способах лечения для субъектов (например, подлежащих лечению субъектов, представляющих собой людей), у которых имеется коронавирусная инфекция. Полученные поликлональные антитела можно вводить подлежащим лечению субъектам, подверженным высокому риску воздействия коронавирусной инфекции.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлена композиция (например, иммуногенная композиция), содержащая (а) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген коронавируса, например, последовательность, выбранную из SEQ ID NO в таблице 1 или таблице 2, или (b) линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO в таблице 3.

В одном варианте осуществления композиция дополнительно содержит плазму крови от субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека (например, животное, отличное от человека, у которого имеется гуманизированная иммунная система), или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта после иммунизации).

В одном варианте осуществления композиция дополнительно содержит плазму крови от животного, отличного от человека (например, животного, отличного от человека, у которого имеется гуманизированная иммунная система), и антиген коронавируса (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, после иммунизации). В одном варианте осуществления композиция дополнительно содержит плазму крови от субъекта, представляющего собой человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой человека, после иммунизации) и антиген коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит В-клетку, отличную от человеческой, содержащую гуманизированный локус гена иммуноглобулина и гуманизированный В-клеточный рецептор, где гуманизированный В-клеточный рецептор связывается с антигеном коронавируса. В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция дополнительно содержат совокупность В-клеток, отличных от человеческих, где В-клетка, отличная от человеческой, из совокупности содержит гуманизированный локус гена иммуноглобулина, где совокупность В-клеток, отличных от человеческих, предусматривает первую В-клетку, которая связывается с первым эпитопом антигена коронавируса, и вторую В-клетку, которая связывается со вторым эпитопом антигена коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления антиген коронавируса получен из бета-коронавируса или его фрагмента или из сарбековируса или его фрагмента. В некоторых

вариантах осуществления антиген коронавируса получен из коронавируса, связанного с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS), или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления антиген коронавируса получен из коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) или его фрагмента, из коронавируса 1
5 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-1) или его фрагмента или из коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления антиген коронавируса представляет собой мембранный белок или его вариант или фрагмент, белок оболочки вируса или его вариант
10 или фрагмент, шиповидный белок вируса или его вариант или фрагмент, нуклеокапсидный белок вируса или его вариант или фрагмент, вспомогательный белок вируса или его вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антиген коронавируса представляет собой рецептор-связывающий домен шиповидного белка или его вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления в шиповидном белке отсутствует сайт расщепления.

В некоторых вариантах осуществления вспомогательный белок коронавируса выбран из
15 группы, состоящей из ORF3a, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF10 или любого их варианта или фрагмента. В некоторых вариантах осуществления антиген коронавируса содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с
20 последовательностью, выбранной из таблицы 1, или последовательности под SEQ ID NO, выбранным из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO, выбранным из таблицы 2.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит совокупность
25 последовательностей, каждая из которых кодирует антиген, и по меньшей мере одна последовательность из совокупности кодирует антиген коронавируса. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит две или больше ORF. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере
30 мере пять последовательностей, каждая из которых кодирует антиген, и по меньшей мере один из антигенов представляет собой антиген коронавируса. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере две ORF, например по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 ORF. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 5 до 20 последовательностей, каждая из

которых кодирует антиген, и по меньшей мере один из антигенов представляет собой антиген коронавируса. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 5 до 10 последовательностей, каждая из которых кодирует антиген, и по меньшей мере один из антигенов представляет собой антиген коронавируса.

5 В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательности, кодирующие антигены от по меньшей мере двух разных микроорганизмов, и по меньшей мере один микроорганизм представляет собой
10 коронавирус. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательности, кодирующие два или больше антигенов, и по меньшей мере один антиген представляет собой антиген коронавируса, кодируемый последовательностью под SEQ ID NO в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательности, кодирующие по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 антигенов, и по меньшей мере один антиген представляет собой антиген коронавируса, кодируемый последовательностью под SEQ ID NO в таблице 3. В некоторых
15 вариантах осуществления антиген коронавируса предусматривает эпитоп. В некоторых вариантах осуществления антиген коронавируса предусматривает эпитоп, распознаваемый В-клеткой. В некоторых вариантах осуществления антиген коронавируса содержит по меньшей мере два эпитопа.

В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция,
20 содержащая кольцевой полирибонуклеотид, дополнительно содержит второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй антиген. В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция дополнительно содержит второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий вторую ORF. В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция
25 дополнительно содержит третий, четвертый или пятый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую третий, четвертый или пятый антиген. В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция дополнительно содержит второй линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй антиген. В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция
30 дополнительно содержит второй линейный полирибонуклеотид, содержащий вторую ORF. В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция дополнительно содержит третий, четвертый или пятый линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую третий, четвертый или пятый антиген. В

некоторых вариантах осуществления первый антиген, второй антиген, третий антиген, четвертый антиген и пятый антиген являются разными антигенами.

В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное
5 вещество. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид вводят без носителя ("голым"). В других вариантах осуществления полирибонуклеотид составлен с носителем, например LNP, VLP, липосомой или т. п.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная
10 композиция дополнительно содержат разбавитель. В некоторых вариантах осуществления композиция или иммуногенная композиция дополнительно содержат протамин.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены способы, включающие:
(a) введение композиции, описанной в данном документе (например, композиции, содержащей (i) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность,
15 кодирующую антиген коронавируса, например последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO в таблице 1, 2 или 3, или (ii) линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO в таблице 3), субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, для индуцирования иммунного ответа в отношении
20 антигена или для выработки поликлональных антител к антигену у подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека), и (b) необязательно осуществление сбора антител к антигену у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от
25 человека, или человека).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение адъюванта (например, адъюванта Addavax[™], MF59, AS03, полного адъюванта Фрейнда) субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека). Адъювант можно составлять и вводить совместно с
30 полирибонуклеотидом или его можно составлять и вводить отдельно.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает предварительное введение (примирование) субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту,

представляющему собой животное, отличное от человека, или человека), средства, например антигена, для улучшения иммуногенного ответа. Например, способ включает введение белкового антигена субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека), перед (например, за 1-7 дней, например за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней) введением полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую антиген. Белковый антиген может быть введен в виде препарата на основе белка, или закодирован в плазмиде (pDNA), или представлен в вирусоподобной частице (VLP), составлен в липидной наночастице (LNP) или т. п.

10 В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) протамина или его иммунизацию протамином.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид вводят без носителя ("голым"). В других вариантах осуществления полирибонуклеотид составлен с носителем, например LNP, VLP, липосомой или т. п.

15 В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) полирибонуклеотида (например, кольцевого или линейного полирибонуклеотида) или его иммунизацию полирибонуклеотидом по меньшей мере два раза, например 2, 3, 4, 5 раз.

20 В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает осуществление сбора плазмы крови у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта после иммунизации). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает осуществление очистки поликлональных антител, полученных от субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта после иммунизации). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) вакцины или его иммунизацию вакциной. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой пневмококковую полисахаридную вакцину (например, PCV13 или PPSV23). В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину от бактериальной

25 инфекции. В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) иммунизируют с помощью кольцевой РНК посредством инъекции. В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) иммунизируют с помощью линейной РНК посредством инъекции.

30

В вариантах осуществления субъект является субъектом, представляющим собой человека (например, подлежащим иммунизации субъектом, представляющим собой человека). В некоторых вариантах осуществления субъект, представляющий собой человека (например, подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой человека) представляет собой субъекта, подверженного риску развития заболевания, связанного с коронавирусом, например человека старше 50 лет; человека с ослабленным иммунитетом; человека с хроническим патологическим состоянием, таким как ожирение, диабет, рак; работника системы здравоохранения.

В вариантах осуществления субъект представляет собой животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека). В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой сельскохозяйственное животное, например корову, свинью, овцу, лошадь, козу; домашнего питомца, например кошку или собаку; или животное зоопарка, например представителя семейства кошачьих.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой млекопитающее, например грызуна (например, кролика, крысу или мышь), или копытное, например свинью, корову, козу или овцу. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой трансхромосомное животное, отличное от человека, содержащее гуманизированный локус гена иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, представляет собой трансхромосомную корову, содержащую вектор на основе искусственной хромосомы человека (НАС), который содержит гуманизированный локус гена иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус гена иммуноглобулина кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная тяжелая цепь иммуноглобулина предусматривает тяжелую цепь изотипа IgG. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная тяжелая цепь иммуноглобулина предусматривает тяжелую цепь изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), содержит В-клетку, характеризующуюся наличием В-клеточного рецептора, при этом В-клеточный рецептор связывается с антигеном коронавируса. В некоторых вариантах осуществления животное,

отличное от человека, содержит совокупность В-клеток, предусматривающую первую В-клетку, которая связывается с первым эпитопом антигена коронавируса, и вторую В-клетку, которая связывается со вторым эпитопом антигена коронавируса.

5 В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), содержит Т-клетку, где Т-клетка содержит Т-клеточный рецептор, который связывается с антигеном коронавируса. В некоторых вариантах осуществления после активации Т-клетка обеспечивает усиление выработки антитела, которое связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления после активации Т-клетка обеспечивает усиление выработки В-клеткой антитела, которое связывается с антигеном коронавируса. В некоторых вариантах осуществления после активации Т-клетка обеспечивает усиление выживаемости, пролиферации, дифференцировки в плазматическую клетку, соматической гипермутации, переключения класса иммуноглобулинов или комбинацию таковых для В-клетки, которая связывается с антигеном коронавируса.

15 В некоторых вариантах осуществления у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека), вырабатывается антитело, которое специфически связывается с антигеном коронавируса. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело или полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgG, IgA или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

20 В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), содержит совокупность поликлональных антител, которые специфически связываются с по меньшей мере двумя эпитопами, которые кодируются кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления субъект, представляющий собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой животное, отличное от человека, или человека), содержит совокупность

25 поликлональных антител, которые специфически связываются с по меньшей мере двумя эпитопами, которые кодируются линейной РНК. В некоторых вариантах осуществления совокупность антител предусматривает гуманизованные антитела. В некоторых вариантах осуществления совокупность поликлональных антител предусматривает полностью человеческие антитела. В некоторых вариантах осуществления совокупность

30

поликлональных антител предусматривает антитела IgG, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3, антитела IgG4, антитела IgM, антитела IgA или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина предусматривает тяжелую цепь изотипа IgM или IgA. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус гена иммуноглобулина кодирует легкую цепь иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь иммуноглобулина предусматривает легкую каппа-цепь или легкую лямбда-цепь.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает осуществление сбора крови у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, после иммунизации), и осуществление очистки антител к антигену от крови.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен препарат на основе антитела к коронавирусу (например, препарат на основе поликлонального антитела), полученный посредством (а) введения композиции, содержащей полирибонуклеотид, описанный в данном документе, животному, отличному от человека, описанному в данном документе (например, корове, характеризующейся наличием гуманизированной иммунной системы, как описано в данном документе), или субъекту, представляющему собой человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека) и (b) осуществления сбора антител к антигену у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, после иммунизации).

В вариантах осуществления полирибонуклеотид представляет собой (а) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген коронавируса, например последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO в таблице 1, 2 или 3, или (b) линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO в таблице 3.

В вариантах осуществления препарат на основе антитела составляют в виде фармацевтической композиции.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ осуществления доставки антител к коронавирусу субъекту (например, подлежащему лечению субъекту), у которого имеется коронавирусная инфекция, который подвержен риску воздействия коронавирусной инфекции, или который нуждается в этом, например способ

предупреждения или лечения у субъекта (например, подлежащего лечению субъекта) коронавирусной инфекции. Способ включает введение субъекту (например, подлежащему лечению субъекту), у которого имеется коронавирусная инфекция, который подвержен риску воздействия коронавирусной инфекции, или который нуждается в этом, 5 поликлональных антител, полученных от животного (например, млекопитающего), характеризующегося наличием человеческой или гуманизированной иммунной системы, которое иммунизировали с помощью полирибонуклеотида, описанного в данном документе, например (a) кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую антиген коронавируса, например последовательность, 10 выбранную из последовательностей под SEQ ID NO в таблице 1, 2 или 3, или (b) линейного полирибонуклеотида, содержащего последовательность, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO в таблице 3.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает одно или несколько из иммунизации животного, отличного от человека (например, подлежащего 15 иммунизации животного, отличного от человека), которое было генетически модифицировано для выработки человеческих антител с помощью полирибонуклеотида, раскрытого в данном документе, осуществления сбора крови у животного, отличного от человека, осуществления очистки антител, полученных от животного, отличного от человека, составления антител для фармацевтического применения и введения 20 составленных антител субъекту, представляющему собой человека (например, подлежащему лечению субъекту, представляющему собой человека).

В некоторых вариантах осуществления млекопитающее, характеризующееся наличием человеческой или гуманизированной иммунной системы, представляет собой человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой 25 человека).

В некоторых вариантах осуществления млекопитающее, характеризующееся наличием человеческой или гуманизированной иммунной системы, представляет собой животное, отличное от человека, которое было генетически модифицировано для выработки человеческих антител, например животное, отличное от человека, содержащее 30 гуманизированный локус гена иммуноглобулина, например трансхромосомную корову, содержащую вектор на основе искусственной хромосомы человека (НАС), который содержит гуманизированный локус гена иммуноглобулина.

В вариантах осуществления субъект (например, подлежащий лечению субъект), у которого имеется коронавирусная инфекция или который нуждается в этом, является

субъектом, представляющим собой человека, у которого было диагностировано заболевание, связанное с коронавирусом, например Covid-19, SARS, MERS. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий лечению субъект), подверженный риску воздействия коронавирусной инфекции или нуждающийся в этом, представляет собой субъекта, подверженного риску развития заболевания, связанного с коронавирусом, например человека старше 50 лет; человека с ослабленным иммунитетом; человека с хроническим патологическим состоянием, таким как ожирение, диабет, рак; работника системы здравоохранения.

В некоторых вариантах осуществления введение или иммунизацию осуществляют до, после возникновения риска воздействия коронавируса или одновременно с этим.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает осуществление мониторинга субъекта, представляющего собой человека (например, подлежащего лечению субъекта), в отношении наличия антител к коронавирусу, например, до и/или после введения.

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения описаны в пронумерованных абзацах ниже.

E1. Иммуногенная композиция, содержащая:

- a) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген коронавируса; или
- b) линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 13, 15 и 12.

E2. Иммуногенная композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген коронавируса, где антиген коронавируса предусматривает последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью антигена коронавируса, выбранной из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 1-10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25-30, 48 и 49, или кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью кольцевого полирибонуклеотида, выбранной из последовательностей под SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22 и 24.

E3. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая плазму крови, полученную от субъекта,

представляющего собой животное, отличное от человека (например, животное, отличное от человека, у которого имеется гуманизированная иммунная система; например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой человека).

5 E4. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая антиген коронавируса.

E5. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где композиция дополнительно содержит В-клетку, отличную от человеческой, содержащую гуманизированный локус гена иммуноглобулина и
10 гуманизированный В-клеточный рецептор, где гуманизированный В-клеточный рецептор связывается с антигеном коронавируса.

E6. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где композиция дополнительно содержит совокупность В-клеток, отличных от человеческих, где В-клетка, отличная от человеческой, из совокупности
15 содержит гуманизированный локус гена иммуноглобулина, где совокупность В-клеток содержит первую В-клетку, которая связывается с первым эпитопом антигена коронавируса, и вторую В-клетку, которая связывается со вторым эпитопом антигена коронавируса.

E7. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса получен из бета-коронавируса или его фрагмента
20 или из сарбековируса или его фрагмента.

E8. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса получен из коронавируса, связанного с тяжелым острым респираторным синдромом, или его фрагмента.

25 E9. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса получен из коронавируса, связанного с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS), или его фрагмента.

E10. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса получен из коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) или его фрагмента, из коронавируса 1 тяжелого
30 острого респираторного синдрома (SARS-CoV-1) или его фрагмента или из коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) или его фрагмента.

E11. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса представляет собой мембранный белок или его

вариант или фрагмент, белок оболочки вируса или его вариант или фрагмент, шиповидный белок вируса или его вариант или фрагмент, нуклеокапсидный белок вируса или его вариант или фрагмент, вспомогательный белок вируса или его вариант или фрагмент.

5 E12. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса представляет собой рецептор-связывающий домен шиповидного белка или его вариант или фрагмент.

E13. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 8, где в шиповидном белке отсутствует сайт расщепления.

10 E14. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где вспомогательный белок коронавируса выбран из группы, состоящей из ORF3a, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF10 или любого их варианта или фрагмента.

15 E15. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где кольцевой полирибонуклеотид содержит совокупность последовательностей, каждая из которых кодирует антиген, и по меньшей мере одна последовательность кодирует антиген коронавируса.

E16. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где кольцевой полирибонуклеотид содержит две или больше ORF.

20 E17. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере пять последовательностей, каждая из которых кодирует антиген, и по меньшей мере один антиген представляет собой антиген коронавируса.

E18. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере две ORF (например, по меньшей мере 2, 3, 4 или 5).

25 E19. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательности, кодирующие антигены от по меньшей мере двух разных микроорганизмов, и по меньшей мере один микроорганизм представляет собой коронавирус.

30 E20. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где линейный полирибонуклеотид содержит последовательности, кодирующие два или больше антигенов, и по меньшей мере один антиген представляет собой антиген коронавируса.

E21. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где линейный полирибонуклеотид содержит последовательности,

кодирующие по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 антигенов, и по меньшей мере один антиген представляет собой антиген коронавируса, кодируемый последовательностью под SEQ ID NO в таблице 3.

5 E22. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса предусматривает эпитоп.

E23. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса предусматривает эпитоп, распознаваемый В-клеткой.

10 E24. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса содержит по меньшей мере два эпитопа.

E25. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй антиген.

15 E26. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий вторую ORF.

20 E27. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая третий, четвертый или пятый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую третий, четвертый или пятый антиген.

E28. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая второй линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй антиген.

25 E29. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая второй линейный полирибонуклеотид, содержащий вторую ORF.

30 E30. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая третий, четвертый или пятый линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую третий, четвертый или пятый антиген.

E31. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый антиген, второй антиген, третий антиген, четвертый антиген и пятый антиген являются разными антигенами.

E32. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где иммуногенная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

5 E33. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где иммуногенная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и не содержит какого-либо носителя.

10 E34. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид или иммуногенная композиция составлены с носителем (например, липидной наночастицей, вирусоподобной частицей или липосомой).

E35. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где иммуногенная композиция дополнительно содержит адъювант.

E36. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 35, где адъювант представляет собой сапонин или масляную эмульсию.

15 E37. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 36, где масляная эмульсия представляет собой эмульсию сквален-вода (например, адъювант Addavax™, MF59 или AS03).

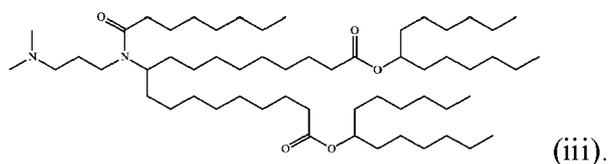
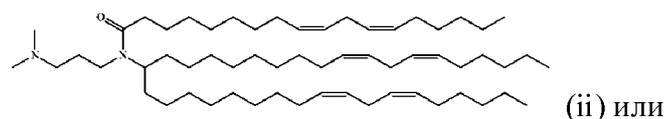
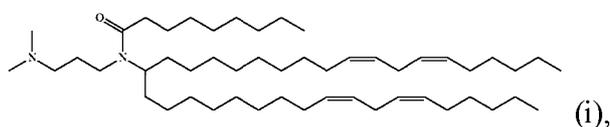
E38. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где иммуногенная композиция дополнительно содержит разбавитель.

20 E40. Липидная наночастица (LNP), содержащая иммуногенную композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления.

E41. LNP по варианту осуществления 40, содержащая ионизируемый липид.

E42. LNP по варианту осуществления 40, содержащая катионный липид.

25 E43. LNP по варианту осуществления 42, где катионный липид характеризуется структурой в соответствии с



5 E44. LNP по любому из вариантов осуществления 40-43, дополнительно содержащая один или несколько нейтральных липидов, например DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE, SM, стероид, например холестерин, и/или один или несколько липидов, конъюгированных с полимером, например пегилированный липид, например PEG-DAG, PEG-PE, PEG-S-DAG, PEG-Cer или PEG-диалкилоксипропилкарбамат.

10 E45. Способ доставки иммуногенной композиции субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека), включающий а) введение иммуногенной композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека, и б) необязательно осуществление сбора антител к антигену коронавируса у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека.

15 E46. Способ индуцирования иммунного ответа в отношении антигена коронавируса у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека), включающий а) введение иммуногенной композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека, и б) необязательно осуществление сбора антител к антигену коронавируса у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека.

20 E47. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий введение адъюванта субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека).

E48. Способ по варианту осуществления 47, где адъювант составляют и вводят совместно с иммуногенной композицией или составляют и вводят отдельно от иммуногенной композиции.

30 E49. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий введение (например, предварительное введение или примирование) субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека), антигена коронавируса перед введением иммуногенной композиции.

E50. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий введение антигена коронавируса субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека) за 1-7 5 дней (например, за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней) до введения иммуногенной композиции.

E51. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антиген коронавируса вводится в виде препарата на основе белка, закодирован в плазмиде (pDNA), представлен в вирусоподобной частице (VLP) или составлен в липидной наночастице (LNP).

10 E52. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий введение кольцевого полирибонуклеотида или линейного полирибонуклеотида без носителя.

E53. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий составление иммуногенной композиции с носителем (например, липидной 15 наночастицей, вирусоподобной частицей или липосомой).

E54. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий введение кольцевого полирибонуклеотида или линейного полирибонуклеотида субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой 20 животное, отличное от человека, или человека), или его иммунизацию полирибонуклеотидом по меньшей мере двукратно (например, 2, 3, 4 или 5 раз).

E55. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий осуществление сбора плазмы крови у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации 25 субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека).

E56. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий осуществление очистки поликлональных антител от плазмы крови субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от 30 человека, или человека).

E57. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий введение вакцины субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту,

представляющему собой животное, отличное от человека, или человека), или его иммунизацию вакциной.

Е58. Способ по варианту осуществления 51, где вакцина представляет собой пневмококковую полисахаридную вакцину (например, PCV13 или PPSV23).

5 Е59. Способ по варианту осуществления 57, где вакцина представляет собой вакцину от бактериальной инфекции.

Е60. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека) иммунизируют с помощью кольцевого полирибонуклеотида или
10 линейного полирибонуклеотида посредством инъекции.

Е61. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъект, представляющий собой человека (например, подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой человека) подвержен риску развития заболевания, связанного с
15 коронавирусом.

Е62. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъект, представляющий собой человека (например, подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой человека), представляет собой человека старше 50 лет, человека с ослабленным иммунитетом, человека с хроническим патологическим состоянием
20 (например, ожирением, диабетом, раком) или работника системы здравоохранения.

Е63. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где животное, отличное от человека (например, подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой животное, отличное от человека), представляет собой сельскохозяйственное животное (например, свинью, корову, козу, курицу, овцу).

Е64. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где животное, отличное от человека (например, подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой животное, отличное от человека), представляет собой домашнего питомца (например, собаку или кошку), животное зоопарка (например, представителя семейства кошачьих), млекопитающее (например, копытное (например, свинью, корову, козу, овцу),
25 грызуна (например, кролика, крысу, мышь).

Е65. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где животное, отличное от человека, представляет собой трансхромосомное животное, отличное от человека, содержащее гуманизированный локус гена иммуноглобулина.

E66. Способ по варианту осуществления 65, где животное, отличное от человека, представляет собой трансхромосомную корову, содержащую вектор на основе искусственной хромосомы человека (НАС), который содержит гуманизированный локус гена иммуноглобулина.

5 E67. Способ по любому из вариантов осуществления 65 или 66, где гуманизированный локус гена иммуноглобулина кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина.

E68. Способ по варианту осуществления 67, где гуманизированная тяжелая цепь иммуноглобулина предусматривает тяжелую цепь изотипа IgG.

10 E69. Способ по любому из вариантов осуществления 67 или 68, где гуманизированная тяжелая цепь иммуноглобулина предусматривает тяжелую цепь изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

E70. Способ по любому из вариантов осуществления 65-69, где гуманизированный локус гена иммуноглобулина кодирует легкую цепь иммуноглобулина.

15 E71. Способ по варианту осуществления 70, где легкая цепь иммуноглобулина предусматривает легкую каппа-цепь или легкую лямбда-цепь.

E72. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где животное, отличное от человека, содержит В-клетку, характеризующуюся наличием В-клеточного рецептора, и при этом В-клеточный рецептор связывается с антигеном.

20 E73. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где животное, отличное от человека, содержит совокупность В-клеток, предусматривающую первую В-клетку, которая связывается с первым эпитопом антигена коронавируса, и вторую В-клетку, которая связывается со вторым эпитопом антигена коронавируса.

25 E74. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где животное, отличное от человека, содержит Т-клетку, и при этом Т-клетка содержит Т-клеточный рецептор, который связывается с антигеном коронавируса.

E75. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где после активации Т-клетка обеспечивает усиление выработки антитела, которое связывается с антигеном коронавируса.

30 E76. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где после активации Т-клетка обеспечивает усиление выработки В-клеткой антитела, которое связывается с антигеном коронавируса.

E77. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где после активации Т-клетка обеспечивает усиление выживаемости, пролиферации,

дифференцировки в плазматическую клетку, соматической гипермутации, переключения класса иммуноглобулинов или комбинацию таковых для В-клетки, которая связывается с антигеном коронавируса.

5 E78. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий осуществление очистки поликлональных антител к антигену коронавируса от плазмы крови субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека).

10 E79. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело из поликлональных антител специфически связывается с антигеном коронавируса.

E80. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело из поликлональных антител представляет собой гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

15 E81. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело из поликлональных антител представляет собой антитело изотипа IgG, IgA или IgM.

E82. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антитело из поликлональных антител представляет собой антитело изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

20 E83. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где животное, отличное от человека, содержит совокупность поликлональных антител, которые специфически связываются с по меньшей мере двумя эпитопами, которые кодируются кольцевым полирибонуклеотидом.

25 E84. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где животное, отличное от человека, содержит совокупность поликлональных антител, которые специфически связываются с по меньшей мере двумя эпитопами, которые кодируются линейным полирибонуклеотидом.

E85. Способ по любому из вариантов осуществления 81 или 82, где совокупность поликлональных антител предусматривает гуманизированные антитела.

E86. Способ по любому из вариантов осуществления 83 или 84, где совокупность поликлональных антител предусматривает полностью человеческие антитела.

30 E87. Способ по любому из вариантов осуществления 83-86, где совокупность поликлональных антител предусматривает антитела IgG, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3, антитела IgG4, антитела IgM, антитела IgA или их комбинацию.

E88. Способ по любому из вариантов осуществления 83-86, где совокупность поликлональных антител предусматривает гуманизированные локусы гена иммуноглобулина, предусматривающие тяжелые цепи изотипа IgM или IgA.

5 E89. Способ по любому из вариантов осуществления 83-88, где совокупность поликлональных антител предусматривает гуманизированные локусы гена иммуноглобулина, кодирующие легкие цепи иммуноглобулина.

E90. Способ по варианту осуществления 89, где легкие цепи иммуноглобулина предусматривают легкие каппа-цепи или легкие лямбда-цепи.

10 E91. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий осуществление сбора крови у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека), и осуществление очистки антител к антигену коронавируса от крови.

15 E92. Способ получения препарата на основе поликлонального антитела к антигену коронавируса (например, препарата на основе антитела против коронавируса), включающий:

20 а) введение иммуногенной композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека), и

б) осуществление сбора крови или плазмы крови у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека.

25 E93. Способ по варианту осуществления 92, где препарат на основе поликлонального антитела составляют в виде фармацевтической композиции или ветеринарной композиции.

30 E94. Способ доставки препарата на основе поликлонального антитела против коронавируса субъекту (например, подлежащему лечению субъекту), у которого имеется коронавирусная инфекция, включающий введение препарата на основе поликлонального антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления субъекту, у которого имеется коронавирусная инфекция.

E95. Способ доставки препарата на основе поликлонального антитела субъекту (например, субъекту подлежащему лечению), подверженному риску воздействия коронавирусной инфекции, включающий введение препарата на основе поликлональных

антител по любому из предыдущих вариантов осуществления субъекту, подверженному риску воздействия коронавирусной инфекции.

5 E96. Способ предупреждения или лечения коронавирусной инфекции у субъекта (например, подлежащего лечению субъекта), нуждающегося в этом, включающий введение препарата на основе поликлональных антител по любому из предыдущих вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом.

E97. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий:

- 10 a) иммунизацию животного, отличного от человека, которое было генетически модифицировано для выработки человеческих антител, с помощью кольцевого полирибонуклеотида по любому из предыдущих вариантов осуществления или линейного полирибонуклеотида по любому из предыдущих вариантов осуществления;
- b) осуществление сбора крови у животного, отличного от человека;
- c) осуществление очистки антител, полученных от животного, отличного от человека;
- 15 d) составление антител для фармацевтического применения и
- e) введение составленных антител субъекту, представляющему собой человека.

E98. Способ по варианту осуществления 97, где животное, отличное от человека, характеризуется наличием гуманизированной иммунной системы.

20 E99. Способ по варианту осуществления 97, где животное, отличное от человека, содержит гуманизированный локус гена иммуноглобулина.

E100. Способ по варианту осуществления 97, где животное, отличное от человека, представляет собой трансхромосомную корову, содержащую вектор на основе искусственной хромосомы человека (НАС), который содержит человеческий локус гена иммуноглобулина.

25 E101. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где введение или иммунизацию осуществляют до, после возникновения риска воздействия коронавируса или одновременно с возникновением такового, для субъекта, нуждающегося в этом.

E102. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъект (например, субъект подлежащий лечению), у которого имеется коронавирусная инфекция, 30 субъект, подверженный риску воздействия коронавирусной инфекции, или субъект, нуждающийся в этом, являются субъектом, представляющим собой человека.

E103. Способ по варианту осуществления 102, где субъект, представляющий собой человека (например, подлежащий лечению субъект, представляющий собой человека), представляет собой человека старше 50 лет, человека с ослабленным иммунитетом,

человека с хроническим патологическим состоянием (например, ожирением, диабетом или раком) или работника системы здравоохранения.

5 E104. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъект (например, подлежащий лечению субъект), подверженный риску воздействия
коронавирусной инфекции, или субъект, нуждающийся в этом, являются субъектом,
представляющим собой человека, подверженного риску развития заболевания, связанного
с коронавирусом.

10 E105. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъект (например, субъект подлежащий лечению), у которого имеется коронавирусная инфекция,
субъект, подверженный риску воздействия коронавирусной инфекции, или субъект,
нуждающийся в этом, являются субъектом, представляющим собой человека, у которого
было диагностировано заболевание, связанное с коронавирусом (например, Covid-19,
SARS, MERS).

15 E106. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъект (например, подлежащий лечению субъект), у которого имеется коронавирусная инфекция,
субъект (например, подлежащий лечению субъект), подверженный риску воздействия
коронавирусной инфекции, или субъект (например, подлежащий лечению субъект),
нуждающийся в этом, являются субъектом, представляющим собой животное, отличное от
человека.

20 E107. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъект (например, подлежащий лечению субъект), у которого имеется коронавирусная инфекция,
субъект (например, подлежащий лечению субъект), подверженный риску воздействия
коронавирусной инфекции, или субъект (например, подлежащий лечению субъект),
нуждающийся в этом, представляют собой сельскохозяйственное животное (например,
25 корову, свинью, овцу, лошадь, козу), домашнего питомца (например, кошку или собаку)
или животное зоопарка (например, представителя семейства кошачьих).

30 E108. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно
включающий мониторинг субъекта (например, субъекта, подлежащего лечению), у
которого имеется коронавирусная инфекция, субъекта (например, субъекта, подлежащего
лечению), подверженного риску воздействия коронавирусной инфекции, или субъекта,
нуждающегося в этом, в отношении наличия поликлональных антител.

E109. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где мониторинг
осуществляют перед введением поликлональных антител и/или после введения
поликлональных антител.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Настоящее изобретение будет описано в отношении конкретных вариантов осуществления и со ссылкой на определенные фигуры, но настоящее изобретение не ограничивается ими, а только формулой изобретения. Термины, изложенные ниже, как
5 правило, следует понимать в их общем смысле, если не указано иное.

Используемые в данном документе термины "circRNA", "кольцевой полирибонуклеотид" и "кольцевая РНК" используются взаимозаменяемо и означают полирибонуклеотидную молекулу, которая характеризуется структурой без свободных концов (т. е. без свободных 3'- и/или 5'-концов), например, полирибонуклеотид, который
10 образует кольцевую или замкнутую структуру посредством ковалентных или нековалентных связей.

Используемые в данном документе термины "препарат на основе circRNA", "препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида" и "препарат на основе кольцевой РНК" используются взаимозаменяемо и означают композицию, содержащую молекулы
15 circRNA и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию. "Иммуногенный" препарат на основе circRNA представляет собой препарат на основе circRNA, который при введении в организм животного делает иммунную систему животного реактивной в отношении антигена(антигенов), экспрессируемого(экспрессируемых) с помощью circRNA.

Используемые в данном документе термины "линейная РНК", "линейный полирибонуклеотид" и "линейная полирибонуклеотидная молекула" используются взаимозаменяемо и означают монорибонуклеотидную молекулу или полирибонуклеотидную молекулу, характеризующуюся наличием 5'- и 3'-конца. Один или
20 оба из 5'- и 3'-концов могут представлять собой свободные концы или могут быть соединены с другим компонентом. В некоторых вариантах осуществления линейная РНК характеризующуюся наличием 5'-конца или 3'-конца, которые являются модифицированными или защищенными от разрушения (например, с помощью защитного средства для 5'-конца или защитного средства для 3'-конца). В некоторых вариантах осуществления линейная РНК характеризующуюся наличием нековалентно связанных 5'-
30 или 3'-концов. Линейную РНК можно применять в качестве исходного материала для циркуляризации посредством, например, лигирования с помощью шунта, или химических, ферментативных, катализируемых рибозимом или сплайсингом способов циркуляризации.

Используемые в данном документе термины "препарат на основе линейной РНК" и "препарат на основе линейного полирибонуклеотида" используются взаимозаменяемо и

означают композицию, содержащую линейные молекулы РНК и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию. "Иммуногенный" препарат на основе линейной РНК представляет собой препарат на основе линейной РНК, который при введении в организм животного делает иммунную систему животного реактивной в отношении антигена(антигенов), экспрессируемого(экспрессируемых) с помощью *si*cRNA.

Используемый в данном документе термин "общие рибонуклеотидные молекулы" означает общее количество любых рибонуклеотидных молекул, включая линейные полирибонуклеотидные молекулы, кольцевые полирибонуклеотидные молекулы, мономерные рибонуклеотиды, другие полирибонуклеотидные молекулы, их фрагменты и их модифицированные варианты, согласно измерению общей массы рибонуклеотидных молекул.

Используемый в данном документе термин "фрагмент" означает любую часть нуклеотидной молекулы, которая на по меньшей мере один нуклеотид короче нуклеотидной молекулы. Например, нуклеотидная молекула может представлять собой линейную полирибонуклеотидную молекулу, и ее фрагмент может представлять собой монорибонуклеотид или любое число смежных полирибонуклеотидов, которые представляют собой часть линейной полирибонуклеотидной молекулы. В качестве другого примера, нуклеотидная молекула может представлять собой кольцевую полирибонуклеотидную молекулу, и ее фрагмент может представлять собой полирибонуклеотид или любое число смежных полирибонуклеотидов, которые представляют собой часть кольцевой полирибонуклеотидной молекулы. Фрагмент нуклеотидной молекулы предусматривает по меньшей мере 10 остатков нуклеиновой кислоты, например по меньшей мере 20 остатков нуклеиновой кислоты, по меньшей мере 50 остатков нуклеиновой кислоты и по меньшей мере 100 остатков нуклеиновой кислоты. Фрагмент также означает любую часть полипептидной молекулы, которая на по меньшей мере один пептид короче полипептидной молекулы. Например, фрагмент полипептида может представлять собой полипептид или любое число смежных аминокислот, которые представляют собой часть полноразмерной полипептидной молекулы. Фрагмент полипептида предусматривает по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, например, по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 аминокислотных остатков.

Используемый в данном документе термин "экспрессионная последовательность" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует продукт,

например пептид или полипептид, или регуляторную нуклеиновую кислоту. Иллюстративная экспрессионная последовательность, которая кодирует пептид или полипептид, может содержать совокупность нуклеотидных триад, каждая из которых может кодировать аминокислоту и называется "кодоном".

5 Используемый в данном документе термин "модифицированный рибонуклеотид" представляет собой нуклеотид с по меньшей мере одной модификацией сахарного фрагмента, нуклеинового основания или межнуклеозидной связи.

Используемое в данном документе выражение "псевдоспиральная структура" означает структуру высшего порядка кольцевого полирибонуклеотида, где по меньшей мере часть кольцевого полирибонуклеотида свернута в спиральную структуру.

Используемое в данном документе выражение "псевдодвухнитевая вторичная структура" означает структуру высшего порядка кольцевого полирибонуклеотида, где по меньшей мере часть кольцевого полирибонуклеотида образует внутреннюю двойную нить.

Используемый в данном документе термин "регуляторный элемент" означает компонент, такой как последовательность нуклеиновой кислоты, который модифицирует экспрессию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде.

Используемый в данном документе термин "повторяющаяся нуклеотидная последовательность" означает повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты в пределах отрезка ДНК или РНК или во всем геноме. В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность включает последовательности поли(СА) или поли(TG) (UG). В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность включает повторяющиеся последовательности интронов из семейства Alu.

Используемый в данном документе термин "репликативный элемент" представляет собой последовательность и/или мотивы, которые являются применимыми для репликации или которые иницируют транскрипцию кольцевого полирибонуклеотида.

Используемый в данном документе термин "сдвигающий элемент" означает компонент, такой как нуклеотидная последовательность, который индуцирует рибосомальную паузу в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент представляет собой неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность -D(V/I)ExNPGP, где x = любая аминокислота. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент может предусматривать химический компонент, такой как глицерин, линкерный компонент,

отличный от нуклеиновой кислоты, химическую модификацию, модифицированную нуклеиновую кислоту или любую их комбинацию.

Используемый в данном документе термин "по сути устойчивый" означает объект, характеризующийся по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,
5 96%, 97%, 98% или 99% устойчивостью по сравнению с эталоном.

Используемый в данном документе термин "стехиометрическая трансляция" означает по сути эквивалентную выработку продуктов экспрессии, образующихся в результате трансляции с кольцевого полирибонуклеотида. Например, для кольцевого полирибонуклеотида, содержащего две экспрессионные последовательности,
10 стехиометрическая трансляция кольцевого полирибонуклеотида означает, что продукты экспрессии двух экспрессионных последовательностей представлены в по сути эквивалентных количествах, например разница между количествами двух экспрессионных последовательностей (например, молярная разница) может составлять приблизительно 0 или менее 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% или 20% или любого
15 промежуточного процентного значения.

Используемый в данном документе термин "последовательность инициации трансляции" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая иницирует трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде.

Используемый в данном документе термин "терминирующий элемент" означает компонент, такой как последовательность нуклеиновой кислоты, который терминирует трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде.
20

Используемый в данном документе термин "эффективность трансляции" означает скорость или величину выработки белка или пептида с рибонуклеотидного транскрипта. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансляции может быть выражена в виде количества вырабатываемого белка или пептида в расчете на данное количество транскрипта, который кодирует белок или пептид, например, за данный период времени, например, в данной системе трансляции, например, в системе трансляции *in vitro*, такой как лизат ретикулоцитов кролика, или системе трансляции *in vivo*, такой как эукариотическая клетка или прокариотическая клетка.
25

Используемый в данном документе термин "эффективность циркуляризации" означает меру количества полученного кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с его некольцевым исходным материалом.
30

Используемый в данном документе термин "адаптивный иммунный ответ" означает либо гуморальный, либо клеточноопосредованный иммунный ответ. Гуморальный

иммунный ответ (также называемый опосредованным антителами иммунным ответом) опосредован В-лимфоцитами, которые высвобождают антитела, которые специфически связываются с антигеном. Клеточноопосредованный иммунный ответ (также называемый клеточным иммунным ответом) предусматривает связывание цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) с чужеродными или инфицированными клетками с последующим лизисом данных клеток.

Используемый в данном документе термин "адъювант" относится к соединению, которое при применении в комбинации с кольцевой молекулой РНК усиливает или иным образом изменяет или модифицирует полученный иммунный ответ. Модификация иммунного ответа предусматривает усиление или расширение специфичности любого из опосредованного антителами иммунного ответа и клеточного иммунного ответа или как первого, так и второго. Модификация иммунного ответа может также означать снижение или подавление определенных антигенспецифических иммунных ответов.

Используемые в данном документе термины "человеческое антитело", "человеческий иммуноглобулин" и "человеческое поликлональное антитело" используются взаимозаменяемо и означают антитело или антитела, вырабатываемые в организме животного, отличного от человека, которые в остальном не отличаются от антитела, вырабатываемого в организме человека, вакцинированного с помощью такого же препарата на основе кольцевой РНК. В отличие от них "гуманизированные антитела" являются модифицированными таким образом, чтобы они обладали характеристиками человеческих антител, например, посредством обеспечения образования химер, но при этом сохраняют атрибуты животного-хозяина, в организме которого они вырабатываются. Поскольку человеческое антитело, полученное в соответствии со способом, раскрытым в данном документе, предусматривает IgG, которые являются полностью человеческими, ферментативная обработка для устранения риска анафилактической реакции и сывороточной реакции, ассоциированных с IgG гетерологичного вида, не требуется.

Используемый в данном документе термин "линейный эквивалент" представляет собой полирибонуклеотидную молекулу (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же или сходной нуклеотидной последовательностью (например, характеризующуюся сходством последовательности, составляющим 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) по сравнению с кольцевым полирибонуклеотидом и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованную версию (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент (например, версия, предшествующая

циркуляризованной версии) представляет собой полирибонуклеотидную молекулу (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же или сходной нуклеотидной последовательностью (например, характеризующуюся сходством последовательности, составляющим 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) и наличием таких же или сходных модификаций нуклеиновой кислоты по сравнению с кольцевым полирибонуклеотидом и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованную версию (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент представляет собой полирибонуклеотидную молекулу (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же или сходной нуклеотидной последовательностью (например, характеризующуюся сходством последовательности, составляющим 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) и наличием отличающихся модификаций нуклеиновой кислоты или их отсутствием по сравнению с кольцевым полирибонуклеотидом и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованную версию (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления фрагмент полирибонуклеотидной молекулы, которая является линейным эквивалентом, представляет собой любую часть полирибонуклеотидной молекулы линейного эквивалента, которая является более короткой, чем полирибонуклеотидная молекула линейного эквивалента. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 5'-кэп. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит полиаденозиновый хвост. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 5'-UTR.

Используемый в данном документе термин "носитель" означает соединение, композицию, реагент или молекулу, которые облегчают перенос или доставку композиции (например, кольцевого полирибонуклеотида) в клетку посредством ковалентной модификации кольцевого полирибонуклеотида, с помощью частично или полностью инкапсулирующего средства или их комбинации. Неограничивающие примеры носителей включают углеводные носители (например, ангидрид-модифицированный фитогликоген или материал типа гликогена), наночастицы (например, наночастицу, которая инкапсулирует кольцевой полирибонуклеотид или ковалентно связывается с ним, такую как липидная наночастица или LNP), липосомы, фузосомы, дифференцированные *ex vivo* ретикулоциты, экзосомы, белковые носители (например, белок, ковалентно связанный с

кольцевым полирибонуклеотидом) или катионные носители (например, катионный липополимер или реагент для трансфекции).

Используемый в данном документе термин "голый", "доставка в "голом" виде" и однокоренные слова означают состав для доставки к клетке без помощи носителя и без ковалентной модификации компонента, который способствует доставке к клетке. Состав для доставки в "голом" виде не содержит каких-либо реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. Например, состав на основе кольцевого полирибонуклеотида для доставки в "голом" виде представляет собой состав, который содержит кольцевой полирибонуклеотид без ковалентной модификации и не содержит носителя. Состав для доставки в "голом" виде может содержать отличные от носителя фармацевтические вспомогательные вещества или разбавители.

Термин "разбавитель" означает среду-носитель, содержащую неактивный растворитель, в которой композиция, описанная в данном документе (например, композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид), может быть разбавлена или растворена. Разбавитель может представлять собой средство для сольubilизации РНК, буфер, изотоническое средство или их смесь. Разбавитель может представлять собой жидкий разбавитель или твердый разбавитель. Неограничивающие примеры жидких разбавителей включают воду или другие растворители, сольubilизирующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, масло из семян хлопчатника, арахисовое масло, кукурузное масло, масло из зародышей пшеницы, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сорбитановые сложные эфиры жирных кислот и 1,3-бутандиол. Неограничивающие примеры твердых разбавителей включают карбонат кальция, карбонат натрия, фосфат кальция, дикальцийфосфат, сульфат кальция, гидрофосфат кальция, фосфат натрия, лактозу, сахарозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, сорбит, инозит, хлорид натрия, сухой крахмал, кукурузный крахмал или сахарную пудру.

Как используется в данном документе, "подлежащий иммунизации субъект" представляет собой субъекта, которому вводят иммуногенную композицию (например, композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, который содержит последовательность, кодирующую антиген коронавируса, или композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид, который содержит последовательность, выбранную из

последовательностей под SEQ ID NO в таблице 3). Подлежащий иммунизации субъект является субъектом, представляющим собой животное, отличное от человека ("подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой животное, отличное от человека") (например, сельскохозяйственное животное, домашнего питомца, животное зоопарка и т. д.), или -человека ("подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой человека").

Как используется в данном документе, "подлежащий лечению субъект" представляет собой субъекта, которому вводят поликлональные антитела к коронавирусу (например, препарат на основе поликлонального антитела против коронавируса) в качестве профилактического лечения или для лечения коронавирусной инфекции. Профилактическое лечение включает введение поликлональных антител к коронавирусу субъекту, подверженному риску воздействия коронавируса (например, работнику системы здравоохранения) или подверженному риску развития заболевания, связанного с коронавирусом (например, человеку старше 50 лет; человеку с ослабленным иммунитетом; человеку с хроническим патологическим состоянием, таким как ожирение, диабет, рак). Подлежащий лечению субъект является субъектом, представляющим собой животное, отличное от человека ("подлежащий лечению субъект, представляющий собой животное, отличное от человека") (например, сельскохозяйственное животное, домашнего питомца, животное зоопарка и т. д.), или человека ("подлежащий лечению субъект, представляющий собой человека").

Используемый в данном документе термин "вариант" относится к полипептиду, который предусматривает по меньшей мере одно изменение, например замену, вставку, делецию и/или слияние, в одном или нескольких положениях остатков по сравнению с исходным полипептидом или полипептидом дикого типа. Вариант может предусматривать от 1 до 10, от 10 до 20, от 20 до 50, от 50 до 100 или больше изменений.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и отдельно указана как включенная посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Новые признаки настоящего изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет достигнуто при обращении к следующему подробному описанию, в

котором изложены иллюстративные варианты осуществления, где используются принципы настоящего изобретения, и сопровождающим его графическим материалам.

На **фиг. 1** показаны иллюстративные кольцевые полирибонуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую антиген коронавируса (например, шиповидный белок, белок, представляющий собой рецептор-связывающий домен (RBD) шиповидного белка).

На **фиг. 2** показана схема обеспечения образования человеческих поликлональных антител, которые связываются с антигеном коронавируса, подлежащих введению субъектам, представляющим собой людей.

На **фиг. 3** показано, что антиген, представляющий собой RBD, кодируемый кольцевой РНК, был выявлен в фибробластах VJ и клетках HeLa и не был выявлен в фибробластах VJ и клетках HeLa со средой-носителем в качестве контроля.

На **фиг. 4** показано, что в мышинной модели устойчивый ответ в виде выработки антител к RBD достигался после введения кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, составленной с катионным полимером (например, протамином).

На **фиг. 5** показано, что в мышинной модели ответ в виде антител к шиповидному белку достигался после введения кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, составленной с катионным полимером (например, протамином).

На **фиг. 6** показаны уровни антител к RBD изотипа IgG2a и IgG1, которые были получены в мышинной модели после введения кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, составленной с катионным полимером (например, протамином).

На **фиг. 7** показана экспрессия белка из кольцевой РНК *in vivo* в течение продолжительных промежутков времени после внутримышечной инъекции препаратов на основе кольцевой РНК (составленных с Trans-IT, составленных с протамином, несоставленных), среды-носителя в виде протамин отдельно и для контрольных мышей, которым не проводилась инъекция.

На **фиг. 8** показана экспрессия белка из кольцевой РНК *in vivo* в течение продолжительных промежутков времени после одновременной внутримышечной доставки адъюванта Addavax™ с (i) несоставленными препаратами на основе кольцевой РНК (левый график), (ii) кольцевой РНК, составленной с TransIT (средний график), и (iii) кольцевой РНК, составленной с протамином (правый график). В каждом случае адъювант Addavax™ доставляли в виде отдельной инъекции в моменты времени 0 и 24 ч.

На **фиг. 9** показана экспрессия белка из кольцевой РНК *in vivo* в течение продолжительных промежутков времени после внутрикожной доставки (i) кольцевой РНК, составленной с протамином, (ii) кольцевой РНК, составленной с протамином, с инъекцией адьюванта Addavax™ в момент времени 24 часа, (iii) среды-носителя в виде протамина
5 отдельно и (iv) для контрольных мышей, которым не проводилась инъекция.

На **фиг. 10** представлена схема иллюстративной кольцевой РНК, которая содержит две экспрессионные последовательности, где каждая экспрессионная последовательность кодирует антиген, и где одна или обе экспрессионные последовательности кодируют антиген коронавируса. Кольцевая РНК содержит две открытые рамки считывания (ORF),
10 где каждая ORF кодирует экспрессионную последовательность, при этом каждая ORF функционально связана с IRES.

На **фиг. 11** представлена схема иллюстративной кольцевой РНК, которая содержит две экспрессионные последовательности, где каждая экспрессионная последовательность представляет собой антиген, и где одна или обе экспрессионные последовательности
15 кодируют антиген коронавируса. Кольцевая РНК содержит две экспрессионные последовательности, разделенные последовательностью 2A, все из которых функционально связаны с IRES.

На **фиг. 12** показана схема совокупности полирибонуклеотидов, где каждый полинуклеотид содержит ORF, которая кодирует антиген, и при этом одна или обе ORF
20 кодируют антиген коронавируса.

На **фиг. 13A** показана экспрессия нескольких антигенов из кольцевого полирибонуклеотида. Экспрессия антигена, представляющего собой RBD, была выявлена из кольцевых РНК, кодирующих антиген, представляющий собой RBD SARSs-CoV-2, и полипептид GLuc.
25

На **фиг. 13B** показана экспрессия нескольких антигенов из кольцевого полирибонуклеотида. Активность GLuc была выявлена в случае кольцевых РНК, кодирующих антиген, представляющий собой RBD SARSs-CoV-2, и полипептид GLuc.

На **фиг. 14A** продемонстрирована иммуногенность нескольких антигенов из кольцевых РНК в мышинной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой
30 РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей полипептид GLuc. Антитела к RBD получали через 17 дней после инъекции.

На **фиг. 14B** продемонстрирована иммуногенность нескольких антигенов из кольцевых РНК в мышинной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой

РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей полипептид GLuc. Активность GLuc была выявлена через 2 дня после инъекции.

5 На **фиг. 15A** продемонстрирована иммуногенность нескольких антигенов из кольцевых РНК в мышинной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой гемагглютинин (НА) вируса гриппа. Антитела к RBD получали через 17 дней после инъекции.

10 На **фиг. 15B** продемонстрирована иммуногенность нескольких антигенов из кольцевых РНК в мышинной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой гемагглютинин (НА) вируса гриппа. Антитела к НА получали через 17 дней после инъекции.

15 На **фиг. 16A** продемонстрирована иммуногенность нескольких антигенов из кольцевых РНК в мышинной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой гемагглютинин (НА) вируса гриппа. Антитела к RBD (домену шиповидного белка) получали через 17 дней после инъекции.

20 На **фиг. 16B** продемонстрирована иммуногенность нескольких антигенов из кольцевых РНК в мышинной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой гемагглютинин (НА) вируса гриппа. Антитела к НА получали через 17 дней после инъекции.

25 На **фиг. 17** продемонстрирован ответ в виде выработки антител к НА у мышей, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую несколько антигенов. Мышам вводили кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, антиген, представляющий собой НА вируса гриппа, антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и антиген, представляющий собой НА вируса гриппа, антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и полипептид GLuc или антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2. Анализ ингибирования гемагглютинации (HAI) применяли для измерения уровня антител к НА вируса гриппа. На **фиг. 24** показан титр HAI в образцах, где вводили препараты на основе

30

кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой HA вируса гриппа, при их введении отдельно или при введении в комбинации с антигенами SARS-CoV-2, например, RBD или шиповидным белком.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

5 Настоящее изобретение в целом относится к кольцевым полирибонуклеотидам, содержащим последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп из коронавируса, иммуногенным композициям, содержащим кольцевые полирибонуклеотиды, кодирующие антиген и/или эпитоп коронавируса, и способам получения кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих антиген и/или эпитоп коронавируса, и композиций, содержащих кольцевые полирибонуклеотиды, кодирующие антиген и/или эпитоп коронавируса. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды и/или иммуногенные композиции применяют в способах обеспечения образования иммунного ответа в отношении антигена и/или эпитопа из коронавируса посредством введения кольцевого полирибонуклеотида и/или иммуногенной композиции субъекту или иммунизации субъекта с помощью кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп коронавируса, и/или иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект) может представлять собой млекопитающее, например копытное. Подлежащий иммунизации субъект может представлять собой человека. В некоторых вариантах осуществления подлежащий иммунизации субъект представляет собой животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы.

Настоящее изобретение также в целом относится к линейным полирибонуклеотидам, содержащим последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп из коронавируса, иммуногенным композициям, содержащим линейные полирибонуклеотиды, кодирующие антиген и/или эпитоп коронавируса, и способам получения линейных полирибонуклеотидов, кодирующих антиген и/или эпитоп коронавируса, и композиций, содержащих линейные полирибонуклеотиды, кодирующие антиген и/или эпитоп коронавируса. В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды и/или иммуногенные композиции применяют в способах обеспечения образования иммунного ответа в отношении антигена и/или эпитопа из коронавируса посредством введения линейного полирибонуклеотида и/или иммуногенной композиции субъекту или иммунизации субъекта с помощью линейного полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую антиген и/или

эпитоп коронавируса, и/или иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект) может представлять собой млекопитающее, например копытное. Подлежащий иммунизации субъект может представлять собой человека. В некоторых вариантах осуществления подлежащий иммунизации субъект представляет собой животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы.

Настоящее изобретение также в целом относится к способам обеспечения образования или получения поликлональных антител, которые связываются с антигеном и/или эпитопом из коронавируса, у субъекта с применением кольцевых полирибонуклеотидов или иммуногенных композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления подлежащий иммунизации субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления подлежащий иммунизации субъект представляет собой животное, отличное от человека (например, копытное). В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризуется наличием гуманизированной иммунной системы. В конкретном варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид, который кодирует антигены и/или эпитопы из коронавируса, и/или иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий антиген и/или эпитоп коронавируса, вводят животному, отличному от человека, с гуманизированной иммунной системой, тем самым стимулируя выработку человеческих поликлональных антител, которые связываются с антигенами и/или эпитопами из коронавируса.

Настоящее изобретение также в целом относится к способам обеспечения образования или получения поликлональных антител, которые связываются с антигеном и/или эпитопом из коронавируса, у субъекта с применением линейных полирибонуклеотидов или иммуногенных композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления подлежащий иммунизации субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления подлежащий иммунизации субъект представляет собой животное, отличное от человека (например, копытное). В варианте осуществления линейный полирибонуклеотид, который кодирует антигены и/или эпитопы из коронавируса, и/или иммуногенную композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид, кодирующий антиген и/или эпитоп коронавируса, вводят животному, отличному от человека, с гуманизированной иммунной системой, тем самым стимулируя выработку человеческих поликлональных антител, которые связываются с антигенами и/или эпитопами из коронавируса.

В дополнительных вариантах осуществления полученные поликлональные антитела подвергают очистке. Очищенные поликлональные антитела являются подходящими для применения в качестве средства для профилактики коронавируса или лечения коронавирусной инфекции. Очищенные поликлональные антитела можно вводить
5 подлежащему лечению субъекту. Схематический пример способов, описанных в данном документе, представлен на фиг. 2.

КОЛЬЦЕВОЙ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИД

Кольцевые полирибонуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп из коронавируса. Данный
10 кольцевой полирибонуклеотид обеспечивает экспрессию последовательности, кодирующей антиген и/или эпитоп из коронавируса, в организме субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, предусматривающие антиген и/или эпитоп коронавируса, они применяются для получения иммунного ответа у субъекта (например, подлежащего
15 иммунизации субъекта). В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, предусматривающие антиген и/или эпитоп коронавируса, применяются для получения поликлональных антител, описанных в данном документе.

Антигены и эпитопы коронавируса

Кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую
20 антиген или эпитоп коронавируса. Антигены и/или эпитопы, раскрытые в данном документе, ассоциированы с коронавирусами. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы экспрессируются коронавирусом или получены из антигена и/или эпитопа, которые экспрессируются коронавирусом.

Антиген представляет собой молекулу, содержащую один или несколько эпитопов
25 (как линейные, так и конформационные, либо и те, и другие), которые будут вызывать адаптивный иммунный ответ у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). Эпитоп может представлять собой часть антигена, которую распознает, на которую нацеливается или которую связывает указанное антитело или Т-клеточный рецептор. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, например, непрерывную
30 последовательность аминокислот. Эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, например эпитоп, который содержит аминокислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации белка. Конформационный эпитоп может содержать несмежные аминокислоты из первичной аминокислотной последовательности. Как правило, эпитоп будет содержать от приблизительно 3 до 15, в целом приблизительно 5-15 аминокислот.

Длина В-клеточного эпитопа, как правило, составляет приблизительно 5 аминокислот, но может составлять всего 3-4 аминокислоты. Т-клеточный эпитоп, такой как эпитоп CTL, будет содержать по меньшей мере приблизительно 7-9 аминокислот, и эпитоп хелперной Т-клетки будет содержать по меньшей мере приблизительно 12-20 аминокислот. Как правило, эпитоп будет содержать от приблизительно 7 до 15 аминокислот, например 9, 10, 12 или 15 аминокислот.

Антиген или эпитоп коронавируса могут представлять собой или могут предусматривать целый белок, пептид, гликопротеин, липопротеин, фосфопротеин, рибонуклеопротеин, углевод (например, полисахарид), липид (например, фосфолипид или триглицерид) или нуклеиновую кислоту (например, ДНК, РНК) или их часть.

Антиген или эпитоп коронавируса могут предусматривать белковый антиген или эпитоп (например, пептидный антиген или пептидный эпитоп из белка, гликопротеина, липопротеина, фосфопротеина или рибонуклеопротеина). Антиген или эпитоп могут содержать аминокислоту, сахар, липид, фосфорильную или сульфонильную группу или их комбинацию.

Белковый антиген или эпитоп коронавируса могут предусматривать посттрансляционную модификацию, например гликозилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование, амидирование, гидроксильное, сульфатирование или липидизацию.

В некоторых вариантах осуществления коронавируса представляет собой патогенный коронавирус. В некоторых вариантах осуществления коронавируса представляет собой респираторный патоген. В некоторых вариантах осуществления коронавируса представляет собой переносимый с кровью патоген. В некоторых вариантах осуществления коронавируса представляет собой кишечный патоген.

Неограничивающие примеры коронавирусов по настоящему изобретению включают коронавирус, ассоциированный с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV, например SARS-CoV-1, SARS-CoV-2), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), коронавирусы летучих мышей, зоонозные коронавирусы, которые могут инфицировать людей или других животных, недавно возникшие или недавно обнаруженные коронавирусы и другие коронавирусы.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы коронавируса, ассоциированного с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы SARS-CoV-1. В некоторых

вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы зоонозного коронавируса, который может инфицировать людей или других животных. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы из недавно возникшего коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы представителя семейства Coronaviridae.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы от представителей рода или подрода, которые представляют собой Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus, Deltacoronavirus, Merbecovirus или Sarbecovirus. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы представителя рода Betacoronavirus. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы представителя подрода Sarbecovirus. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антигены и/или эпитопы представителя подрода Merbecovirus.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность для антигена из коронавируса, который представляет собой патоген уровня биологической безопасности 2 (BSL-2). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность из коронавируса, который представляет собой патоген уровня биологической безопасности 3 (BSL-3). В некоторых вариантах осуществления коронавирус представляет собой патоген уровня биологической безопасности 4 (BSL-4). В некоторых вариантах осуществления отсутствуют доступные одобренные лекарственные средства (например, противовирусные лекарственные средства или антибиотики) для лечения инфекции, вызванной коронавирусом, из которого получен антиген, экспрессируемый кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления отсутствуют доступные одобренные вакцины для предупреждения или снижения риска инфекции, вызванной коронавирусом, из которого получен антиген, экспрессируемый кольцевым полирибонуклеотидом.

Антиген и/или эпитоп могут быть получены из поверхностного белка коронавируса, мембранного белка коронавируса, белка оболочки коронавируса, капсидного белка

коронавируса, нуклеокапсидного белка коронавируса, шиповидного белка коронавируса, рецептор-связывающего домена (RBD) из шиповидного белка коронавируса, белка проникновения коронавируса, белка слияния мембран коронавируса, структурного белка коронавируса, неструктурного белка коронавируса, регуляторного белка коронавируса, вспомогательного белка коронавируса, секретируемого белка коронавируса, белка полимеразы коронавируса, РНК-полимеразы коронавируса, протеазы коронавируса, гликопротеина коронавируса, фузогена коронавируса, спирального капсидного белка коронавируса, икосаэдрического капсидного белка коронавируса, матриксного белка коронавируса, репликазы коронавируса, фактора транскрипции коронавируса или фермента коронавируса.

Антигены и/или эпитопы из любого количества коронавирусов экспрессируются кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых случаях антигены и/или эпитопы ассоциированы с одним коронавирусом, раскрытым в данном документе, или экспрессируются им. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы ассоциированы с двумя или больше коронавирусами, раскрытыми в данном документе, или экспрессируются ими.

В некоторых случаях два или больше коронавирусов фенотипически связаны. Например, в композициях и способах по настоящему изобретению могут использоваться антигены и/или эпитопы из двух или больше коронавирусов, которые представляют собой респираторные патогены, двух или больше коронавирусов, которые ассоциированы с тяжелым заболеванием, двух или больше коронавирусов, которые ассоциированы с нежелательными исходами у субъектов с ослабленным иммунитетом (например, субъектов, подлежащих иммунизации), двух или больше коронавирусов, которые ассоциированы с острым респираторным дистресс-синдромом (ARDS), двух или больше коронавирусов, которые ассоциированы с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS), двух или больше коронавирусов, которые ассоциированы с ближневосточным респираторным синдромом (MERS), или их комбинация.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать или кодировать, например, антигены и/или эпитопы из по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100 или больше коронавирусов.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует антигены и/или эпитопы из не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100 или менее коронавирусов.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует антигены и/или эпитопы из приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, или 100, коронавирусов.

В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп получены из коронавируса, например коронавируса, ассоциированного с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV, например SARS-CoV-1, SARS-CoV-2), коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) или другого коронавируса. В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп по настоящему изобретению получены из предсказанной открытой рамки считывания из генома коронавируса.

Новые изоляты SARS можно идентифицировать с помощью процентной доли гомологии, составляющей 99%, 98%, 97%, 95%, 92%, 90%, 85% или 80% гомологии полинуклеотидной последовательности для конкретных геномных областей для нового вируса по сравнению с полинуклеотидной последовательностью для конкретных геномных областей известных вирусов SARS. Кроме того, новые изоляты SARS можно идентифицировать с помощью процентной доли гомологии, составляющей 99%, 98%, 97%, 95%, 92%, 90%, 85% или 80% гомологии полипептидной последовательности, кодируемой полинуклеотидом из конкретных геномных областей нового вируса SARS, по сравнению с полипептидной последовательностью, кодируемой полинуклеотидами из конкретных областей известного вируса SARS. Данные геномные области могут включать области (например, продукты гена или ORF), которые обычно являются общими для ряда коронавирусов, а также группоспецифические области (например, антигенные группы), такие как, например, любая из следующих геномных областей, которые могут быть легко идентифицированы вирусологом, являющимся специалистом в данной области техники: 5'-нетранслируемая область (UTR), лидерная последовательность, ORF1a, ORF1b, неструктурный белок 2 (NS2), гликопротеин гемагглютинин-эстераза (HE) (также называемый E3), шиповидный гликопротеин (S) (также называемый E2), ORF3a, ORF3b, неструктурный белок 4 (NS4), белок оболочки (малый мембранный) (E) (также называемый

sM), мембранный гликопротеин (M) (также называемый E1), ORF5a, ORF5b, нуклеокапсидный фосфопротеин (N), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF8a, ORF8b, ORF9a, ORF9b, ORF10, межгенные последовательности, рецептор-связывающий домен (RBD) из шиповидного белка, 3'UTR или РНК-зависимая РНК-полимераза (pol). Вирус SARS может
5 содержать геномные области, идентифицируемые с одной или несколькими идентифицированными выше геномными областями. Вирусный антиген SARS включает белок, кодируемый любой из данных геномных областей. Вирусный антиген SARS может представлять собой белок или его фрагмент, которые являются высококонсервативными для коронавируса. Вирусный антиген SARS может представлять собой белок или его
10 фрагмент, которые являются специфическими для рассматриваемого вируса SARS (по сравнению с известными коронавирусами).

В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп по настоящему изобретению получены из предсказанного транскрипта с генома SARS-CoV. В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп по настоящему изобретению получены из
15 белка, кодируемого открытыми рамками считывания из генома SARS-CoV. Неограничивающие примеры открытых рамок считывания в геномах SARS-CoV могут включать ORF1a, ORF1b, ORF для шиповидного белка (S), ORF3a, ORF3b, ORF для белка оболочки (E), ORF для мембранного белка (M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF8a, ORF8b, ORF9a, ORF9b, ORF для нуклеокапсидного белка (N) и ORF10.

ORF1a и ORF1b кодируют 16 неструктурных белков (nsp), например nsp1, nsp2, nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp7, nsp8, nsp9, nsp10, nsp11, nsp12, nsp13, nsp14, nsp15 и nsp16. Неструктурные белки, например, участвуют в репликации вируса, сборке вируса, модуляции иммунного ответа или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой неструктурный белок или представляет собой антигенную
25 последовательность, кодирующую неструктурный белок. В некоторых вариантах осуществления эпитопы получены из неструктурного белка коронавируса.

ORF для шиповидного белка (S) кодирует шиповидный белок, который в некоторых вариантах осуществления участвует в связывании с рецептором клетки-хозяина, слиянии вируса с мембраной клетки-хозяина, проникновении вируса в клетку-хозяина или их
30 комбинации. Шиповидный белок может представлять собой антиген. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению получены из шиповидного белка. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению предусматривают рецептор-связывающий домен шиповидного белка. В некоторых

вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению предусматривают ACE2-связывающий домен шиповидного белка.

ORF для белка оболочки (E) кодирует белок оболочки, который в некоторых вариантах осуществления участвует в сборке вируса и морфогенезе. Белок оболочки может представлять собой антиген. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению получены из белка оболочки коронавируса.

ORF для мембранного белка (M) кодирует мембранный белок, который в некоторых вариантах осуществления участвует в сборке вируса. Мембранный белок может представлять собой антиген. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению получены из мембранного белка коронавируса.

ORF для нуклеокапсидного белка (N) кодирует нуклеокапсидный белок, который в некоторых вариантах осуществления может образовывать комплексы с геномной РНК и участвовать в сборке вируса и/или взаимодействовать с белком М. Нуклеокапсидный белок может представлять собой антиген. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению получены из нуклеокапсидного белка коронавируса.

ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF8a, ORF8b, ORF9a, ORF9b, и ORF10 кодируют вспомогательные белки. В некоторых вариантах осуществления вспомогательные белки могут модулировать передачу сигнала в клетке-хозяине, модулировать виды иммунного ответа клетки-хозяина, могут быть включены в зрелые вирионы в качестве малых структурных белков или выполнять комбинацию вышеперечисленного. Вспомогательный белок может представлять собой антиген. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению получены из вспомогательного белка коронавируса.

В композициях и способах по настоящему изобретению могут использоваться антигены и/или эпитопы, которые кодируются одной или несколькими открытыми рамками считывания из генома SARS-CoV или получены из них. Например, антигены и/или эпитопы могут кодироваться ORF1a, ORF1b, ORF для шиповидного белка (S), ORF3a, ORF3b, ORF для белка оболочки (E), ORF для мембранного белка (M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF8a, ORF8b, ORF9a, ORF9b, ORF для нуклеокапсидного белка (N), ORF10 или любой их комбинацией или могут быть получены из них.

В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению получены из шиповидного белка. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению содержат рецептор-связывающий домен (RBD) из шиповидного белка. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению

предусматривают ACE2-связывающий домен шиповидного белка. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению содержат субъединицу S1 из шиповидного белка, субъединицу S2 из шиповидного белка или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления эпитопы по настоящему изобретению содержат

5 внеклеточный домен шиповидного белка. В некоторых вариантах осуществления эпитоп по настоящему изобретению содержит Gln498, Thr500, Asn501 или их комбинацию из шиповидного белка коронавируса. В некоторых вариантах осуществления эпитоп по настоящему изобретению содержит Lys417, Tyr453 или их комбинацию из шиповидного

10 белка коронавируса. В некоторых вариантах осуществления эпитоп по настоящему изобретению содержит Gln474, Phe486 или их комбинацию из шиповидного белка коронавируса. В некоторых вариантах осуществления эпитоп по настоящему изобретению содержит Gln498, Thr500, Asn501, Lys417, Tyr453, Gln474, Phe486, одну или несколько эквивалентных аминокислот из варианта или производного шиповидного белка или их

15 комбинацию из шиповидного белка коронавируса. В некоторых вариантах осуществления шиповидный белок по настоящему изобретению содержит мутацию D614G, а именно содержит аминокислоту глицин (G) в положении 614 вместо аспарагиновой кислоты (D). В некоторых вариантах осуществления эпитоп по настоящему изобретению содержит Gly614 из варианта или производного шиповидного белка или их комбинацию из шиповидного

20 белка коронавируса. В некоторых случаях мутация D614G может приводить к снижению уровня шеддинга S1 и повышению инфекционности коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF1a или получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF1b SARS-CoV или получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF

25 для шиповидного белка SARS-CoV или получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF3a SARS-CoV или получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF3b SARS-CoV или получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF для белка оболочки

30 (E) SARS-CoV или получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF для мембранного белка (M) SARS-CoV или получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF6 SARS-CoV или получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы кодируются с помощью ORF7a SARS-CoV или получены из нее.

кодируются с помощью ORF9a SARS-CoV или не получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы не кодируются с помощью ORF9b SARS-CoV или не получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы не кодируются с помощью ORF для нуклеокапсидного белка (N) SARS-CoV или не получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы не кодируются с помощью ORF10 SARS-CoV или не получены из нее. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы не кодируются с помощью ORF для шиповидного белка (S), ORF для белка оболочки (E), ORF для мембранного белка (M) и ORF для нуклеокапсидного белка (N) SARS-CoV или получены из них.

10 Антиген и/или эпитоп могут кодироваться SARS-CoV2 или могут быть получены из него.

 Неограничивающий пример генома SARS-CoV-2 представлен в DB Source под номером доступа MN908947.3, полная геномная последовательность изолята коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Номер доступа в DB Source 15 MN908947.3: 21563-25384 соответствует S-белку, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Неограничивающий пример шиповидного белка SARS-CoV-2 представлен в GenBank виде последовательности QHD43416.1, представляющей собой последовательность шиповидного белка изолята коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

 Неограничивающий пример генома SARS-CoV-2 представлен в виде последовательности в NCBI, представляющей собой эталонную последовательность под номером доступа NC_045512 версии NC_045512.2, представляющую собой полную геномную последовательность изолята Wuhan-Hu-1 коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

 Неограничивающий пример генома SARS-CoV-2 представлен в виде последовательности в NCBI, представляющей собой эталонную последовательность под номером доступа MW450666, представляющую собой полную геномную последовательность изолята коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Неограничивающий пример генома SARS-CoV-2 представлен в виде последовательности в NCBI, представляющей собой эталонную последовательность под номером доступа MW487270, представляющую собой полную геномную последовательность линии B.1.1.7 коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Неограничивающий пример генома SARS-CoV-2 представлен в виде последовательности в GISAID, представляющей собой эталонную последовательность под номером доступа EPI_ISL_792683, представляющую собой полную геномную последовательность линии P.1 коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Неограничивающий пример генома SARS-CoV-2 представлен в виде последовательности в GISAID, представляющей собой эталонную последовательность под номером доступа EPI_ISL_678615, представляющую собой полную геномную последовательность линии B.1.351 коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Неограничивающие примеры генома SARS-CoV-2 представлены в виде последовательностей в NCBI, представляющих собой эталонные последовательности под номерами доступа MW972466-MW974550, представляющие собой полную геномную последовательность линий B.1.427 и B.1.429 коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Неограничивающие примеры генома SARS-CoV-2 представлены в виде последовательностей в NCBI, представляющих собой эталонные последовательности под номерами доступа MZ156756-MZ226428, представляющие собой полную геномную последовательность коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления геном SAR-CoV-2 представлен в базе данных GISAID на сайте www.gisaid.org. В некоторых вариантах осуществления геном SAR-CoV-2 представлен в International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) на сайте www.insdc.org.

В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп по настоящему изобретению получены из предсказанного транскрипта с генома SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп по настоящему изобретению получены из белка, кодируемого открытыми рамками считывания из генома SARS-CoV-2, или его производного. Неограничивающие примеры открытых рамок считывания в геноме SARS-CoV-2 включают ORF1a, ORF1b, ORF для шиповидного белка (S), ORF3a, ORF для белка оболочки (E), ORF для мембранного белка (M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF для нуклеокапсидного белка (N) и ORF10. В некоторых вариантах осуществления геном SARS-CoV-2 кодирует ORF3b, ORF9a, ORF9b или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления геном SARS-CoV-2 не кодирует ORF3b, ORF9a, ORF9b или любую их комбинацию.

Неограничивающие примеры аминокислотных последовательностей представлены в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антиген содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью из таблицы 1.

ТАБЛИЦА 1. Примеры аминокислотной последовательности белков, кодируемых геномом SARS-CoV-2.

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Шиповидный белок (S)	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPD KVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFD NPVLPFNDGVYFASTKSNIRGWIFGTTLDLSDKTSLLIVN NATNVVIKVCDFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVY SSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGY FKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLA LHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRFTLLKYNEN GTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPT ESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVAD YSVLNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRG DEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDS KVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGV EGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPAT VCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPF QQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNT

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		SNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVF QTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRA RSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEIL PVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC SNLLLQYGSFCTQLNRAL TGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPD PSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDL ICAQKFNGLTVLPLL TDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGA GAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNS AIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSN FGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQ QLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHL MSFPQSAPHGVVFLHVTVPAQEKNFTTAPAICHGDKAH FPREGV FVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDV VIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDI SGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYI KWPWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCCMTSCC SCLKGCCSC GSCCKFDEDDSEPV LKGVKLHYT
2	Белок оболочки (E)	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLVTLAILTALRLCA YCCNIVNVS LKPSFYVYSRVKNLNSSRVPDLLV
3	Мембранный белок (M)	MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFTWICLLQFAYA NRRNFLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLA AVYRINWITGGIA IAMACL VGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILLN VPLHGTILTRP LLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKD LPKEITVATSRTLSYYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGN YKLNTDHSSSSDNIALLVQ
4	Нуклеокапсидн ый белок (N)	MSDNGPQNQRNAPRITFGG PSDSTGSNQN GERSGARSKQ RRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGV PINTNSS PDDQIGYYRRATTRIRGGDGKMKDLSPRWYFY YLGTGPE AGLPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIV LQLPQGTTL PKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRN SSRNSTP

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		GSSRGTSPARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKG QQQQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGR RGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFG MSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNK HIDAYKTFPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTIVTL LPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA
5	Вспомогательный белок ORF3a	MDLFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQASLP FGWLIVGVALLAVFQSASKIITLKKRWQLALSKGVHFVCN LLLLFVTVYSHLLLVAAGLEAPFLYLYALVYFLQSINFVRI IMRLWLCWKCRCRKNPLLYDANYFLCWHTNCYDYCIPYNS VTSSIVITSGDGTTSPISEHDYQIGGYTEKWESGVKDCVVL HSYFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVTFEYFNKIVDEPEEHV QIHTIDGSSGVVNPVMEPIYDEPTTTTTSVPL
6	Вспомогательный белок ORF6	MFHLVDFQVTIAEILLIIMRTFKVSIWNLDYIINLIKNLSKS LTENKYSQLDEEQPMEID
7	Вспомогательный белок ORF7a	MKIILFLALITLATCELYHYQECVRGTTVLLKEPCSSGTYE GNSPFHPLADNKFALTCFSTQFAFACPDGVKHVYQLRARS VSPKLFIRQEEVQELYSPIFLIVAAIVFITLCTLKRKTE
8	Вспомогательный белок ORF7b	MIELSLIDFYLCFLAFLFLVLIMLIIFWFSLELQDHNETCH A
9	Вспомогательный белок ORF8	MKFLVFLGHTTVAAAFHQECSLQSQCTQHQPYYVDDPCPIHF YSKWYIRVGARKSAPLIELCVDEAGSKSPIQYIDIGNYTVS CLPFTINCQEPKLGSLVVRCSFYEDFLEYHDVRRVVLDFI
10	Вспомогательный белок ORF10	MGYINVFAFPFTIYSLLLCRMNSRNYIAQVDVVNFNLT

Дополнительные неограничивающие примеры белков, кодируемых геномом SARS-CoV-2, включают таковые с содержанием под номерами доступа в NCBI MT334522, MT334523, MT334524, MT334525, MT334526, MT334527, MT334528, MT334529, MT334530, MT334531, MT334532, MT334533, MT334534, MT334535, MT334536, 5 MT334537, MT334538, MT334539, MT334540, MT334541, MT334542, MT334543, MT334544, MT334545, MT334546, MT334555, MT334547, MT334548, MT334549, MT334550, MT334551, MT334552, MT334553, MT334554, MT334556, MT334557, MT334558, MT334559, MT334560, MT334561, MT334562, MT334563, MT334564, MT334565, MT334566, MT334567, MT334568, MT334569, MT334570, MT334571, 10 MT334572, MT334573, MT326097, MT326106, MT326107, MT326116, MT326117, MT326124, MT326125, MT326126, MT326127, MT326134, MT326135, MT326136, MT326137, MT326138, MT326139, MT326140, MT326141, MT326142, MT326143, MT326144, MT326145, MT326146, MT326148, MT326149, MT326150, MT326151, MT326152, MT326158, MT326159, MT326160, MT326161, MT326162, MT326168, 15 MT326169, MT326170, MT326171, MT326172, MT326178, MT326179, MT326180, MT326181, MT326182, MT326183, MT326188, MT326189, MT326190, MT326191, MT326129, MT326121, MT326120, MT326119, MT326118, MT326111, MT326023, MT326025, MT326033, MT326035, MT326036, MT326040, MT326043, MT326045, MT326053, MT326055, MT326056, MT326063, MT326066, MT326070, MT326071, 20 MT326072, MT326075, MT326076, MT326078, MT326079, MT326089, MT325563, MT325565, MT325566, MT326155, MT326163, MT326177, MT326130, MT326128, MT326110, MT326109, MT326108, MT326101, MT326100, MT326099, MT326098, MT326094, MT326093, MT326092, MT325568, MT325569, MT325590, MT325640, MT325606, MT325607, MT325608, MT325609, MT325610, MT325611, MT325616, 25 MT325618, MT325619, MT325620, MT325622, MT325623, MT325624, MT325599, MT325600, MT325601, MT325602, MT325612, MT325613, MT325615, MT325617, MT325625, MT324062, MT324684, MT325573, MT325574, MT325577, MT325579, MT325586, MT325592, MT325593, MT325594, MT325598, MT325605, MT325626, MT325627, MT325633, MT325634, MT326028, MT326031, MT326091, MT326090, 30 MT326085, MT326084, MT326083, MT326082, MT326081, MT326080, MT326077, MT326067, MT326057, MT326024, MT326026, MT326027, MT326032, MT326034, MT326037, MT326039, MT326041, MT326042, MT326044, MT326046, MT326047, MT326049, MT326050, MT326051, MT326052, MT326054, MT326059, MT326060, MT326061, MT326062, MT326064, MT326065, MT326068, MT326069, MT326073,

MT326074, MT326088, MT327745, MT324679, MT325561, MT325571, MT325572,
MT325575, MT325583, MT325587, MT325588, MT325589, MT325596, MT325597,
MT325603, MT325604, MT325614, MT325621, MT325629, MT325630, MT325631,
MT325632, MT325635, MT325636, MT325637, MT325638, MT325639, MT326086,
5 MT326096, MT326102, MT326104, MT326105, MT326112, MT326113, MT326114,
MT326115, MT326122, MT328034, MT325564, MT325567, MT326164, MT326165,
MT326173, MT326174, MT326184, MT326185, MT326186, MT326187, MT325584,
MT325585, MT326087, MT326095, MT326103, MT326123, MT326131, MT326132,
MT326133, MT328033, MT325562, MT326147, MT326153, MT326154, MT326156,
10 MT326157, MT326166, MT326167, MT326175, MT326176, MT324680, MT325570,
MT325576, MT325578, MT325580, MT325581, MT325582, MT325591, MT325595,
MT325628, MT326029, MT326030, MT326038, MT326048, MT326058, MT324681,
MT324682, MT324683, MT328032, MT328035, MT322404, MT039874, MT322398,
MT322409, MT322421, MT322423, MT322408, MT322413, MT322417, MT322394,
15 MT322407, MT322418, MT322424, MT322411, MT077125, MT322395, MT322396,
MT322397, MT322399, MT322400, MT322401, MT322402, MT322403, MT322405,
MT322406, MT322414, MT322416, MT322419, MT322420, MT322410, MT322412,
MT322415, MT322422, MT320538, MT320891, MT308692, MT308693, MT308695,
MT308696, MT308698, MT308699, MT308701, MT308703, MT308704, MT308694,
20 MT308697, MT308700, MT308702, MT293547, MT304476, MT304474, MT304475,
MT304477, MT304478, MT304479, MT304481, MT304482, MT304484, MT304485,
MT304486, MT304487, MT304488, MT304491, MT304480, MT304483, MT304489,
MT304490, MT300186, MT292571, MT292576, MT292578, MT293186, MT292570,
MT292573, MT293173, MT292575, MT293179, MT293180, MT293184, MT293189,
25 MT293192, MT293193, MT293194, MT293201, MT293202, MT292572, MT292577,
MT293185, MT293187, MT293188, MT291826, MT291832, MT291833, MT291835,
MT291836, MT291831, MT293170, MT292574, MT293178, MT293181, MT293183,
MT293195, MT293196, MT293197, MT293203, MT293204, MT293223, MT293212,
MT293214, MT293215, MT293216, MT293219, MT293224, MT293225, MT293206,
30 MT293208, MT293209, MT293221, MT295464, MT293160, MT293166, MT293171,
MT293190, MT293161, MT293167, MT293168, MT293174, MT293175, MT293182,
MT293191, MT293158, MT293162, MT293163, MT293164, MT293156, MT293157,
MT293159, MT291834, MT291829, MT291827, MT291830, MT291828, MT293169,
MT293200, MT293210, MT293211, MT293217, MT293218, MT295465, MT293198,

MT293205, MT293207, MT293213, MT293220, MT293222, MT292581, MT292569,
MT293172, MT293177, MT293176, MT293199, MT292580, MT292582, MT293165,
MT292579, MT273658, MT281577, MT281530, MT276597, MT276598, MT276323,
MT276328, MT276331, MT276329, MT276330, MT276324, MT276325, MT276327,
5 MT276326, MT263388, MT263392, MT262900, MT262902, MT262906, MT262908,
MT262912, MT262913, MT262914, MT262993, MT263074, MT263381, MT263391,
MT262901, MT262903, MT262907, MT262909, MT262911, MT262899, MT262904,
MT262915, MT262916, MT262897, MT262898, MT262905, MT262910, MT263400,
MT263382, MT263383, MT263384, MT263385, MT262896, MT263407, MT263415,
10 MT263406, MT263408, MT263422, MT263469, MT263439, MT263457, MT263459,
MT263432, MT263450, MT263458, MT263467, MT263401, MT263411, MT263413,
MT263426, MT263421, MT263443, MT263412, MT263416, MT263417, MT263423,
MT263431, MT263461, MT263410, MT263424, MT263425, MT263427, MT263442,
MT263402, MT263405, MT263409, MT263418, MT263419, MT263398, MT263399,
15 MT263403, MT263404, MT263414, MT263430, MT263390, MT263434, MT263436,
MT263446, MT263448, MT263452, MT263453, MT263456, MT263462, MT263463,
MT263386, MT263387, MT263389, MT263428, MT263429, MT263433, MT263435,
MT263437, MT263438, MT263440, MT263447, MT263449, MT263455, MT263444,
MT263445, MT263451, MT263466, MT263420, MT263441, MT263454, MT263464,
20 MT263465, MT263468, MT263460, MT263393, MT263394, MT263395, MT263396,
MT263397, MT259226, MT259275, MT259276, MT259279, MT259247, MT258377,
MT258378, MT258379, MT259231, MT259228, MT259238, MT259248, MT256917,
MT259227, MT259236, MT256918, MT258380, MT259235, MT259237, MT259239,
MT259281, MT259282, MT259283, MT259240, MT259243, MT259249, MT259250,
25 MT259251, MT259256, MT259258, MT259266, MT259267, MT259274, MT259286,
MT259287, MT259241, MT259242, MT258381, MT259257, MT259261, MT259262,
MT259263, MT259264, MT259268, MT259269, MT259270, MT259271, MT259272,
MT259273, MT259277, MT259278, MT259280, MT258383, MT258382, MT259246,
MT256924, MT259244, MT259245, MT259252, MT259253, MT259254, MT259255,
30 MT259259, MT259284, MT259229, MT259230, MT259265, MT259260, MT259285,
LC534419, LC534418, MT253710, MT253709, MT253705, MT253708, MT253701, MT253702,
MT253703, MT253704, MT253706, MT253707, MT251972, MT251974, MT251975,
MT251973, MT251976, MT251979, MT253697, MT253699, MT253696, MT253698,
MT253700, MT251977, MT251978, MT251980, MT246451, MT246461, MT246471,

MT246472, MT246474, MT246483, MT246450, MT246453, MT246454, MT246462,
MT246463, MT246464, MT246470, MT246473, MT246480, MT246484, MT246449,
MT246455, MT246456, MT246478, MT246485, MT246488, MT246452, MT246460,
MT246465, MT246481, MT246482, MT246490, MT246459, MT246468, MT246475,
5 MT246477, MT246479, MT246457, MT246458, MT246466, MT246467, MT246469,
MT246476, MT246486, MT246487, MT246489, MT233526, MT246667, MT240479,
MT232870, MT232871, MT233523, MT232869, MT232872, MT233519, MT233521,
MT233522, MT233520, MT226610, MT198653, MT198651, MT198652, MT192773,
MT192758, MT192772, MT192765, MT192759, MT188341, MT188340, MT188339,
10 MT186676, MT186681, MT186677, MT186678, MT187977, MT186680, MT186682,
MT186679, MT184909, MT184911, MT184912, MT184913, MT184910, MT184907,
MT184908, CADDYA000000000, MT163718, MT163719, MT163720, MT163714, MT163715,
MT163721, MT163717, MT163737, MT163738, MT163712, MT163716, MT159706,
MT159716, MT159719, MT159707, MT159717, MT159709, MT159715, MT159718,
15 MT159722, MT159708, MT161607, MT159705, MT159710, MT159711, MT159712,
MT159713, MT159714, MT159720, MT159721, MT121215, MT159778, MT066156,
LC529905, MT050493, MT012098, MT152900, MT152824, MT135044, MT135042,
MT135041, MT135043, MT126808, MT127113, MT127114, MT127116, MT127115,
LC528232, LC528233, MT123293, MT123291, MT123290, MT123292, MT118835, MT111896,
20 MT111895, MT106052, MT106053, MT106054, MT093571, MT093631, MT081061,
MT081063, MT081066, MT081062, MT081064, MT081065, MT081067, MT081059,
MT081060, MT081068, MT072667, MT072668, MT072688, MT066157, MT066176,
MT066159, MT066175, MT066158, LC523809, LC523807, LC523808, MT044258, MT044257,
MT050416, MT050417, MT042773, MT042774, MT042775, MT042776, MT049951,
25 MT050414, MT050415, MT042777, MT042778, MT039887, MT039888, MT039890,
MT039873, LC522350, MT027062, MT027063, MT027064, MT020881, MT019530,
MT019531, MT019533, MT020880, MT019532, MT019529, MT020781, LR757995, LR757998,
LR757996, LR757997, MT007544, MT008022, MT008023, MN996531, MN996530,
MN996527, MN996528, MN996529, MN997409, MN988668, MN988669, MN994467,
30 MN994468, MN988713, MN938384, MN975262, MN985325, MN938386, MN938388,
MN938385, MN938387, MN938390, MN938389, MN975263, MN975267, MN975268,
MN975265, MN975264, MN975266, MN970004, MN970003, MN908947, каждый из которых
включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В определенных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит антиген SARS-CoV-2, описанный в **таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления антиген содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью из **таблицы 2**.

ТАБЛИЦА 2. Описания конструкций и ORF SARS-CoV-2

Конструкция	ORF (SEQ ID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	IRES
p1 SEQ ID NO. 12	1 (13)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью удален и добавлен домен тримеризации	Да	Да	Нет	CVB 3
p3 SEQ ID NO 14	3 (15)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью интактный	Да	Да	Нет	CVB 3
p5 SEQ ID NO 16	5 (17)	Трансмембранный домен (TM) S-белка частично удален (111 из 195 нуклеотидов были удалены) (нуклеотиды	Да	Да	Нет	CVB 3

Конструкция	ORF (SEQ ID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	IRES
		3709-3819 были удалены)				
p7 SEQ ID NO 18	7 (19)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью удален и добавлен домен тримеризации	Да	Да	Да	CVB 3
p9 SEQ ID NO. 20	9 (21)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью интактный	Да	Да	Да	CVB 3
p11 SEQ ID NO. 22	11 (23)	Трансмембранный домен (TM) S-белка частично удален (111 из 195 нуклеотидов были удалены) (нуклеотиды 3709-3819 были удалены)	Да	Да	Да	CVB 3
p13 SEQ ID NO 24	13 (25)	Рецептор-связывающий домен (RBD) S-	Н. п.	Н. п.	Н. п.	CVB 3

Конструкция	ORF (SEQUID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	IRES
		белка, в котором только сигнал секреции трансляционно слит с 5'-концом				
p15	3 (15)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью удален и добавлен домен тримеризации	Да	Да	Н. п.	EMCV
p17	5 (17)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью интактный	Да	Да	Н. п.	EMCV
p19	1 (13)	Трансмембранный домен (TM) S-белка частично удален (111 из 195 нуклеотидов были удалены) (нуклеотиды	Да	Да	Н. п.	EMCV

Конструкция	ORF (SEQUID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	IRES
		3709-3819 были удалены)				
p21	7 (19)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью удален и добавлен домен тримеризации	Да	Да	Да	EMC V
p23	9 (21)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью интактный	Да	Да	Да	EMC V
p25	11 (23)	Трансмембранный домен (TM) S-белка частично удален (111 из 195 нуклеотидов были удалены) (нуклеотиды 3709-3819 были удалены)	Да	Да	Да	EMC V
p27	13 (25)	Рецептор-связывающий домен (RBD) S-	Н. п.	Н. п.	Н. п.	EMC V

Конструкция	ORF (SEQUENCE ID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	IRES
		белка, в котором только сигнал секреции трансляционно слит с 5'-концом				
p33	33 (26)	Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка, в котором только сигнал секреции трансляционно слит с 5'-концом и удален терминатор типа II RBD	Н. п.	Н. п.	Н. п.	EMCV
p35	35 (27)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью интактный и терминатор типа II RBD удален	Да	Да	Нет	EMCV

Конструкция	ORF (SEQ ID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	IRES
p36	36 (28)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью интактный и терминатор типа II RBD удален	Да	Да	Да	EMCV
p39	39 (29)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью интактный. GC-оптимизированная	Н. п.	Н. п.	Н. п.	EMCV
p41	41 (30)	Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка, в котором только сигнал секреции трансляционно слит с 5'-концом и удален терминатор типа II RBD.	Н. п.	Н. п.	Н. п.	EMCV

Конструкция	ORF (SEQUENCE ID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	IRES
		GC-оптимизированная				
p44	44 (48)	Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка, в котором только сигнал секретиции IL-2 трансляционно слит с 5'-концом и удален терминатор типа II RBD	Н. п.	Н. п.	Н. п.	EMCV
p45	45 (49)	Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка, в котором только сигнал секретиции Gluc трансляционно слит с 5'-концом и удален	Н. п.	Н. п.	Н. п.	EMCV

Конструкция	ORF (SEQ ID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	IRES
		терминатор типа II RBD				

В **таблице 2** "замены пролином" обозначают замены пролином в остатках 986 и 987, а также замену "GSAS" в сайте расщепления фурином (остатки 682-685). Для "оптимизации клонирования" осуществляли замену одного основания в координате 2541 с разрушением сайта BsaI для способствования конструированию ДНК-матрицы плазмиды для клонирования Golden Gate. Для "оптимизаций циркуляризации" четыре одиночных нуклеотида – в положениях 2307, 2790, 159 и 315 – были заменены с разрушением сайтов, которые потенциально могли связывать элементы циркуляризации из последовательностей нуклеиновой кислоты шунта, тем самым потенциально ингибируя эффективное лигирование. Для конструкций, в которых удален терминатор типа II (например, p33, p35, p36, p39, p41, p44, и p45), два одиночных нуклеотида – в положениях 1047, 1049 – были заменены с разрушением сайта терминатора типа II. Для конструкций, которые характеризуются GC-оптимизацией (например, p39 и p41), GC-оптимизацию осуществляли таким образом, чтобы содержание GC составляло примерно 50%. Все замены одиночных пар оснований были разработаны таким образом, чтобы они являлись трансляционно неактивными. Дополнительно, в **таблице 2** IRES представляет собой EMCV (SEQ ID NO: 31) или представляет собой CVB3 (SEQ ID NO: 45).

В некоторых вариантах осуществления антиген или эпитоп получены из клетки субъекта-хозяина (например, подлежащего иммунизации субъекта). Например, антитела, которые блокируют проникновение коронавируса, можно получать посредством применения антигена или эпитопа из компонента клетки-хозяина, который вирус использует в качестве фактора проникновения.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса предусматривает или содержит по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по

меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30 аминокислот или больше.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса предусматривает или
5 содержит не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 11, не более чем 12, не более чем 13, не более чем 14, не более чем 15, не более чем 16, не более чем 17, не более чем 18, не более чем 19, не более чем 20, не более чем 21, не более чем 22, не более чем 23, не более чем 24, не более чем 25, не более чем 26, не более чем 27, не более чем 28, не более чем 29 или не более чем
10 30 аминокислот или меньше. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса предусматривает или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса содержит 5 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса содержит 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп
15 эпитоп содержит 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса содержит 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может представлять собой от приблизительно 8 до приблизительно 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может представлять собой от приблизительно 9 до приблизительно 22 аминокислот.

20 Антигены коронавируса могут предусматривать антигены, распознаваемые В-клетками, антигены, распознаваемые Т-клетками, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антигены предусматривают антигены, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления антигены коронавируса представляют собой антигены, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления антигены коронавируса предусматривают антигены, распознаваемые Т-клетками. В
25 некоторых вариантах осуществления антигены представляют собой антигены, распознаваемые Т-клетками.

Эпитопы коронавируса предусматривают антигены, распознаваемые В-клетками, антигены, распознаваемые Т-клетками, или их комбинацию. В некоторых вариантах
30 осуществления эпитопы коронавируса предусматривают эпитопы, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления эпитопы представляют собой эпитопы, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления эпитопы коронавируса предусматривают эпитопы, распознаваемые Т-клетками. В некоторых вариантах

осуществления эпитопы коронавируса представляют собой эпитопы, распознаваемые Т-клетками.

Методики идентификации антигенов и эпитопов *in silico* были раскрыты, например, в работе Sanchez-Trincado, et al. (2017), Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction., Journal of immunology research; Grifoni, Alba, et al. A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2. Cell host & microbe (2020); Russi et al. In silico prediction of T-and B-cell epitopes in PmpD: First step towards to the design of a Chlamydia trachomatis vaccine. biomedical journal 41.2 (2018): 109-117; Baruah, et al. Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV. Journal of Medical Virology (2020); каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению может содержать последовательности любого количества антигенов и/или эпитопов коронавируса. Кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или больше антигенов или эпитопов коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из не более чем 1, не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450, не более чем 500 или меньше антигенов или эпитопов коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 антигенов или эпитопов коронавируса.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность для одного или нескольких эпитопов коронавируса из антигена коронавируса. Например, антиген коронавируса может предусматривать аминокислотную последовательность, которая может содержать несколько эпитопов коронавируса (например, эпитопов, распознаваемых В-клетками и/или Т-клетками), и кольцевой полирибонуклеотид может содержать или кодировать один или несколько из данных эпитопов коронавируса.

Кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или больше эпитопов из одного антигена коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит, например, последовательность из не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450 или не более чем 500 или меньше эпитопов коронавируса из одного антигена коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 эпитопов коронавируса из одного антигена коронавируса.

Кольцевой полирибонуклеотид может кодировать варианты антигена или эпитопа коронавируса. Варианты могут представлять собой встречающиеся в природе варианты (например, варианты, идентифицированные в данных о последовательностях, полученных от различных родов, видов, изолятов или квазивидов коронавируса) или могут представлять собой производные последовательности, раскрытые в данном документе, которые были образованы *in silico* (например, антиген или эпитопы с одной или несколькими

аминокислотными вставками, делециями, заменами или их комбинациями по сравнению с антигеном или эпитопом дикого типа).

Кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или больше вариантов антигена или эпитопа коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450, не более чем 500 или меньше вариантов антигена или эпитопа коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 вариантов антигена или эпитопа коронавируса.

Последовательность антигена и/или эпитопа коронавируса из кольцевого полирибонуклеотида может также называться экспрессионной последовательностью коронавируса. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей коронавируса, каждая из которых может кодировать полипептид коронавируса. Полипептид коронавируса может вырабатываться в значительных количествах. Полипептид коронавируса может представлять собой полипептид коронавируса, который секретируется из клетки или локализуется в цитоплазматическом, ядерном или мембранном компартменте клетки. Некоторые полипептиды коронавируса предусматривают без ограничения антиген, раскрытый в данном документе, эпитоп, раскрытый в данном документе, по меньшей мере

часть белка коронавируса (например, вирусного белка оболочки, вирусного матричного белка, вирусного шиповидного белка, вирусного рецептор-связывающего домена (RBD) из вирусного шиповидного белка, вирусного мембранного белка, вирусного нуклеокапсидного белка, вирусного вспомогательного белка, их фрагмента или их комбинации). В некоторых вариантах осуществления полипептид коронавируса, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, содержит фрагмент антигена коронавируса, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид коронавируса, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше антигенов коронавируса, раскрытых в данном документе, или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления полипептид коронавируса, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, содержит эпитоп коронавируса. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше эпитопов коронавируса, раскрытых в данном документе, например, искусственную пептидную последовательность, содержащую совокупность предсказанных эпитопов из одного или нескольких коронавирусов по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные белки коронавируса, которые экспрессируются из кольцевого полирибонуклеотида, раскрытого в данном документе, включают секретлируемый белок, например белок (например, антиген и/или эпитоп), который в естественных условиях содержит сигнальный пептид, или таковой, который обычно не кодирует сигнальный пептид, но модифицирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный пептид.

В некоторых случаях кольцевой полирибонуклеотид обеспечивает экспрессию секреторного белка коронавируса, который характеризуется коротким периодом полужизни в крови или представляет собой белок с сигналом субклеточной локализации или белок с секреторным сигнальным пептидом. В некоторых случаях кольцевой полирибонуклеотид обеспечивает экспрессию трансмембранного домена, который характеризуется коротким периодом полужизни в крови или представляет собой белок с сигналом субклеточной локализации или белок с секреторным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей коронавируса и имеет конфигурацию, обеспечивающую постоянную экспрессию в клетке субъекта (например,

подлежащего иммунизации субъекта) *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет такую конфигурацию, что уровень экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей коронавируса в клетке в более поздний момент времени равен уровню экспрессии в более ранний момент времени или превышает его. В таких вариантах осуществления уровень экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей коронавируса либо поддерживается на относительно стабильном уровне, либо повышается с течением времени. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии экспрессионных последовательностей коронавируса является относительно стабильным в течение продолжительного промежутка времени.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид обеспечивает экспрессию одного или нескольких антигенов и/или эпитопов коронавируса у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта), например временно или длительно. В определенных вариантах осуществления экспрессия экспрессионных последовательностей коронавируса сохраняется в течение от по меньшей мере приблизительно 1 ч до приблизительно 30 дней, или по меньшей мере приблизительно 2 ч, 6 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 60 дней или дольше или любого промежуточного периода времени. В определенных вариантах осуществления экспрессия антигенов и/или эпитопов коронавируса сохраняется в течение от не более чем приблизительно 30 мин до приблизительно 7 дней, или не более чем приблизительно 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 11 ч, 12 ч, 13 ч, 14 ч, 15 ч, 16 ч, 17 ч, 18 ч, 19 ч, 20 ч, 21 ч, 22 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 60 ч, 72 ч, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 45 дней, 60 дней, 75 дней, 90 дней или любого промежуточного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность коронавируса имеет длину менее чем 5000 п. о. (например, менее чем приблизительно 5000 п. о., 4000 п. о., 3000 п. о., 2000 п. о., 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о., 100 п. о., 50 п. о., 40 п. о., 30 п. о., 20 п. о., 10 п. о. или меньше). В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность коронавируса имеет, независимо или дополнительно, длину более чем 10 п. о. (например, по меньшей мере приблизительно 10 п. о., 20 п. о., 30 п. о., 40 п. о., 50 п. о., 60 п. о., 70 п. о.,

80 п. о., 90 п. о., 100 п. о., 200 п. о., 300 п. о., 400 п. о., 500 п. о., 600 п. о., 700 п. о., 800 п. о.,
900 п. о., 1000 т. о., 1,1 т. о., 1,2 т. о., 1,3 т. о., 1,4 т. о., 1,5 т. о., 1,6 т. о., 1,7 т. о., 1,8 т. о.,
1,9 т. о., 2 т. о., 2,1 т. о., 2,2 т. о., 2,3 т. о., 2,4 т. о., 2,5 т. о., 2,6 т. о., 2,7 т. о., 2,8 т. о., 2,9 т. о.,
3 т. о., 3,1 т. о., 3,2 т. о., 3,3 т. о., 3,4 т. о., 3,5 т. о., 3,6 т. о., 3,7 т. о., 3,8 т. о., 3,9 т. о., 4 т. о.,
5 4,1 т. о., 4,2 т. о., 4,3 т. о., 4,4 т. о., 4,5 т. о., 4,6 т. о., 4,7 т. о., 4,8 т. о., 4,9 т. о., 5 т. о. или
больше).

Производные и фрагменты

Антиген или эпитоп по настоящему изобретению может содержать
последовательность дикого типа. При описании антигена или эпитопа термин
10 "последовательность дикого типа" относится к последовательности (например,
аминокислотной последовательности), которая встречается в природе и кодируется
геномом (например, геномом коронавируса). Коронавирус может иметь одну
последовательность дикого типа или две или больше последовательностей дикого типа
(например, где одна каноническая последовательность дикого типа присутствует в
15 эталонном геноме коронавируса и присутствуют дополнительные варианты
последовательности дикого типа, которые возникли в результате мутаций).

При описании антигена или эпитопа термины "производное" и "полученный из"
относятся к последовательности (например, аминокислотной последовательности), которая
отличается от последовательности дикого типа на одну или несколько аминокислот,
20 например характеризуется наличием одной или нескольких аминокислотных вставок,
делаций и/или замен по сравнению с последовательностью дикого типа.

Производная последовательность антигена или эпитопа представляет собой
последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%,
90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или большей идентичностью
25 последовательности с последовательностью дикого типа, например последовательностью
белка, антигена или эпитопа дикого типа.

"Идентичность последовательностей" и "сходство последовательностей"
определяют посредством выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных
последовательностей с применением алгоритмов глобального или локального
30 выравнивания. Последовательности называются "по сути идентичными" или "по существу
сходными", если они (при оптимальном выравнивании, например с помощью программ
GAP или BESTFIT с применением параметров по умолчанию) обладают по меньшей мере
определенной минимальной процентной долей идентичности последовательностей. В
программе GAP используется алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша для

выравнивания двух последовательностей по всей их длине, максимизирующий число совпадений и минимизирующий число гэпов. Как правило, используются параметры по умолчанию для программы GAP, где штраф за открытие гэпа = 50 (нуклеотиды) / 8 (белки), и штраф за продолжение гэпа = 3 (нуклеотиды) / 2 (белки). Для нуклеотидов используемая матрица замен по умолчанию представляет собой nwsgapdna, и для белков матрица замен по умолчанию представляет собой Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивания последовательностей и количество баллов для процентного значения идентичности последовательностей можно определять с применением компьютерных программ, таких как GCG Wisconsin Package версии 10.3, доступная от Accelrys Inc., 9685 Скрэнтон Роуд, Сан-Диего, штат Калифорния, 92121-3752, США, или EmbossWin версии 2.10.0 (с применением программы "needle"). В качестве альтернативы или дополнительно процентное сходство или идентичность определяют посредством поиска по базам данных с применением алгоритмов, таких как FASTA, BLAST и т.д. Идентичность последовательностей относится к идентичности последовательностей по всей длине последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антиген или эпитоп характеризуются наличием одной или нескольких аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинации, которые влияют на структуру кодируемого белка. В некоторых вариантах осуществления антиген или эпитоп характеризуются наличием одной или нескольких аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинации, которые влияют на функцию кодируемого белка. В некоторых вариантах осуществления антиген или эпитоп характеризуются наличием одной или нескольких аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинации, которые влияют на экспрессию или процессинг кодируемого белка клеткой.

Аминокислотные вставки, делеции, замены или их комбинация могут обеспечивать введение сайта для посттрансляционной модификации (например, могут обеспечивать введение сайта гликозилирования, убиквитинирования, фосфорилирования, нитрозилирования, метилирования, ацетилирования, амидирования, гидроксирования, сульфатирования или липидизации или последовательности, на которую происходит нацеливание для расщепления). В некоторых вариантах осуществления аминокислотные вставки, делеции, замены или их комбинация обеспечивают удаление сайта для посттрансляционной модификации (например, обеспечивают удаление сайта гликозилирования, убиквитинирования, фосфорилирования, нитрозилирования, метилирования, ацетилирования, амидирования, гидроксирования, сульфатирования или

липидизации или последовательности, на которую происходит нацеливание для расщепления). В некоторых вариантах осуществления аминокислотные вставки, делеции, замены или их комбинация обеспечивают модификацию сайта для посттрансляционной модификации (например, обеспечивают модификацию сайта для изменения эффективности или характеристик сайта гликозилирования, убиквитинирования, фосфорилирования, нитрозилирования, метилирования, ацетилирования, амидирования, гидроксильного, сульфатирования или липидизации, или расщепления).

Аминокислотная замена может представлять собой консервативную или неконсервативную замену. Консервативная аминокислотная замена может представлять собой замену одной аминокислоты на другую аминокислоту со сходными биохимическими свойствами (например, зарядом, размером и/или гидрофобностью). Неконсервативная аминокислотная замена может представлять собой замену одной аминокислоты на другую аминокислоту с отличающимися биохимическими свойствами (например, зарядом, размером и/или гидрофобностью). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой, например, замену, которая оказывает минимальное влияние на вторичную или третичную структуру полипептида. Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной гидрофильной аминокислоты на другую гидрофильную аминокислоту. Гидрофильные аминокислоты могут включать Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Lys (K) и Arg (R). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной гидрофобной аминокислоты на другую гидрофильную аминокислоту. Гидрофобные аминокислоты могут включать Ile (I), Phe (F), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M), Ala (A), Gly (G), Tyr (Y) и Pro (P). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной кислой аминокислоты на другую кислую аминокислоту. Кислые аминокислоты могут включать Glu (E) и Asp (D). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной основной аминокислоты на другую основную аминокислоту. Основные аминокислоты могут включать His (H), Arg (R) и Lys (K). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной полярной аминокислоты на другую полярную аминокислоту. Полярные аминокислоты могут включать Asn (N), Gln (Q), Ser (S) и Thr (T). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной неполярной аминокислоты на другую неполярную аминокислоту. Неполярные аминокислоты могут включать Leu (L), Val (V), Ile (I), Met (M), Gly (G) и Ala (A).

Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной ароматической аминокислоты на другую ароматическую аминокислоту. Ароматические аминокислоты могут включать Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W).
Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение
5 аминокислоты с одной алифатической аминокислоты на другую алифатическую аминокислоту. Алифатические аминокислоты могут включать Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I). В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена представляет собой изменение аминокислоты с одной аминокислоты на другую аминокислоту в пределах одной из следующих групп: группа I: ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;
10 группа II: cys, ser, tyr, thr; группа III: val, ile, leu, met, ala, phe; группа IV: lys, arg, his; группа V: phe, tyr, trp, his; и группа VI: asp, glu.

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуется наличием по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по
15 меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по
20 меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислотных делеций по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуется наличием по меньшей мере 1, по
25 меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по
30 меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, или по меньшей мере 50 аминокислотных замен по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуется наличием не более чем 1, не более

чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 11, не более чем 12, не более чем 13, не более чем 14, не более чем 15, не более чем 16, не более чем 17, не более чем 18, не более чем 19, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 35, не более чем 40, не более чем 45 или не более чем 50 аминокислотных замен по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуется наличием 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных замен по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуется наличием 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

Одна или несколько аминокислотных замен могут располагаться на N-конце, C-конце, в пределах аминокислотной последовательности или в комбинации указанных вариантов расположения. Аминокислотные замены могут быть смежными, несмежными или могут представлять собой комбинацию таковых.

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуется наличием не более чем 1, не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 11, не более чем 12, не более чем 13, не более чем 14, не более чем 15, не более чем 16, не более чем 17, не более чем 18, не более чем 19, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 35, не более чем 40, не более чем 45, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180 или не более чем 200 аминокислотных делеций по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуется наличием 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 10-15, 15-20, 20-25, 20-30, 30-50, 50-100, или 100-200 аминокислотных делеций по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуется наличием 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных делеций по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

Одна или несколько аминокислотных делеций могут располагаться на N-конце, С-конце, в пределах аминокислотной последовательности или в комбинации указанных вариантов расположения. Аминокислотные делеции могут быть смежными, несмежными или могут представлять собой комбинацию таковых.

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуются наличием по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 аминокислотных вставок по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуются наличием не более чем 1, не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 11, не более чем 12, не более чем 13, не более чем 14, не более чем 15, не более чем 16, не более чем 17, не более чем 18, не более чем 19, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 35, не более чем 40, не более чем 45 или не более чем 50 аминокислотных вставок по сравнению с

последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуются наличием 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных вставок по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное антигена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуются наличием 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных вставок по сравнению с последовательностью, раскрытой в данном документе (например, последовательностью дикого типа).

Одна или несколько аминокислотных вставок могут располагаться на N-конце, C-конце, в пределах аминокислотной последовательности или в комбинации указанных вариантов расположения. Аминокислотные вставки могут быть смежными, несмежными или могут представлять собой комбинацию таковых.

Кольцевой полирибонуклеотид

Кольцевой полирибонуклеотид предусматривает элементы, описанные ниже, а также антиген или эпитоп коронавируса, описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет размер по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 75 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 200 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 300 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 400 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 1000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 2000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 5000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 6000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 7000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 8000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 9000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 10000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 12000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 14000 нуклеотидов,

по меньшей мере приблизительно 15000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 16000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 17000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 18000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 19000 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 20000 нуклеотидов.

5 В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может иметь размер, достаточный для размещения сайта связывания с рибосомой. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида может быть настолько большим, насколько позволяют технические ограничения получения кольцевого полирибонуклеотида и/или применения кольцевого полирибонуклеотида. Не
10 ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают возможным, что из ДНК могут быть получены несколько сегментов РНК, и их свободные 5'- и 3'-концы могут быть отождествлены с образованием "нити" РНК, которая в конечном итоге может подвергаться циркуляризации, когда остается только один свободный 5'- и один свободный 3'-конец. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого
15 полирибонуклеотида может быть ограничен способностью к упаковке и доставке РНК к мишени. В некоторых вариантах осуществления размер кольцевого полирибонуклеотида представляет собой длину, достаточную для кодирования применимых полипептидов, таких как антигены и/или эпитопы по настоящему изобретению, и, таким образом, значения длины, составляющие по меньшей мере 20000 нуклеотидов, по меньшей мере 15000
20 нуклеотидов, по меньшей мере 10000 нуклеотидов, по меньшей мере 7500 нуклеотидов или по меньшей мере 5000 нуклеотидов, по меньшей мере 4000 нуклеотидов, по меньшей мере 3000 нуклеотидов, по меньшей мере 2000 нуклеотидов, по меньшей мере 1000 нуклеотидов, по меньшей мере 500 нуклеотидов, по меньшей мере 400 нуклеотидов, по меньшей мере 300 нуклеотидов, по меньшей мере 200 нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов или
25 по меньшей мере 70 нуклеотидов, могут быть применимыми.

Элементы кольцевого полирибонуклеотида

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько из элементов, описанных в данном документе, в качестве дополнения к содержанию последовательности, кодирующей антиген и/или эпитоп коронавируса. В
30 некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(А), отсутствует свободный 3'-конец, отсутствует мотив распознавания РНК-полимеразой или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит любой признак или любую комбинацию признаков, раскрытых в документе WO2019/118919, который включен в

данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, кольцевой полирибонуклеотид содержит регуляторный элемент, например последовательность, которая модифицирует экспрессию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. Регуляторный элемент может содержать последовательность, которая расположена рядом с экспрессионной последовательностью, кодирующей продукт экспрессии. Регуляторный элемент может быть функционально связан с соседней последовательностью. Регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества экспрессируемого продукта по сравнению с количеством экспрессируемого продукта в отсутствие регуляторного элемента. Кроме того, один регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества продуктов, экспрессируемых из нескольких экспрессионных последовательностей, соединенных в тандем. Таким образом, один регуляторный элемент может обеспечивать усиление экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей. Несколько регуляторных элементов также можно применять, например, для дифференцированной регуляции экспрессии различных экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент, представленный в данном документе, может предусматривать последовательность для избирательной трансляции. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательной трансляции" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая избирательно иницирует или активирует трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде, например к некоторым аптазимам рибопереклочателя. Регуляторный элемент также может включать последовательность для избирательного разрушения. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательного разрушения" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая иницирует разрушение кольцевого полирибонуклеотида или продукта экспрессии кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент является модулятором трансляции. Модулятор трансляции может модулировать трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. Модулятор трансляции может являться энхансером или супрессором трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции может функционировать в качестве регуляторного элемента. Дополнительные примеры регуляторных элементов описаны в абзацах [0154] – [0161] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует антиген, который обеспечивает получение человеческих поликлональных антител, представляющих интерес, и содержит последовательность инициации трансляции, например старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции включает в себя последовательность Козак или Шайна-Дальгарно. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции представляет собой некодирующий старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность инициации трансляции рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции обеспечивает конформационную гибкость кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции расположена в пределах по сути однонитевой области кольцевого полирибонуклеотида. Дополнительные примеры последовательностей инициации трансляции описаны в абзацах [0163] – [0165] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит элемент, представляющий собой участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Элемент IRES, подходящий для включения в кольцевой полирибонуклеотид, может представлять собой последовательность РНК, способную соединяться с эукариотической рибосомой. Дополнительные примеры IRES описаны в абзацах [0166] – [0168] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько экспрессионных последовательностей (например, кодирующих антиген), и каждая экспрессионная последовательность может содержать терминирующий элемент или не содержать такового. Дополнительные примеры терминирующих элементов описаны в абзацах [0169] – [0170] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению может содержать сдвигающий элемент. Используемый в данном документе термин "сдвигающий элемент" относится к компоненту, такому как нуклеотидная последовательность, которая индуцирует рибосомальную паузу в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент представляет собой неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность -D(V/I)ExNPGP, где x = любая аминокислота (SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент может предусматривать химический компонент, такой как глицерин, линкерный компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, химическую модификацию, модифицированную нуклеиновую кислоту или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сдвигающий элемент рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент рядом с каждой экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии, например пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент является частью одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и каждая из одной или нескольких экспрессионных последовательностей отделена от следующей экспрессионной последовательности посредством сдвигающего элемента в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент предотвращает образование одного полипептида (a) после двух циклов трансляции одной экспрессионной последовательности или (b) после одного или нескольких циклов трансляции двух или больше экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент представляет собой последовательность, отдельную от одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент содержит часть экспрессионной последовательности из одной или нескольких экспрессионных последовательностей.

Примеры сдвигающих элементов описаны в абзацах [0172] – [0175] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько последовательностей регуляторной нуклеиновой кислоты или содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, которые кодируют регуляторную нуклеиновую кислоту, например нуклеиновую кислоту, которая модифицирует экспрессию эндогенного гена и/или экзогенного гена. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность кольцевого полирибонуклеотида, представленного в данном документе, может содержать последовательность, которая является бессмысловой по отношению к регуляторной нуклеиновой кислоте, такой как некодирующая РНК, как, например, без ограничения, тРНК, lncRNA, miRNA, рРНК, snRNA, микроРНК, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA, exRNA, scaRNA, Y-РНК и hnRNA.

Иллюстративные регуляторные нуклеиновые кислоты описаны в абзацах [0177] – [0194] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления эффективность трансляции кольцевого полирибонуклеотида, представленного в данном документе, является более высокой, чем у эталона, например его линейного эквивалента, линейной экспрессионной последовательности или линейного кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, представленный в данном документе, характеризуется эффективностью трансляции, которая на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 70%, 800%, 900%, 1000%, 2000%, 5000%, 10000%, 100000%, или больше выше, чем таковая для эталона. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется эффективностью трансляции, на 10% более высокой, чем у его линейного эквивалента. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется эффективностью трансляции, на 300% более высокой, чем у его линейного эквивалента.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид вырабатывает продукты экспрессии в стехиометрических соотношениях. Трансляция по типу "катящегося кольца" приводит к непрерывной выработке продуктов экспрессии в по сути эквивалентных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции, так что продукты экспрессии вырабатываются в по сути эквивалентных соотношениях. В

некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции нескольких продуктов экспрессии, например, продуктов с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше экспрессионных последовательностей.

5 В некоторых вариантах осуществления после инициации трансляции кольцевого полирибонуклеотида рибосома, связанная с кольцевым полирибонуклеотидом, не отсоединяется от кольцевого полирибонуклеотида до завершения по меньшей мере одного цикла трансляции кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, является компетентным в
10 отношении трансляции по типу "катящегося кольца". В некоторых вариантах осуществления в ходе трансляции по типу "катящегося кольца" после инициации трансляции кольцевого полирибонуклеотида рибосома, связанная с кольцевым полирибонуклеотидом, не отсоединяется от кольцевого полирибонуклеотида до завершения по меньшей мере 2 циклов, по меньшей мере 3 циклов, по меньшей мере 4
15 циклов, по меньшей мере 5 циклов, по меньшей мере 6 циклов, по меньшей мере 7 циклов, по меньшей мере 8 циклов, по меньшей мере 9 циклов, по меньшей мере 10 циклов, по меньшей мере 11 циклов, по меньшей мере 12 циклов, по меньшей мере 13 циклов, по меньшей мере 14 циклов, по меньшей мере 15 циклов, по меньшей мере 20 циклов, по меньшей мере 30 циклов, по меньшей мере 40 циклов, по меньшей мере 50 циклов, по
20 меньшей мере 60 циклов, по меньшей мере 70 циклов, по меньшей мере 80 циклов, по меньшей мере 90 циклов, по меньшей мере 100 циклов, по меньшей мере 150 циклов, по меньшей мере 200 циклов, по меньшей мере 250 циклов, по меньшей мере 500 циклов, по меньшей мере 1000 циклов, по меньшей мере 1500 циклов, по меньшей мере 2000 циклов, по меньшей мере 5000 циклов, по меньшей мере 10000 циклов, по меньшей мере 10^5 циклов
25 или по меньшей мере 10^6 циклов трансляции кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления трансляция по типу "катящегося кольца" кольцевого полирибонуклеотида приводит к образованию полипептидного продукта, который образуется в результате трансляции в ходе более чем одного цикла трансляции кольцевого полирибонуклеотида ("непрерывного" продукта экспрессии). В некоторых
30 вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент, и трансляция по типу "катящегося кольца" кольцевого полирибонуклеотида приводит к образованию полипептидного продукта, который образуется в ходе одного цикла трансляции или менее чем одного цикла трансляции кольцевого полирибонуклеотида ("дискретного" продукта экспрессии). В некоторых вариантах осуществления кольцевой

полирибонуклеотид имеет такую конфигурацию, что по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% от общего количества полипептидов (моль/моль), образующихся в ходе трансляции по типу "катящегося кольца" кольцевого полирибонуклеотида, представляют собой дискретные полипептиды. В некоторых вариантах осуществления соотношение количества дискретных продуктов и общего количества полипептидов тестируют в системе трансляции *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления система трансляции *in vitro*, используемая для тестирования соотношения количества, содержит лизат ретикулоцитов кролика. В некоторых вариантах осуществления соотношение количества тестируют в системе трансляции *in vivo*, такой как эукариотическая клетка или прокариотическая клетка, культивируемая клетка или клетка в организме.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит нетранслируемые области (UTR). UTR геномной области, содержащей ген, могут транскрибироваться, но не транслироваться. В некоторых вариантах осуществления UTR может быть включена выше последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления UTR может быть включена ниже экспрессионной последовательности, описанной в данном документе. В некоторых случаях одна UTR для первой экспрессионной последовательности является той же, что и другая UTR для второй экспрессионной последовательности, или расположена непрерывно с ней или перекрывается с ней. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой интрон человека. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой полноразмерный интрон человека, например ZKSCAN1.

Иллюстративные нетранслируемые области описаны в абзацах [0197] – [201] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность поли(А). Иллюстративные последовательности поли(А) описаны в абзацах [0202] – [0205] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(А).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько рибопереключателей. Иллюстративные рибопереключатели описаны в абзацах [0232] – [0252] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

5 В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит аптазим. Иллюстративные аптазимы описаны в абзацах [0253] – [0259] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

10 В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания РНК. МикроРНК (или miRNA) могут представлять собой короткие некодирующие РНК, которые связываются с 3'-UTR молекул нуклеиновой кислоты и подавляют экспрессию генов либо путем снижения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты, либо путем ингибирования трансляции. Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько последовательностей-мишеней
15 для микроРНК, последовательностей микроРНК или затравочных областей микроРНК. Такие последовательности могут соответствовать любым известным микроРНК, таким как изложенные в публикации заявки на патент США US 2005/0261218 и публикации заявки на патент США US 2005/0059005, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительные примеры сайтов связывания
20 РНК описаны в абзацах [0206] – [0215] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания белка, которые обеспечивают возможность связывания белка, например, рибосомы, с внутренним сайтом в последовательности РНК.
25 Дополнительные примеры сайтов связывания белка описаны в абзацах [0218] – [0221] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления элементы
30 полирибонуклеотида могут быть отделены друг от друга посредством спейсерной последовательности или линкера. Иллюстративные спейсерные последовательности описаны в абзацах [0293] – [0302] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может также содержать линкер, отличный от нуклеиновой кислоты. Иллюстративные линкеры, отличные от нуклеиновой кислоты, описаны в абзацах [0303] – [0307] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит другую последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать другие последовательности, которые включают ДНК, РНК или искусственные нуклеиновые кислоты. Другие последовательности могут включать без ограничения геномную ДНК, кДНК или последовательности, которые кодируют тРНК, мРНК, рРНК, miRNA, gRNA, siRNA или другие молекулы для RNAi. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит siRNA для нацеливания на другой локус того же продукта экспрессии гена, что и в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит siRNA для нацеливания на продукт экспрессии гена, отличающийся от продукта экспрессии гена, который присутствует в кольцевом полирибонуклеотиде.

В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(A). В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует терминирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует участок внутренней посадки рибосомы. В некоторых вариантах осуществления у кольцевого полирибонуклеотида отсутствует восприимчивость к разрушению под действием экзонуклеаз. В некоторых вариантах осуществления то, что у кольцевого полирибонуклеотида отсутствует восприимчивость к разрушению, может означать, что кольцевой полирибонуклеотид не разрушается под действием экзонуклеазы или разрушается в присутствии экзонуклеазы лишь в ограниченной степени, например, сравнимой или сходной с таковой в отсутствие экзонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид не подвергается разрушению экзонуклеазами. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется пониженным разрушением при воздействии экзонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления у кольцевого полирибонуклеотида отсутствует связывание с кэп-

связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 5'-кэп.

В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 5'-UTR, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 3'-UTR, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(A), и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует терминирующий элемент, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует участок внутренней посадки рибосомы, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует кэп, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствуют 5'-UTR, 3'-UTR и IRES, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит одну или несколько из следующих последовательностей: последовательность, которая кодирует одну или несколько miRNA, последовательность, которая кодирует один или несколько репликативных белков, последовательность, которая кодирует экзогенный ген, последовательность, которая кодирует терапевтическое средство, регуляторный элемент (например, модулятор трансляции, например энхансер или супрессор трансляции), последовательность инициации трансляции, одну или несколько регуляторных нуклеиновых кислот, которые нацеливаются на эндогенные гены (например, siRNA, lncRNA, shRNA), и последовательность, которая кодирует терапевтические мРНК или белок.

В результате циркуляризации кольцевой полирибонуклеотид может обладать определенными характеристиками, которые отличают его от линейной РНК. Например,

кольцевой полирибонуклеотид является менее восприимчивым к разрушению под действием экзонуклеазы по сравнению с линейной РНК. Таким образом, кольцевой полирибонуклеотид может являться более стабильным, чем линейная РНК, в частности, при инкубировании в присутствии экзонуклеазы. Повышенная стабильность кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с линейной РНК может делать кольцевой полирибонуклеотид более применимым в качестве реагента для трансформации клеток для получения полипептидов (например, антигенов и/или эпитопов для вызова ответов в виде выработки антител). Повышенная стабильность кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с линейной РНК может облегчать хранение кольцевого полирибонуклеотида в течение длительного времени по сравнению с линейной РНК. Стабильность кольцевого полирибонуклеотида, обработанного экзонуклеазой, можно тестировать с помощью способов, стандартных в данной области техники, посредством которых определяют, произошло ли разрушение РНК (например, с помощью гель-электрофореза).

Кроме того, в отличие от линейной РНК, кольцевой полирибонуклеотид может являться менее восприимчивым к дефосфорилированию при инкубировании кольцевого полирибонуклеотида с фосфатазой, такой как кишечная фосфатаза теленка.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет определенные характеристики последовательности. Например, кольцевой полирибонуклеотид может иметь конкретный нуклеотидный состав. В некоторых таких вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько областей, богатых пуринами (аденином и/или гуанозином). В некоторых таких вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько областей, бедных пуринами. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько AU-богатых областей или элементов (ARE). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько областей, богатых аденином.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать один или несколько повторяющихся элементов, описанных в другом месте в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько модификаций, описанных в другом месте в данном документе.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько замен, вставок и/или добавлений, делеций и ковалентных модификаций по сравнению с эталонными последовательностями. Например, кольцевые полирибонуклеотиды с одной или

несколькими вставками, добавлениями, делециями и/или ковалентными модификациями по сравнению с исходным полирибонуклеотидом включены в объем настоящего изобретения. Иллюстративные модификации описаны в абзацах [0310] – [0325] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

5 В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит структуру высшего порядка, например, вторичную или третичную структуру. В некоторых вариантах осуществления комплементарные сегменты кольцевого полирибонуклеотида сворачиваются в двухнитевой сегмент, удерживаясь вместе посредством водородных связей между парами, например, А-У и С-Г. В некоторых вариантах осуществления спирали, также известные как стебли, образуются внутри молекулы и имеют двухнитевой сегмент, соединенный с концевой петлей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет по меньшей мере один сегмент с псевдодвухнитевой вторичной структурой.

15 В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида содержат по сути одонитевые области в противоположность двухнитевым областям. В некоторых вариантах осуществления соотношение одонитевых и двухнитевых областей может влиять на функциональные свойства кольцевого полирибонуклеотида.

20 В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида являются по сути одонитевыми. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути одонитевыми, могут включать в себя сайт связывания белка или РНК. В некоторых вариантах осуществления последовательности кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути одонитевыми, могут быть конформационно гибкими для обеспечения возможности усиленных взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления последовательность кольцевого полирибонуклеотида специально сконструирована для включения таких вторичных структур для связывания или увеличения связывания белка или нуклеиновой кислоты.

30 В некоторых вариантах осуществления последовательности кольцевого полирибонуклеотида являются по сути двухнитевыми. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути двухнитевыми, могут включать в себя конформационный сайт распознавания, например, рибопереключател или аптазим. В некоторых вариантах

осуществления последовательности кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути двухнитевыми, могут быть конформационно жесткими. В некоторых таких случаях конформационно жесткая последовательность может приводить к стерическому затруднению связывания кольцевого полирибонуклеотида с белком или нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления последовательность кольцевого полирибонуклеотида специально сконструирована для включения таких вторичных структур для избегания или уменьшения связывания белка или нуклеиновой кислоты.

Существует 16 возможных пар оснований, однако фактические пары оснований могут образовывать шесть из них (AU, GU, GC, UA, UG, CG). Остальные называются ошибками спаривания и встречаются в спиральных с очень низкой частотой. В некоторых вариантах осуществления структура кольцевого полирибонуклеотида не может быть легко нарушена без воздействия на его функцию и летальных последствий, что обеспечивает выбор для поддержания вторичной структуры. В некоторых вариантах осуществления первичная структура стеблей (т. е. их нуклеотидная последовательность) по-прежнему может варьироваться при сохранении спиральных областей. Природа оснований является вторичной по отношению к высшей структуре, и замены возможны при условии, что они сохраняют вторичную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет по меньшей мере один сегмент с псевдоспиральной структурой. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну из U-богатой или A-богатой последовательности или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления U-богатые и/или A-богатые последовательности расположены таким образом, что образуется тройная псевдоспиральная структура. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет двойную псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) сегментов, имеющих двойную псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну из C-богатой и/или G-богатой последовательности. В некоторых вариантах осуществления C-богатые и/или G-богатые последовательности расположены таким образом, что образуется тройная псевдоспиральная структура. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет внутримолекулярную тройную псевдоспиральную структуру, которая способствует стабилизации.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет две псевдоспиральные структуры (например, разделенные фосфодиэфирной связью), так что их концевые пары оснований подвергаются стэкингу, а псевдоспиральные структуры становятся коллинеарными, что приводит к образованию субструктуры с "коаксиальным стэкингом".

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит третичную структуру с одним или несколькими мотивами, например, псевдоузлом, G-квадруплексом, спиралью и коаксиальным стэкингом.

Дополнительные примеры структуры кольцевых полирибонуклеотидов, раскрытых в данном документе, описаны в абзацах [0326] – [0333] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Стабильность и период полужизни

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, представленный в данном документе, характеризуется периодом полужизни, увеличенным по сравнению с эталоном, например линейным полирибонуклеотидом, имеющим такую же нуклеотидную последовательность, который является не циркуляризованным (линейным эквивалентом). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является по сути устойчивым к разрушению, например разрушению под действием экзонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является устойчивым к саморазрушению. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует сайт ферментативного расщепления, например, сайт расщепления для дайсера. Дополнительные примеры стабильности и периода полужизни кольцевых полирибонуклеотидов, раскрытых в данном документе, описаны в абзацах [0308] – [0309] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Способы получения

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе и может быть получена с использованием рекомбинантной технологии (например, может быть получена *in vitro* с использованием ДНК-плазмиды), химического синтеза или их комбинации.

В объем настоящего изобретения входит то, что молекула ДНК, используемая для получения кольцевой РНК, может содержать последовательность ДНК из встречающейся в природе исходной последовательности нуклеиновой кислоты, ее модифицированный

вариант или последовательность ДНК, кодирующую синтетический полипептид, обычно не обнаруживаемый в природе (например, химерные молекулы или слитые белки, такие как слитые белки, содержащие несколько антигенов и/или эпитопов). Молекулы ДНК и РНК могут быть модифицированы с использованием различных методик, в том числе без
5 ограничения классических методик мутагенеза и рекомбинантных методик, таких как сайт-направленный мутагенез, химическая обработка молекулы нуклеиновой кислоты с целью индукции мутаций, расщепление фрагмента нуклеиновой кислоты ферментом рестрикции, лигирование фрагментов нуклеиновой кислоты, амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или мутагенез выбранных областей последовательности
10 нуклеиновой кислоты, синтез смесей олигонуклеотидов и лигирование групп смесей для "создания" смеси молекул нуклеиновой кислоты и их комбинаций.

Кольцевой полирибонуклеотид может быть получен в соответствии с любой доступной методикой, в том числе без ограничения с помощью химического синтеза и ферментативного синтеза. В некоторых вариантах осуществления линейную первичную
15 конструкцию или линейную мРНК можно подвергнуть циклизации или конкатемеризации для создания кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Механизм циклизации или конкатемеризации можно осуществлять с помощью таких способов, как, без ограничения, химические, ферментативные способы, способы лигирования с помощью шунта или рибозимного катализа. Новообразовавшаяся 5'-/3'-связь может представлять
20 собой внутримолекулярную связь или межмолекулярную связь.

Способы получения кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, описаны, например, в Khudyakov & Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications*, CRC Press (2002); в Zhao, *Synthetic Biology: Tools and Applications*, (первое издание), Academic Press (2013); и Egli & Herdewijn, *Chemistry and Biology of Artificial*
25 *Nucleic Acids*, (первое издание), Wiley-VCH (2012).

В уровне техники также описаны различные способы синтеза кольцевых полирибонуклеотидов (см., например, патент США № US6210931, патент США № US5773244, патент США № US5766903, патент США № US5712128, патент США № US5426180, публикацию заявки на патент США № US20100137407, международную
30 публикацию № WO1992001813 и международную публикацию № WO2010084371; содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды являются очищенными, например, удалены свободные рибонуклеиновые кислоты, линейные или

содержащие одноцепочечный разрыв РНК, ДНК, белки и т. д. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут быть очищены посредством любого известного способа, обычно используемого в данной области техники. Неограничивающие примеры способов очистки включают колоночную хроматографию, вырезание из геля, 5 исключение по размеру и т. д.

Циркуляризация

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид может быть подвергнут циклизации или конкатемеризации. В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид может быть подвергнут 10 циклизации *in vitro* перед составлением и/или доставкой. В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид может быть подвергнут циклизации внутри клетки.

а. Внеклеточная циркуляризация

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид 15 подвергаются циклизации или конкатемеризации с помощью химического способа с образованием кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых химических способах 5'-конец и 3'-конец нуклеиновой кислоты (например, линейного кольцевого полирибонуклеотида) содержат химически реакционноспособные группы, которые, будучи расположенными близко друг к другу, могут образовывать новую ковалентную связь 20 между 5'-концом и 3'-концом молекулы. 5'-конец может содержать реакционноспособную сложноэфирную NHS-группу, а 3'-конец может содержать нуклеотид с 3'-концевой аминогруппой, так что в органическом растворителе нуклеотид с 3'-концевой аминогруппой на 3'-конце линейной молекулы РНК будет вступать в нуклеофильную атаку на 5'-концевую сложноэфирную NHS-компонент с образованием новой 5'-/3'-амидной связи.

В некоторых вариантах осуществления применяют ДНК- или РНК-лигазу для ферментативного связывания 5'-фосфорилированной молекулы нуклеиновой кислоты (например, линейного кольцевого полирибонуклеотида) с 3'-гидроксильной группой нуклеиновой кислоты (например, линейной нуклеиновой кислоты) с образованием новой фосфодиэфирной связи. В приводимой в качестве примера реакции линейный кольцевой 30 полирибонуклеотид инкубируют при 37°C в течение 1 часа с 1-10 единицами РНК-лигазы T4 (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя. Реакция лигирования может происходить в присутствии линейной нуклеиновой кислоты, способной к образованию пар оснований как с 5'-, так и с 3'-областями, расположенными рядом друг с другом, для содействия реакции

ферментативного лигирования. В некоторых вариантах осуществления лигирование представляет собой лигирование с помощью шунта. Например, для лигирования с помощью шунта может использоваться лигаза для шунта, такая как лигаза SplintR®. Для лигирования с помощью шунта можно сконструировать односторонний полинуклеотид (шунт), такой как односторонний РНК, для гибридизации с обоими концами линейного полирибонуклеотида, так что эти два конца могут быть расположены рядом друг с другом при гибридизации с односторонним шунтом. Таким образом, лигаза для шунта может катализировать лигирование двух концов линейного полирибонуклеотида, расположенных рядом друг с другом, с образованием кольцевого полирибонуклеотида.

10 В некоторых вариантах осуществления при синтезе кольцевых полинуклеотидов применяется ДНК- или РНК-лигаза. В качестве неограничивающего примера, лигаза может представлять собой CircLigase или лигазу для циркуляризации.

В некоторых вариантах осуществления 5'- либо 3'-конец линейного кольцевого полирибонуклеотида может кодировать последовательность рибозима с лигазной активностью, так что в ходе транскрипции *in vitro* получаемый в результате линейный кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность активного рибозима, способную обеспечивать лигирование 5'-конца линейного кольцевого полирибонуклеотида с 3'-концом линейного кольцевого полирибонуклеотида. Рибозим с лигазной активностью может быть получен из интрона группы I, вируса гепатита дельта, рибозима, содержащего шпильку, или может быть выбран с помощью SELEX (систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением). Реакция, катализируемая рибозимом с лигазной активностью, может занимать от 1 до 24 часов при температуре от 0 до 37°C.

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид подвергают циклизации или конкатемеризации с использованием по меньшей мере одного компонента, отличного от нуклеиновой кислоты. В одном аспекте по меньшей мере один компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может вступать в реакцию с областями или элементами вблизи 5'-конца и/или вблизи 3'-конца линейного кольцевого полирибонуклеотида для циклизации или конкатемеризации линейного кольцевого полирибонуклеотида. В другом аспекте по меньшей мере один компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может быть расположен на 5'-конце и/или 3'-конце линейного кольцевого полирибонуклеотида, или быть связан с ним, или находиться вблизи него. Рассматриваемые компоненты, отличные от нуклеиновой кислоты, могут быть гомологичными или гетерологичными. В качестве неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой связь, такую как

гидрофобная связь, ионная связь, биоразрушаемая связь и/или расщепляемая связь. В качестве другого неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, представляет собой лигирующий компонент. В качестве еще одного неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой олигонуклеотидный или пептидный компонент, такой как аптамер или линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, описанный в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид подвергают циклизации или конкатемеризации благодаря компоненту, отличному от нуклеиновой кислоты, который вызывает притяжение между атомами, молекулярными поверхностями, расположенными на 5'- и 3'-концах линейного кольцевого полирибонуклеотида, находящимися вблизи них или связанными с ними. В качестве неограничивающего примера, один или несколько линейных кольцевых полирибонуклеотидов могут быть подвергнуты циклизации или конкатемеризации благодаря межмолекулярным силам или внутримолекулярным силам. Неограничивающие примеры межмолекулярных сил включают силы взаимодействия диполь-диполь, силы взаимодействия диполь-индуцированный диполь, силы взаимодействия индуцированный диполь-индуцированный диполь, ван-дер-ваальсовы силы и лондоновские дисперсионные силы. Неограничивающие примеры внутримолекулярных сил включают ковалентные связи, металлические связи, ионные связи, резонансные связи, агостические связи, диполярные связи, конъюгацию, гиперконъюгацию и антисвязывание.

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность РНК-рибозима вблизи 5'-конца и вблизи 3'-конца. Последовательность РНК-рибозима может образовывать ковалентную связь с пептидом, когда его последовательность подвергается воздействию остальной части рибозима. В одном аспекте пептиды, ковалентно связанные с последовательностью РНК-рибозима вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут ассоциировать друг с другом, обеспечивая циклизацию или конкатемеризацию линейного кольцевого полирибонуклеотида. В другом аспекте пептиды, ковалентно связанные с РНК-рибозимом вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут обеспечивать циклизацию или конкатемеризацию линейной первичной конструкции или линейной мРНК после их лигирования с использованием различных способов, известных в данной области техники, таких как, без ограничения, лигирование белков. Неограничивающие примеры рибозимов для использования в линейных первичных конструкциях или линейных РНК по настоящему изобретению или неисчерпывающий перечень способов включения и/или ковалентного связывания пептидов описаны в заявке

на патент США № US20030082768, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид может содержать 5'-трифосфат нуклеиновой кислоты, превращенный в 5'-монофосфат, например, путем приведения в контакт 5'-трифосфата с РНК-5'-пирофосфогидролазой (RppH) или АТФ-дифосфогидролазой (апиразой). В качестве альтернативы, превращение 5'-трифосфата линейного кольцевого полирибонуклеотида в 5'-монофосфат может происходить посредством двухстадийной реакции, включающей: (а) приведение 5'-нуклеотида линейного кольцевого полирибонуклеотида в контакт с фосфатазой (например, антарктической фосфатазой, щелочной фосфатазой креветки или кишечной фосфатазой теленка) для удаления всех трех фосфатных остатков; и (b) приведение 5'-нуклеотида после стадии (а) в контакт с киназой (например, полинуклеотидкиназой), которая обеспечивает добавление одного фосфатного остатка.

В некоторых вариантах осуществления эффективность циркуляризации в способах циркуляризации, представленных в данном документе, составляет по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или 100%. В некоторых вариантах осуществления эффективность циркуляризации в способах циркуляризации, предоставленных в данном документе, составляет по меньшей мере приблизительно 40%.

В некоторых вариантах осуществления представленный способ циркуляризации характеризуется эффективностью циркуляризации, составляющей от приблизительно 10% до приблизительно 100%; например, эффективность циркуляризации может составлять приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и приблизительно 99%. В некоторых вариантах осуществления эффективность циркуляризации составляет от приблизительно 20% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления эффективность циркуляризации составляет от

приблизительно 30% до приблизительно 60%. В некоторых вариантах осуществления эффективность циркуляризации составляет приблизительно 40%.

b. Сплайсинговый элемент

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сплайсинговый элемент. Иллюстративные сплайсинговые элементы описаны в абзацах [0270] – [0275] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сплайсинговый элемент. В кольцевом полирибонуклеотиде, представленном в данном документе, сплайсинговый элемент может представлять собой полный сплайсинговый элемент, который может опосредовать сплайсинг кольцевого полирибонуклеотида. В качестве альтернативы, сплайсинговый элемент может также представлять собой остаточный сплайсинговый элемент после завершения события сплайсинга. Например, в некоторых случаях сплайсинговый элемент линейного полирибонуклеотида может опосредовать событие сплайсинга, которое приводит к циркуляризации линейного полирибонуклеотида, в результате чего полученный кольцевой полирибонуклеотид содержит остаточный сплайсинговый элемент после такого события циркуляризации, опосредованной сплайсингом. В некоторых случаях остаточный сплайсинговый элемент не способен опосредовать сплайсинг. В других случаях остаточный сплайсинговый элемент по-прежнему может опосредовать сплайсинг при определенных обстоятельствах. В некоторых вариантах осуществления сплайсинговый элемент расположен рядом с по меньшей мере одной экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сплайсинговый элемент рядом с каждой экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления сплайсинговый элемент расположен с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии, например, пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит внутренний сплайсинговый элемент, который при репликации соединяет сплайсированные концы друг с другом. Некоторые примеры могут включать миниатюрные интроны (< 100 нт) с последовательностями сайтов сплайсинга и короткими инвертированными повторами (30–40 нт), такими как AluSq2, AluJr и AluSz, инвертированные последовательности во фланкирующих интронах, Alu-элементы во фланкирующих интронах и мотивы, обнаруживаемые (обогащенные мотивы из дополнительной таблицы 4)

в цис-элементах последовательностей, проксимальных по отношению к местам событий обратного сплайсинга, таких как последовательности в пределах 200 п. о., предшествующих сайту обратного сплайсинга с фланкирующими экзонами (расположенных выше него) или следующих за ним (расположенных ниже него). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну повторяющуюся нуклеотидную последовательность, описанную в другом месте в данном документе, в качестве внутреннего сплайсингового элемента. В таких вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность может включать в себя повторяющиеся последовательности интронов из семейства Alu. В некоторых вариантах осуществления рибосомосвязывающий белок, связанный со сплайсингом, может регулировать биогенез кольцевого полирибонуклеотида (например, факторы сплайсинга Muscleblind и Quaking (QKI)).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать канонические сайты сплайсинга, которые фланкируют места соединений по типу "голова к хвосту" в кольцевом полирибонуклеотиде.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать мотив выпетливание-спираль-выпетливание, содержащий "стебель" из 4 пар оснований, фланкированный двумя выпетливаниями размером 3 нуклеотида. Расщепление происходит в сайте в области выпетливания с образованием характерных фрагментов с концевой 5'-гидроксильной группой и 2',3'-циклическим фосфатным остатком. Циркуляризация происходит путем нуклеофильной атаки группы 5'-ОН на 2',3'-циклический фосфатный остаток той же молекулы с образованием 3',5'-фосфодиэфирного мостика.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать мультимерную повторяющуюся последовательность РНК, которая несет HPR-элемент. HPR содержит 2',3'-циклический фосфатный остаток и 5'-ОН-концы. HPR-элемент осуществляет самопроцессинг 5'- и 3'-концов линейного полирибонуклеотида, подлежащего циркуляризации, за счет чего обеспечивается лигирование концов друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать самосплайсирующийся элемент. Например, кольцевой полирибонуклеотид может содержать интрон из цианобактерии рода *Anabaena*.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность, которая опосредует самолигирование. В одном варианте

осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность HDV (например, последовательность консервативного репликативного домена HDV GGCUCAUCUCGACAAGAGGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUUCUGUAAAG AGGAGACUGCUGGACUCGCCGCCCAAGUUCGAGCAUGAGCC (SEQ ID NO: 61) или
5 GGCUAGAGGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUUCUGUAAAGAGGAGACUG CUGGACUCGCCGCCCGAGCC (SEQ ID NO: 62)) для самолигирования. В одном варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность петли E (например, в PSTVd) для самолигирования. В другом варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать самоциркуляризирующийся интрон, например 5'- и 3'-
10 границы сплайсинга, или самоциркуляризирующийся каталитический интрон, такой как интроны группы I, группы II или группы III. Неограничивающие примеры последовательностей самосплайсирующихся интронов группы I могут включать самосплайсирующиеся последовательности с циклическими перестановками интронов и экзонов, полученные из гена td бактериофага T4, и вставочные последовательности (IVS)
15 рРНК Tetrahymena.

Другие способы циркуляризации

В некоторых вариантах осуществления линейные кольцевые полирибонуклеотиды могут содержать комплементарные последовательности, в том числе повторяющиеся либо неповторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты в отдельных интронах или
20 среди фланкирующих интронов. Повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты представляют собой последовательности, которые встречаются в сегменте кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность
25 включает последовательности поли(CA) или поли(UG). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует
30 внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты и комплементарные повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты из двух отдельных кольцевых полирибонуклеотидов гибридизируются с образованием одного кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированные сегменты образуют внутренние

двойные нити. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности находятся на 5'- и 3'-концах линейных кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности включают приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или больше пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления для обеспечения образования кольцевого полирибонуклеотида можно применять химические способы циркуляризации. Такие способы могут включать без ограничения клик-химию (например, способы с использованием алкинов и азидов или кликабельных оснований), метатезис олефинов, лигирование с образованием фосфорамидатных связей, сшивание с помощью гемаминалей/иминов, модификацию оснований и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления для обеспечения образования кольцевого полирибонуклеотида можно применять ферментативные способы циркуляризации. В некоторых вариантах осуществления лигирующий фермент, например ДНК- или РНК-лигазу, можно применять для обеспечения образования матрицы для синтеза кольцевого полирибонуклеотида или комплементарной последовательности, являющейся комплементарной нитью кольцевого полирибонуклеотида, или кольцевого полирибонуклеотида.

Циркуляризацию кольцевого полирибонуклеотида можно осуществлять посредством способов, известных из уровня техники, например, описанных в "RNA circularization strategies *in vivo* and *in vitro*", Petkovic and Muller, *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (4): 2454-2465, а также в "*In vitro* circularization of RNA", Muller and Appel, *RNA Biol*, 2017, 14(8):1018-1027.

Кольцевой полирибонуклеотид может кодировать последовательность и/или мотивы, применимые для репликации. Иллюстративные репликативные элементы описаны в абзацах [0280] – [0286] в документе WO2019/118919, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ЛИНЕЙНЫЙ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИД

Линейные полирибонуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп из коронавируса. Данный линейный полирибонуклеотид обеспечивает экспрессию последовательности, кодирующей антиген и/или эпитоп из коронавируса, в организме субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). В некоторых вариантах осуществления линейные

полирибонуклеотиды, предусматривающие антиген и/или эпитоп коронавируса, применяют для получения иммунного ответа у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды представляют собой мРНК и предусматривают антиген и/или эпитоп коронавируса, они применяются для получения иммунного ответа у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды, предусматривающие антиген и/или эпитоп коронавируса, применяются для получения поликлональных антител, описанных в данном документе.

Антигены и эпитопы коронавируса

10 Линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую антиген или эпитоп коронавируса. Антигены и/или эпитопы, раскрытые в данном документе, ассоциированы с коронавирусами. В некоторых вариантах осуществления антигены и/или эпитопы экспрессируются коронавирусом или получены из антигена и/или эпитопа, которые экспрессируются коронавирусом.

15 Антиген представляет собой молекулу, содержащую один или несколько эпитопов (как линейные, так и конформационные, либо и те, и другие), которые вызывают адаптивный иммунный ответ у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). Эпитоп может представлять собой часть антигена, которую распознает, на которую нацеливается или которую связывает указанное антитело или Т-клеточный рецептор.

20 Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, например, непрерывную последовательность аминокислот. Эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, например эпитоп, который содержит аминокислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации белка. Конформационный эпитоп может содержать несмежные аминокислоты из первичной аминокислотной последовательности. Как правило, эпитоп

25 будет содержать от приблизительно 3 до 15, в целом приблизительно 5-15 аминокислот. Длина В-клеточного эпитопа, как правило, составляет приблизительно 5 аминокислот, но может составлять всего 3-4 аминокислоты. Т-клеточный эпитоп, такой как эпитоп CTL, будет содержать по меньшей мере приблизительно 7-9 аминокислот, и эпитоп хелперной

30 Т-клетки будет содержать по меньшей мере приблизительно 12-20 аминокислот. Как правило, эпитоп будет содержать от приблизительно 7 до 15 аминокислот, например 9, 10, 12 или 15 аминокислот.

Антиген или эпитоп коронавируса могут представлять собой или могут предусматривать целый белок, пептид, гликопротеин, липопротеин, фосфопротеин,

рибонуклеопротеин, углевод (например, полисахарид), липид (например, фосфолипид или триглицерид) или нуклеиновую кислоту (например, ДНК, РНК) или их часть.

Антиген или эпитоп коронавируса могут предусматривать белковый антиген или эпитоп (например, пептидный антиген или пептидный эпитоп из белка, гликопротеина, липопротеина, фосфопротеина или рибонуклеопротеина). Антиген или эпитоп могут
5 содержать аминокислоту, сахар, липид, фосфорильную или сульфонильную группу или их комбинацию.

Белковый антиген или эпитоп коронавируса могут предусматривать посттрансляционную модификацию, например гликозилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование, амидирование,
10 гидроксильное, сульфатирование или липидизацию.

Антиген и/или эпитоп могут быть получены из поверхностного белка коронавируса, мембранного белка коронавируса, белка оболочки коронавируса, капсидного белка коронавируса, нуклеокапсидного белка коронавируса, шиповидного белка коронавируса, рецептор-связывающего домена из шиповидного белка коронавируса, белка проникновения коронавируса, белка слияния мембран коронавируса, структурного белка коронавируса, неструктурного белка коронавируса, регуляторного белка коронавируса, вспомогательного белка коронавируса, секретируемого белка коронавируса, белка полимеразы коронавируса, РНК-полимеразы коронавируса, протеазы коронавируса, гликопротеина коронавируса, фузогена коронавируса, спирального капсидного белка коронавируса, икосаэдрического капсидного белка коронавируса, матриксного белка коронавируса, репликазы коронавируса, фактора транскрипции коронавируса или фермента коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп по настоящему изобретению получены из предсказанного транскрипта с генома SARS-CoV. В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп по настоящему изобретению получены из белка, кодируемого открытыми рамками считывания из генома SARS-CoV. Неограничивающие примеры открытых рамок считывания в геномах SARS-CoV могут включать ORF1a, ORF1b, ORF для шиповидного белка (S), ORF3a, ORF3b, ORF для белка оболочки (E), ORF для мембранного белка (M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF8a, ORF8b, ORF9a, ORF9b, ORF для нуклеокапсидного белка (N) и ORF10. В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания из генома SARS-CoV предусматривает SEQ ID NO: 11.

В определенных вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид предусматривает антиген SARS-CoV-2, описанный в **таблице 3**.

ТАБЛИЦА 3. Описания разработанных линейных конструкций.

Конструкция	ORF (SEQ ID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	5'-элемент	3'-элемент
p29	1 (13)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью удален и добавлен домен тримеризации	Да	Да	Нет	Глобин	Глобин
p30	3 (15)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью интактный	Да	Да	Нет	Глобин	Глобин
p31	13 (12)	Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка, в котором только сигнал секреции трансляционно слит с 5'-концом	Н. п.	Н. п.	Н. п.	Глобин	Глобин

Конструкция	ORF (SEQ ID NO)	Описание ORF	Замены пролином	Оптимизация клонирования	Оптимизация циркуляризации	5'-элемент	3'-элемент
p32	1 (13)	Трансмембранный домен (TM) S-белка полностью удален и добавлен домен тримеризации	Да	Да	Да	Глобин	Глобин

В **таблице 3** "замены пролином" обозначают замены пролином, которые находятся в остатках 986 и 987, а также замену "GSAS" в сайте расщепления фурином (остатки 682-685). Для оптимизации клонирования осуществляли замену одного основания в координате 2541 с разрушением сайта BsaI для способствования конструированию ДНК-матрицы плазмиды для клонирования Golden Gate. Для оптимизаций циркуляризации четыре одиночных нуклеотида – в положениях 2307, 2709, 159 и 315 – были заменены с разрушением сайтов, которые потенциально могли связывать элементы циркуляризации из последовательностей нуклеиновой кислоты шунта, тем самым потенциально ингибируя эффективное лигирование. Все замены одиночных п. о. были разработаны таким образом, чтобы они являлись трансляционно неактивными. Дополнительно, в **таблице 3** 5'-элемент представляет собой глобин (SEQ ID NO: 32); и 3'-элемент представляет собой глобин (SEQ ID NO: 33).

В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса предусматривает или содержит по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по

меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30 аминокислот или больше. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса предусматривает или содержит не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 11, не более чем 12, не более чем 13, не более чем 14, не более чем 15, не более чем 16, не более чем 17, не более чем 18, не более чем 19, не более чем 20, не более чем 21, не более чем 22, не более чем 23, не более чем 24, не более чем 25, не более чем 26, не более чем 27, не более чем 28, не более чем 29 или не более чем 30 аминокислот или меньше. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса предусматривает или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса содержит 5 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса содержит 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса содержит 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп коронавируса содержит 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может представлять собой от приблизительно 8 до приблизительно 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может представлять собой от приблизительно 9 до приблизительно 22 аминокислот.

Антигены коронавируса могут предусматривать антигены, распознаваемые В-клетками, антигены, распознаваемые Т-клетками, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антигены предусматривают антигены, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления антигены коронавируса представляют собой антигены, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления антигены коронавируса предусматривают антигены, распознаваемые Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления антигены представляют собой антигены, распознаваемые Т-клетками.

Эпитопы коронавируса предусматривают эпитопы, распознаваемые В-клетками, эпитопы, распознаваемые Т-клетками, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления эпитопы коронавируса предусматривают эпитопы, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления эпитопы представляют собой эпитопы, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления эпитопы коронавируса предусматривают эпитопы, распознаваемые Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления эпитопы коронавируса представляют собой эпитопы, распознаваемые Т-клетками.

Методики идентификации антигенов и эпитопов *in silico* были раскрыты, например, в работе Sanchez-Trincado, et al. (2017), Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction., Journal of immunology research; Grifoni, Alba, et al. A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2. Cell host & microbe (2020); Russi et al. In silico prediction of T-and B-cell epitopes in PmpD: First step towards to the design of a Chlamydia trachomatis vaccine. biomedical journal 41.2 (2018): 109-117; Baruah, et al. Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV. Journal of Medical Virology (2020); каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

10 Линейный полирибонуклеотид по настоящему изобретению может содержать последовательности любого количества антигенов и/или эпитопов коронавируса. Линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по 15 меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или больше антигенов или эпитопов коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из не более чем 1, не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450, не более чем 500 или меньше антигенов или эпитопов коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит 30 последовательность, например, из приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 антигенов или эпитопов коронавируса.

Линейный полирибонуклеотид может содержать последовательность для одного или нескольких эпитопов коронавируса из антигена коронавируса. Например, антиген

коронавируса может предусматривать аминокислотную последовательность, которая может содержать несколько эпитопов коронавируса (например, эпитопов, распознаваемых В-клеткой и/или Т-клеткой), и линейный полирибонуклеотид может содержать или кодировать один или несколько из данных эпитопов коронавируса.

5 Линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по
10 меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или больше эпитопов из одного антигена коронавируса.

15 В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит, например, последовательность из не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100,
20 не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450 или не более чем 500 или меньше эпитопов коронавируса из одного антигена коронавируса.

 В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30,
25 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 эпитопов коронавируса из одного антигена коронавируса.

 Линейный полирибонуклеотид может кодировать варианты антигена или эпитопа коронавируса. Варианты могут представлять собой встречающиеся в природе варианты
30 (например, варианты, идентифицированные в данных о последовательностях, полученных от различных родов, видов, изолятов или квазивидов коронавируса) или могут представлять собой производные последовательности, раскрытые в данном документе, которые были образованы *in silico* (например, антиген или эпитопы с одной или несколькими аминокислотными вставками, делециями, заменами или их комбинациями по сравнению с антигеном или эпитопом дикого типа).

Линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или больше вариантов антигена или эпитопа коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450, не более чем 500 или меньше вариантов антигена или эпитопа коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, например, из приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 вариантов антигена или эпитопа коронавируса.

Последовательность антигена и/или эпитопа коронавируса из линейного полирибонуклеотида может также называться экспрессионной последовательностью коронавируса. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей коронавируса, каждая из которых может кодировать полипептид коронавируса. Полипептид коронавируса может вырабатываться в значительных количествах. Полипептид коронавируса может представлять собой полипептид коронавируса, который секретируется из клетки или локализуется в цитоплазматическом, ядерном или мембранном компартменте клетки. Некоторые полипептиды коронавируса предусматривают без ограничения антиген, раскрытый в данном документе, эпитоп, раскрытый в данном документе, по меньшей мере часть белка коронавируса (например, вирусного белка оболочки, вирусного матриксного белка, вирусного шиповидного белка, вирусного мембранного белка, вирусного

нуклеокапсидного белка, вирусного вспомогательного белка, их фрагмента или их комбинации). В некоторых вариантах осуществления полипептид коронавируса, кодируемый линейным полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, содержит фрагмент антигена коронавируса, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид коронавируса, кодируемый линейным полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше антигенов коронавируса, раскрытых в данном документе, или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления полипептид коронавируса, кодируемый линейным полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, содержит эпитоп коронавируса. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый линейным полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше эпитопов коронавируса, раскрытых в данном документе, например искусственную пептидную последовательность, содержащую совокупность предсказанных эпитопов из одного или нескольких коронавирусов по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные белки коронавируса, которые экспрессируются из линейного полирибонуклеотида, раскрытого в данном документе, предусматривают секретлируемый белок, например белок (например, антиген и/или эпитоп), который в естественных условиях содержит сигнальный пептид, или таковой, который обычно не кодирует сигнальный пептид, но модифицирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный пептид.

Линейный полирибонуклеотид

Линейный полирибонуклеотид содержит элементы, описанные ниже, а также антиген или эпитоп коронавируса, описанные в данном документе.

Линейные полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, представляют собой полирибонуклеотидную молекулу, характеризующуюся наличием 5'- и 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления линейная РНК характеризуется наличием свободных 5'-конца или 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления линейная РНК характеризуется наличием 5'-конца или 3'-конца, которые являются модифицированными или защищенными от разрушения. В некоторых вариантах осуществления линейная РНК характеризуется наличием нековалентно связанных 5'- или 3'-концов. В некоторых вариантах осуществления линейная РНК представляет собой мРНК.

Линейная РНК может быть модифицирована на ее концах для улучшения стабильности и/или уменьшения разрушения. Например, свободный 5'-конец и/или

свободный 3'-конец содержат кэп, поли(А)-хвост, G-квадруплекс, псевдоузел, стабильную концевую структуру "стебель-петля", U-богатый элемент экспрессии, элемент, способствующий удержанию в ядре (ENE), или конъюгационный компонент. Например, свободный 5'-конец и/или свободный 3'-конец содержат защитное средство для конца, такое как кэп, поли(А)-хвост, G-квадруплекс, псевдоузел, стабильная концевая структура "стебель-петля", U-богатый элемент экспрессии, элемент, способствующий удержанию в ядре (ENE), или конъюгационный компонент.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид имеет размер по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 75 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 200 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 300 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 400 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 1000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 2000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 5000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 6000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 7000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 8000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 9000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 10000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 12000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 14000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 15000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 16000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 17000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 18000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 19000 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 20000 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид может иметь размер, достаточный для размещения сайта связывания с рибосомой. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер линейного полирибонуклеотида может быть настолько большим, насколько позволяют технические ограничения получения линейного полирибонуклеотида и/или применения линейного полирибонуклеотида. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают возможным, что из ДНК могут быть получены несколько сегментов РНК, а их свободные 5'- и 3'-концы могут быть отождествлены с образованием "нити" РНК. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер линейного полирибонуклеотида может быть ограничен способностью к упаковке и доставке РНК к мишени. В некоторых вариантах осуществления

размер линейного полирибонуклеотида представляет собой длину, достаточную для кодирования применимых полипептидов, таких как антигены и/или эпитопы по настоящему изобретению, и, таким образом, значения длины, составляющие по меньшей мере 20000 нуклеотидов, по меньшей мере 15000 нуклеотидов, по меньшей мере 10000 нуклеотидов, по меньшей мере 7500 нуклеотидов или по меньшей мере 5000 нуклеотидов, по меньшей мере 4000 нуклеотидов, по меньшей мере 3000 нуклеотидов, по меньшей мере 2000 нуклеотидов, по меньшей мере 1000 нуклеотидов, по меньшей мере 500 нуклеотидов, по меньшей мере 400 нуклеотидов, по меньшей мере 300 нуклеотидов, по меньшей мере 200 нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов или по меньшей мере 70 нуклеотидов, могут быть применимыми.

Элементы линейного полирибонуклеотида

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит один или несколько из элементов, описанных в данном документе, в качестве дополнения к содержанию последовательности, кодирующей антиген и/или эпитоп коронавируса.

Например, линейный полирибонуклеотид содержит регуляторный элемент, например последовательность, которая модифицирует экспрессию экспрессионной последовательности в линейном полирибонуклеотиде. Регуляторный элемент может содержать последовательность, которая расположена рядом с экспрессионной последовательностью, кодирующей продукт экспрессии. Регуляторный элемент может быть функционально связан с соседней последовательностью. Регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества экспрессируемого продукта по сравнению с количеством экспрессируемого продукта в отсутствие регуляторного элемента. Кроме того, один регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества продуктов, экспрессируемых из нескольких экспрессионных последовательностей, соединенных в тандем. Таким образом, один регуляторный элемент может обеспечивать усиление экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей. Несколько регуляторных элементов также можно применять, например, для дифференцированной регуляции экспрессии различных экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент, представленный в данном документе, может предусматривать последовательность для избирательной трансляции. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательной трансляции" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая избирательно инициирует или активирует трансляцию экспрессионной последовательности в линейном полирибонуклеотиде, например к некоторым аптазимам рибопереключателю.

Регуляторный элемент также может включать последовательность для избирательного разрушения. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательного разрушения" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая инициирует разрушение линейного полирибонуклеотида или продукта экспрессии линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент является модулятором трансляции. Модулятор трансляции может модулировать трансляцию экспрессионной последовательности в линейном полирибонуклеотиде. Модулятор трансляции может являться энхансером или супрессором трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции может функционировать в качестве регуляторного элемента.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид кодирует антиген, который обеспечивает получение поликлональных антител, представляющих интерес, и содержит последовательность инициации трансляции, например старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции включает в себя последовательность Козак или Шайна-Дальгарно. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность инициации трансляции, например последовательность Козак, расположенную рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции представляет собой некодирующий старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность инициации трансляции, расположенную рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции обеспечивает конформационную гибкость линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции расположена в пределах по сути одонитевой области линейного полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит элемент, представляющий собой участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Элемент IRES, подходящий для включения в линейный полирибонуклеотид, может представлять собой последовательность РНК, способную соединиться с эукариотической рибосомой.

Линейный полирибонуклеотид может содержать одну или несколько экспрессионных последовательностей (например, кодирующих антиген), и каждая экспрессионная последовательность может содержать терминирующий элемент или не содержать такового.

5 В некоторых вариантах осуществления линейный полинуклеотид содержит 5'-кэп, где структура 5'-кэпа мРНК обеспечивает повышение стабильности мРНК. 5'-кэп связывается с белком, связывающим кэп мРНК (МВР), что способствует стабильности мРНК в клетке и трансляционной компетентности посредством ассоциации СВР с поли(А)-связывающим белком с образованием зрелой молекулы РНК.

10 В некоторых вариантах осуществления линейный полинуклеотид кэпирован на 5'-конце и содержит 5'-ppp-5'-трифосфатную связь между концевым остатком гуанозинового кэпа и 5'-концевым транскрибируемым смысловым нуклеотидом из линейного полинуклеотида. Данный гуанозиновый 5'-кэп, также известный как гуанилатный 5'-кэп, может быть метилирован с образованием N7-метилгуанилатного кэпа.

15 В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит нетранслируемые области (UTR). UTR геномной области, содержащей ген, могут транскрибироваться, но не транслироваться. В некоторых вариантах осуществления UTR может быть включена выше последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления UTR может быть включена ниже экспрессионной последовательности, описанной в данном документе. В некоторых случаях одна UTR для первой экспрессионной последовательности является той же, что и другая UTR для второй экспрессионной последовательности, или расположена непрерывно с ней или перекрывается с ней. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой интрон человека. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой полноразмерный интрон человека, например, ZKSCAN1.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность поли(А). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(А) составляет более 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(А) составляет более чем 15 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более чем приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, и 3,000 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(А)

составляет от приблизительно 10 до приблизительно 3000 нуклеотидов (например, от 30 до 50, от 30 до 100, от 30 до 250, от 30 до 500, от 30 до 750, от 30 до 1000, от 30 до 1500, от 30 до 2000, от 30 до 2500, от 50 до 100, от 50 до 250, от 50 до 500, от 50 до 750, от 50 до 1000, от 50 до 1500, от 50 до 2000, от 50 до 2500, от 50 до 3000, от 100 до 500, от 100 до 750, от 100 до 1000, от 100 до 1500, от 100 до 2000, от 100 до 2500, от 100 до 3000, от 500 до 750, от 500 до 1000, от 500 до 1500, от 500 до 2000, от 500 до 2500, от 500 до 3000, от 1000 до 1500, от 1000 до 2000, от 1000 до 2500, от 1000 до 3000, от 1500 до 2000, от 1500 до 2500, от 1500 до 3000, от 2000 до 3000, от 2000 до 2500 и от 2500 до 3000).

В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(А) разработана относительно длины всего линейного полирибонуклеотида. Разработка может проводиться, исходя из длины кодирующей области, длины конкретного элемента или области (такой как первая или фланкирующие области) или исходя из длины конечного продукта, экспрессируемого из линейного полирибонуклеотида. В данной ситуации последовательность поли(А) может иметь на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% большую длину, чем линейный полирибонуклеотид или его элемент. Последовательность поли(А) также может быть разработана в качестве части линейного полирибонуклеотида. В данной ситуации длина последовательности поли(А) может составлять 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% или больше от общей длины конструкции или общей длины конструкции без последовательности поли(А). Дополнительно, сконструированные сайты связывания и их конъюгация с линейным полирибонуклеотидом для связывания с поли(А)-связывающим белком могут обеспечивать усиление экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид разработан так, что он содержит структуру поли(А)-G-квартет. G-квартет представляет собой циклический комплекс из четырех гуаниновых нуклеотидов, стабилизированный водородными связями, который может образовываться G-богатыми последовательностями как в ДНК, так и в РНК. В некоторых вариантах осуществления G-квартет может быть включен на конце последовательности поли(А). Полученная в результате линейная полирибонуклеотидная конструкция может быть проанализирована в отношении стабильности, выработки белка и/или других параметров, в том числе периода полужизни, в различные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления структура поли(А)-G-квартет может приводить к выработке белка, эквивалентной по меньшей мере 75% от наблюдаемой при использовании отдельно последовательности поли(А), состоящей из 120 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит UTR с одним или несколькими отрезками из аденозиновых и уридиновых остатков, включенными в ее состав. AU-богатые сигнатуры могут повышать скорость метаболизма продукта экспрессии.

5 Введение, удаление или модификация AU-богатых элементов (ARE) UTR могут быть применимыми для модулирования стабильности или иммуногенности линейного полирибонуклеотида. При конструировании конкретных линейных полирибонуклеотидов одна или несколько копий ARE могут быть введены для дестабилизации линейного полирибонуклеотида, и копии ARE могут снижать трансляцию и/или снижать выработку
10 продукта экспрессии. Аналогично, ARE могут быть идентифицированы и удалены или быть подвергнуты мутации для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, повышения трансляции и выработки получаемого в результате белка.

UTR из любого гена может быть включена в состав соответствующих фланкирующих областей линейного полирибонуклеотида (например, на 5'-конце или 3'-
15 конце). Кроме того, можно использовать несколько UTR дикого типа из любого известного гена. В некоторых вариантах осуществления могут применяться искусственные UTR, которые не являются вариантами генов дикого типа. Эти UTR или их части могут быть размещены в той же ориентации, что и в транскрипте, из которого они были выбраны, или их ориентация или местоположение могут быть изменены. Следовательно, 5'- или 3'-UTR
20 могут быть инвертированы, укорочены, удлинены или химеризованы с помощью одной или нескольких других 5'- или 3'-UTR. Используемый в данном документе термин "измененный", который относится к последовательности UTR, означает, что UTR была некоторым образом изменена по сравнению с эталонной последовательностью. Например, 3'- или 5'-UTR могут быть изменены по сравнению с UTR дикого типа или нативной UTR
25 путем изменения ориентации или местоположения, как изложено выше, или могут быть изменены путем включения дополнительных нуклеотидов, делеции нуклеотидов, обмена или транспозиции нуклеотидов. Любое из этих изменений, дающих в результате "измененную" UTR (3'- или 5'-), охватывает вариант UTR.

В некоторых вариантах осуществления может использоваться двойная UTR, тройная
30 UTR или четверная UTR, такая как 5'- или 3'-UTR. Как используется в данном документе, "двойная" UTR является той, в которой две копии одной и той же UTR кодируются последовательно или по сути последовательно. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения может использоваться двойная 3'-UTR гена бета-глобина.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит одну или несколько последовательностей регуляторной нуклеиновой кислоты или содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, которые кодируют регуляторную нуклеиновую кислоту, например, нуклеиновую кислоту, которая модифицирует экспрессию эндогенного гена и/или экзогенного гена. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность линейного полирибонуклеотида, представленного в данном документе, может содержать последовательность, которая является бессмысловой по отношению к регуляторной нуклеиновой кислоте, такой как некодирующая РНК, как, например, без ограничения тРНК, lncRNA, miRNA, рРНК, snRNA, микроРНК, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA, exRNA, scaRNA, Y-РНК и hnRNA.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид вырабатывает продукты экспрессии в стехиометрических соотношениях. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции, так что продукты экспрессии вырабатываются в по сути эквивалентных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции нескольких продуктов экспрессии, например продуктов с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше экспрессионных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит один или несколько рибопереключателей.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит аптазим.

В некоторых вариантах осуществления в линейном полирибонуклеотиде отсутствует 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления в линейном полирибонуклеотиде отсутствует 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления в линейном полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(А). В некоторых вариантах осуществления в линейном полирибонуклеотиде отсутствует терминирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления в линейном полирибонуклеотиде отсутствует участок внутренней посадки рибосомы. В некоторых вариантах осуществления у линейного полирибонуклеотида отсутствует способность к связыванию с кэп-связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления в линейном полирибонуклеотиде отсутствует 5'-кэп.

Способы получения

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе и может быть получена с использованием рекомбинантной технологии (например, может
5 быть получена *in vitro* с использованием ДНК-плазмиды), химического синтеза или их комбинации.

В объем настоящего изобретения входит то, что молекула ДНК, используемая для получения РНК, может содержать последовательность ДНК из встречающейся в природе исходной последовательности нуклеиновой кислоты, ее модифицированный вариант или
10 последовательность ДНК, кодирующую синтетический полипептид, обычно не обнаруживаемый в природе (например, химерные молекулы или слитые белки, такие как слитые белки, содержащие несколько антигенов и/или эпитопов). Молекулы ДНК и РНК могут быть модифицированы с использованием различных методик, в том числе без
15 ограничения классических методик мутагенеза и рекомбинантных методик, таких как сайт-направленный мутагенез, химическая обработка молекулы нуклеиновой кислоты с целью индукции мутаций, расщепление фрагмента нуклеиновой кислоты ферментом рестрикции, лигирование фрагментов нуклеиновой кислоты, амплификация с помощью полимеразной
цепной реакции (ПЦР) и/или мутагенез выбранных областей последовательности нуклеиновой кислоты, синтез смесей олигонуклеотидов и лигирование групп смесей для
20 "создания" смеси молекул нуклеиновой кислоты и их комбинаций.

Линейный полирибонуклеотид может быть получен в соответствии с любой доступной методикой, в том числе без ограничения с помощью химического синтеза и ферментативного синтеза. В некоторых вариантах осуществления линейную первичную
25 конструкцию или линейную мРНК можно подвергнуть конкатемеризации для создания линейного полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Механизм конкатемеризации можно осуществлять с помощью таких способов, как без ограничения химические, ферментативные способы, способы лигирования с помощью шунта или рибозимного катализа. Новообразовавшаяся 5'-/3'-связь может представлять собой
внутримолекулярную связь или межмолекулярную связь.

30 Способы получения линейного полирибонуклеотида, описанного в данном документе, описаны, например, в Khudyakov & Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications*, CRC Press (2002); в Zhao, *Synthetic Biology: Tools and Applications*, (первое издание), Academic Press (2013); и Egli & Herdewijn, *Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids*, (первое издание), Wiley-VCH (2012).

В уровне техники также описаны различные способы синтеза линейных полирибонуклеотидов (см., например, патент США № US6210931, патент США № US5773244, патент США № US5766903, патент США № US5712128, патент США № US5426180, публикацию заявки на патент США № US20100137407, международную публикацию № WO1992001813 и международную публикацию № WO2010084371; содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

В настоящем изобретении представлены иммуногенные композиции, содержащие кольцевой полирибонуклеотид, описанный выше. В настоящем изобретении представлены иммуногенные композиции, содержащие линейный полирибонуклеотид, описанный выше. Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут содержать разбавитель или носитель, адъювант или любую их комбинацию. Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут также содержать одно или несколько иммунорегуляторных средств, например, один или несколько адъювантов. Адъюванты могут включать адъювант ТН1 и/или адъювант ТН2, дополнительно описанные ниже. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит разбавитель, не содержащий какого-либо носителя, и применяется для доставки субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) кольцевого полирибонуклеотида в "голом" виде. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит разбавитель, не содержащий какого-либо носителя, и применяется для доставки субъекту линейного полирибонуклеотида в "голом" виде.

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению применяются для вызова иммунного ответа у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). Иммунный ответ может предусматривать ответ в виде выработки антител (обычно включающих IgG) и/или клеточноопосредованный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции применяются для получения поликлональных антител, описанных в данном документе. Например, субъекта иммунизируют с помощью иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, содержащий антиген и/или эпитоп коронавируса, для стимуляции выработки поликлональных антител, которые связываются с антигеном и/или эпитопом коронавируса. В другом примере субъекта иммунизируют с помощью иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид, содержащий антиген и/или эпитоп коронавируса, для стимуляции выработки поликлональных антител, которые связываются с антигеном и/или эпитопом

коронавируса. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризуется наличием гуманизированной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют с использованием адьюванта. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют с помощью вакцины. Необязательно после иммунизации с помощью иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, полученные поликлональные антитела собирают у субъекта и подвергают очистке. Необязательно после иммунизации с помощью иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид, полученные поликлональные антитела собирают у субъекта и подвергают очистке. В некоторых вариантах осуществления композиция предусматривает плазму крови, собранную после введения иммуногенной композиции, описанной в данном документе.

Иммунизация

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают осуществление иммунизации субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) с помощью иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп коронавируса экспрессируются из кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует иммунный ответ у субъекта в отношении антигена и/или эпитопа коронавируса, экспрессируемых из кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует выработку поликлональных антител, которые связываются с антигеном и/или эпитопом коронавируса, экспрессируемыми из кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, первый адьювант или их комбинацию в одной композиции. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют с использованием второго адьюванта. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют с помощью вакцины.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают осуществление иммунизации субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) с помощью иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антиген и/или эпитоп коронавируса экспрессируются из линейного

полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует иммунный ответ у субъекта в отношении антигена и/или эпитопа коронавируса, экспрессируемых из линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует выработку поликлональных антител, которые
5 связываются с антигеном и/или эпитопом коронавируса, экспрессируемыми из линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию в одной композиции. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют с использованием второго адъюванта. В некоторых
10 вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют с помощью вакцины.

Кольцевой полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе, стимулирует выработку человеческих поликлональных антител посредством стимулирования адаптивного иммунного ответа после иммунизации субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). В некоторых вариантах осуществления адаптивный иммунный
15 ответ субъекта предусматривает стимуляцию В-лимфоцитов с высвобождением поликлональных антител, которые специфически связываются с антигеном коронавируса, экспрессируемым кольцевым полирибонуклеотидом. Линейный полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе, стимулирует выработку человеческих поликлональных антител посредством стимулирования адаптивного иммунного ответа после иммунизации
20 субъекта. В некоторых вариантах осуществления адаптивный иммунный ответ субъекта предусматривает стимуляцию В-лимфоцитов с высвобождением поликлональных антител, которые специфически связываются с антигеном коронавируса, экспрессируемым линейным полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления адаптивный иммунный ответ субъекта предусматривает стимулирование видов
25 клеточноопосредованного иммунного ответа.

Субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих любое число кольцевых полирибонуклеотидов. Субъекта иммунизируют с помощью, например, одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих по меньшей мере 1 кольцевой
30 полирибонуклеотид. Животное, отличное от человека, характеризующееся наличием негуманизированной иммунной системы, иммунизируют с помощью, например, одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей

мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 разных кольцевых полирибонуклеотидов или большее число кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих не более чем 1

5 кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 11, не более чем 12, не более

10 чем 13, не более чем 14, не более чем 15, не более чем 20 разных кольцевых полирибонуклеотидов или менее чем 21 разный кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих приблизительно 1 кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от

15 человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13,

20 приблизительно 14, приблизительно 15 или приблизительно 20 разных кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих приблизительно 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-15, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 4-4,

25 4-3, 5-20, 5-15, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 5-10, 10-15, или 15-20 разных кольцевых полирибонуклеотидов. Разные кольцевые полирибонуклеотиды содержат последовательности, отличающиеся друг от друга. Например, они могут предусматривать или кодировать разные антигены и/или эпитопы, перекрывающиеся антигены и/или эпитопы, сходные антигены и/или эпитопы или одинаковые антигены и/или эпитопы

30 (например, с одинаковыми или разными регуляторными элементами, последовательностями инициации, промоторами, терминирующими элементами или другими элементами по настоящему изобретению). В случаях, где субъекта иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих два или больше разных кольцевых полирибонуклеотидов, два или больше разных кольцевых

полирибонуклеотидов могут находиться в одной и той же или в разных иммуногенных композициях, и иммунизацию осуществляют в одно и то же время или в разные моменты времени. Иммуногенные композиции, содержащие два или больше разных кольцевых полирибонуклеотидов, можно вводить в одну и ту же анатомическую локализацию или в
5 разные анатомические локализации.

Два или больше разных кольцевых полирибонуклеотидов могут предусматривать или кодировать антигены и/или эпитопы из одного и того же коронавируса, разных
10 коронавирусов или разных комбинаций коронавирусов, раскрытых в данном документе. Два или больше разных кольцевых полирибонуклеотидов могут предусматривать или кодировать антигены и/или эпитопы из одного и того же коронавируса или из разных
10 коронавирусов, например из разных изолятов.

Субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих любое число
15 линейных полирибонуклеотидов. Субъекта иммунизируют с помощью, например, одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих по меньшей мере 1 линейный полирибонуклеотид. Животное, отличное от человека, характеризующееся наличием негуманизированной иммунной системы, иммунизируют с помощью, например, одной или
20 нескольких иммуногенных композиций, содержащих по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере
20 разных линейных полирибонуклеотидов или большее число линейных полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих не более чем 1
25 линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 11, не более чем 12, не более чем 13, не более чем 14, не более чем 15, не более чем 20 разных линейных
30 полирибонуклеотидов или менее чем 21 разный линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих приблизительно 1 линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от

человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, 5 приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15 или приблизительно 20 разных линейных полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих приблизительно 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-10 4, 2-3, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-15, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 4-4, 4-3, 5-20, 5-15, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 5-10, 10-15, или 15-20 разных линейных полирибонуклеотидов. Разные линейные полирибонуклеотиды содержат последовательности, отличающиеся друг от друга. Например, они могут предусматривать или кодировать разные антигены и/или эпитопы, перекрывающиеся антигены и/или 15 эпитопы, сходные антигены и/или эпитопы или одинаковые антигены и/или эпитопы (например, с одинаковыми или разными регуляторными элементами, последовательностями инициации, промоторами, терминирующими элементами или другими элементами по настоящему изобретению). В случаях, где субъекта иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих два или больше 20 разных линейных полирибонуклеотидов, два или больше разных линейных полирибонуклеотидов могут находиться в одной и той же или в разных иммуногенных композициях, и иммунизацию осуществляют в одно и то же время или в разные моменты времени. Иммуногенные композиции, содержащие два или больше разных линейных полирибонуклеотидов, можно вводить в одну и ту же анатомическую локализацию или в 25 разные анатомические локализации.

Два или больше разных линейных полирибонуклеотидов могут предусматривать или кодировать антигены и/или эпитопы из одного и того же коронавируса, разных 30 коронавирусов или разных комбинаций коронавирусов, раскрытых в данном документе. Два или больше разных линейных полирибонуклеотидов могут предусматривать или кодировать антигены и/или эпитопы из одного и того же коронавируса или из разных 30 коронавирусов, например из разных изолятов.

В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) иммунизируют с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих любое число кольцевых полирибонуклеотидов, и одной или

нескольких иммуногенных композиций, содержащих любое число линейных полирибонуклеотидов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция, раскрытая в данном документе, содержит один или несколько кольцевых полирибонуклеотидов и один или несколько линейных полирибонуклеотидов, раскрытых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию. В конкретном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и носитель или разбавитель, не содержащий какого-либо носителя. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид с разбавителем, не содержащим какого-либо носителя, применяется для доставки субъекту кольцевого полирибонуклеотида в "голом" виде. В другом конкретном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и первый адъювант.

В определенных вариантах осуществления субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) дополнительно вводят второй адъювант. Адъювант обеспечивает усиление врожденного иммунного ответа, который в свою очередь обеспечивает усиление адаптивного иммунного ответа для выработки поликлональных антител у субъекта. Адъювант может представлять собой любой адъювант, описанный ниже. В определенных вариантах осуществления адъювант составляют с кольцевым полирибонуклеотидом в качестве части иммуногенной композиции. В определенных вариантах осуществления адъювант не является частью иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В определенных вариантах осуществления адъювант вводят отдельно от иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В данном аспекте адъювант вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличный от момента времени введения указанной композиции. Например, адъювант вводят через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов после иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3

часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа, или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов до иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Например, адъювант вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или
5 любое промежуточное число дней после иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней до иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Адъювант вводят в ту же анатомическую локализацию или в другую анатомическую
10 локализацию по сравнению с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию. В конкретном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит
15 линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и носитель или разбавитель, не содержащий какого-либо носителя. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция, содержащая линейный полирибонуклеотид с разбавителем, не содержащим какого-либо носителя, применяется для доставки субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) линейного полирибонуклеотида в "голом" виде. В
20 другом конкретном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и первый адъювант.

В определенных вариантах осуществления субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) дополнительно вводят второй адъювант. Адъювант обеспечивает усиление врожденного иммунного ответа, который в свою очередь обеспечивает усиление
25 адаптивного иммунного ответа для выработки поликлональных антител у субъекта. Адъювант может представлять собой любой адъювант, описанный ниже. В определенных вариантах осуществления адъювант составляют с линейным полирибонуклеотидом в качестве части иммуногенной композиции. В определенных вариантах осуществления адъювант не является частью иммуногенной композиции, содержащей линейный
30 полирибонуклеотид. В определенных вариантах осуществления адъювант вводят отдельно от иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В данном аспекте адъювант вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличный от момента времени введения указанной композиции.

Например, адъювант вводят через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов после иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа, или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов до иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. Например, адъювант вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней после иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней до иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. Адъювант вводят в ту же анатомическую локализацию или в другую анатомическую локализацию по сравнению с иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) дополнительно иммунизируют с помощью второго средства, например вакцины (описанной ниже), которая не представляет собой кольцевой полирибонуклеотид. Вакцину вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличный от момента времени введения указанной композиции. Например, вакцину вводят через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов после иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления вакцину вводят за 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или за любое промежуточное число минут или часов до иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Например, вакцину вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней после иммуногенной композиции, содержащей

кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления вакцину вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней до иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) дополнительно иммунизируют с помощью второго средства, например вакцины (описанной ниже), которая не представляет собой линейный полирибонуклеотид. Вакцину вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличный от момента времени введения указанной композиции. Например, вакцину вводят через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов после иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления вакцину вводят за 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов до иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. Например, вакцину вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней после иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления вакцину вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней до иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид.

Субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) можно подвергать иммунизации с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации любое подходящее число раз для достижения требуемого ответа. Например, можно использовать стратегию иммунизации "прайм-буст" для обеспечения образования гипериммунной плазмы крови, содержащей высокую концентрацию антител, которые связываются с антигенами и/или эпитопами по настоящему изобретению. Субъекта можно иммунизировать с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению, например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по

меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 раз или больше.

В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) можно подвергать иммунизации с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15 или не более чем 20 раз или меньше.

В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) можно подвергать иммунизации с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 раз.

В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) можно подвергать иммунизации с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению один раз. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению два раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению три раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению четыре раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению пять раз. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью иммуногенной композиции, адъюванта, вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации по настоящему изобретению семь раз.

Для разделения двух или больше иммунизаций можно выбирать подходящие промежутки времени. Промежутки времени могут относиться к многократным иммунизациям с помощью одной и той же иммуногенной композиции, адъюванта или

вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации, например, ту же иммуногенную композицию, адъювант или вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию можно вводить в том же количестве или в разных количествах с помощью того же пути иммунизации или с помощью разных путей иммунизации. Промежутки времени могут относиться к иммунизациям с помощью разных средств, например первой иммуногенной композиции, содержащей первый кольцевой полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей второй кольцевой полирибонуклеотид. Промежутки времени могут относиться к первой иммуногенной композиции, содержащей первый линейный полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей второй линейный полирибонуклеотид. Для режимов, предусматривающих три или больше иммунизаций, промежутки времени между иммунизациями могут быть одинаковыми или разными. В некоторых примерах между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 48, или 72 часа. В некоторых примерах между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 28, или 30 дней. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель. В некоторых примерах между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36 или по меньшей мере 72 часа или больше. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит не более чем 1, не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 24, не более чем 36 или не более чем 72 часа или меньше.

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26 по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по

меньшей мере 30 дней или больше. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 21, не более чем 22, не более чем 23, не более чем 24, не более чем 25, не более чем 26, не более чем 27, не более чем 28, не более чем 29, не более чем 30, не более чем 32, не более чем 34 или не более чем 36 дней или меньше.

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или по меньшей мере 8 недель или больше.

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8 недель или меньше.

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или по меньшей мере 8 месяцев или больше.

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8 месяцев или меньше.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют 3 раза с 3-4-недельными промежутками.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает предварительное введение средства для улучшения видов иммуногенного ответа субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека (например, животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы), или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антиген, раскрытый в данном документе (например, белковый антиген). Например, способ предусматривает введение белкового антигена за 1-7 дней до введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый антиген. В некоторых вариантах осуществления белковый антиген вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый антиген. Например, способ предусматривает введение белкового антигена за 1-7 дней до введения линейного

полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый антиген. В некоторых вариантах осуществления белковый антиген вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до введения линейного полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый антиген. Белковый антиген может быть введен в виде препарата на основе белка, закодирован в плазмиде (pDNA), представлен в вирусоподобной частице (VLP), составлен в липидной наночастице (LNP) или т. п.

Субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) можно подвергать иммунизации с помощью иммуногенной композиции, адъюванта или вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации в любом подходящем количестве анатомических участков. Одну и ту же иммуногенную композицию, адъювант, вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию можно вводить в несколько анатомических участков, разные иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или разные кольцевые полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию можно вводить в разные анатомические участки, разные иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или разные кольцевые полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, субъединичные белковые вакцины) или их комбинацию можно вводить в один и тот же анатомический участок или любую их комбинацию. Например, иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, можно вводить в два разных анатомических участка, и/или иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, можно вводить в один анатомический участок, а адъювант можно вводить в другой анатомический участок. Одну и ту же иммуногенную композицию, адъювант, вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию можно вводить в несколько анатомических участков, разные иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или разные линейные полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию можно вводить в разные анатомические участки, разные иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или разные линейные полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, субъединичные белковые вакцины) или их комбинацию можно вводить в один и тот же анатомический участок или любую их комбинацию. Например, иммуногенную композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид, можно вводить в два разных анатомических участка, и/или иммуногенную композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид, можно вводить в один анатомический участок, а адъювант можно вводить в другой анатомический участок.

Иммунизацию с использованием двух или больше анатомических путей можно осуществлять посредством одного и того же пути иммунизации (например, внутримышечного) или посредством двух или больше путей иммунизации. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, адъювант или вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию, по настоящему изобретению вводят в по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 анатомических участков субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта). В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, адъювант или вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию, по настоящему изобретению вводят в не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, или не более чем 10 анатомических участков или в меньшее число анатомических участков субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид или адъювант, по настоящему изобретению вводят в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 анатомических участков субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид, адъювант или вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию, по настоящему изобретению вводят в по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 анатомических участков субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид, адъювант или вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию, по настоящему изобретению вводят в не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9 или не более чем 10 анатомических участков или в меньшее число анатомических участков субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид или адъювант, по настоящему изобретению вводят в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 анатомических участков субъекта.

Иммунизацию можно осуществлять любым подходящим путем. Неограничивающие примеры путей иммунизации включают внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интратекальный, интракапсулярный, внутриглазничный, внутрисердечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, транстрахеальный, подкожный, субкутикулярный, внутрисуставный, субкапсулярный, субарахноидальный,

интраспинальный, эпидуральный, внутригрудинный, интрацеребральный, внутриглазной, внутриочаговый, интрацеребровентрикулярный, интрацистернальный или интрапаренхиматозный путь, например инъекцию и инфузию. В некоторых случаях иммунизацию можно осуществлять путем ингаляции. Две или больше иммунизаций можно
5 осуществлять одним и тем же путем или разными путями.

Любое подходящее количество кольцевого полирибонуклеотида можно вводить субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) по настоящему изобретению. Например, субъекта можно иммунизировать с помощью по меньшей мере приблизительно
10 1 нг, по меньшей мере приблизительно 10 нг, по меньшей мере приблизительно 100 нг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг, по меньшей мере приблизительно 100 мкг, по меньшей мере приблизительно 1 мг, по меньшей мере приблизительно 10 мг, по меньшей мере приблизительно 100 мг или по меньшей мере приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью не более чем приблизительно
15 1 нг, не более чем приблизительно 10 нг, не более чем приблизительно 100 нг, не более чем приблизительно 1 мкг, не более чем приблизительно 10 мкг, не более чем приблизительно 100 мкг, не более чем приблизительно 1 мг, не более чем приблизительно 10 мг, не более чем приблизительно 100 мг или не более чем приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно
20 иммунизировать с помощью приблизительно 1 нг, приблизительно 10 нг, приблизительно 100 нг, приблизительно 1 мкг, приблизительно 10 мкг, приблизительно 100 мкг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 100 мг или приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида.

Любое подходящее количество линейного полирибонуклеотида можно вводить субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) по настоящему изобретению. Например, субъекта можно иммунизировать с помощью по меньшей мере приблизительно
25 1 нг, по меньшей мере приблизительно 10 нг, по меньшей мере приблизительно 100 нг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг, по меньшей мере приблизительно 100 мкг, по меньшей мере приблизительно 1 мг, по меньшей мере приблизительно 10 мг, по меньшей мере приблизительно 100 мг или по меньшей мере
30 приблизительно 1 г линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью не более чем приблизительно 1 нг, не более чем приблизительно 10 нг, не более чем приблизительно 100 нг, не более чем приблизительно 1 мкг, не более чем приблизительно 10 мкг, не более чем приблизительно

100 мкг, не более чем приблизительно 1 мг, не более чем приблизительно 10 мг, не более чем приблизительно 100 мг или не более чем приблизительно 1 г линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью приблизительно 1 нг, приблизительно 10 нг, приблизительно 5 100 нг, приблизительно 1 мкг, приблизительно 10 мкг, приблизительно 100 мкг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 100 мг или приблизительно 1 г линейного полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает осуществление оценки субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, 10 или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта), в отношении ответа на антиген в виде выработки антител. В некоторых вариантах осуществления оценку осуществляют до и/или после введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую антиген коронавируса. В некоторых вариантах осуществления оценку осуществляют до и/или после введения линейного 15 полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую антиген коронавируса.

Разбавитель

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит кольцевой полирибонуклеотид и разбавитель. В некоторых 20 вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит линейный полирибонуклеотид и разбавитель.

Разбавитель может представлять собой вспомогательное вещество, отличное от носителя. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, служит в качестве среды-носителя или среды для композиции, такой как композиция на основе кольцевого 25 полирибонуклеотида, описанная в данном документе. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, служит в качестве среды-носителя или среды для композиции, такой как композиция на основе линейного полирибонуклеотида, описанная в данном документе. Неограничивающие примеры вспомогательного вещества, отличного от носителя, включают растворители, водные растворители, неводные растворители, дисперсионные 30 среды, разбавители, дисперсии, суспендирующие средства, поверхностно-активные средства, изотонические средства, загустители, эмульгаторы, консерванты, полимеры, пептиды, белки, клетки, гиалуронидазы, диспергирующие средства, гранулирующие средства, средства для улучшения распадаемости, связывающие средства, буферные средства (например, фосфатно-солевой буфер (PBS)), смазывающие средства, масла и их

смеси. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой любой из неактивных ингредиентов, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством продуктов и лекарственных средств (FDA) Соединенных Штатов Америки и перечисленных в Базе данных неактивных ингредиентов, который не демонстрирует эффекта проникновения в клетку. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой любой неактивный ингредиент, подходящий для введения животному, отличному от человека, например, подходящий для ветеринарного применения. Модификация композиций, подходящих для введения людям, для того, чтобы сделать композиции подходящими для введения различным животным, является широко распространенной, и специалист средней квалификации в области ветеринарной фармакологии может разработать и/или осуществить такую модификацию путем проведения лишь обычных экспериментов в случае необходимости таковых.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид можно доставлять в виде состава для доставки в "голом" виде, например такого, содержащего разбавитель. Состав для доставки в "голом" виде обеспечивает доставку кольцевого полирибонуклеотида к клетке без помощи носителя и без модификации или частичной или полной инкапсуляции кольцевого полирибонуклеотида, кэпированного полирибонуклеотида или их комплекса.

Состав для доставки в "голом" виде представляет собой состав, который не содержит носителя, и где кольцевой полирибонуклеотид находится без ковалентной модификации, которая обеспечивает связывание компонента, который способствует доставке к клетке, или без частичной или полной инкапсуляции кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид без ковалентной модификации, которая обеспечивает связывание компонента, который способствует доставке к клетке, представляет собой полирибонуклеотид, который не является ковалентно связанным с белком, малой молекулой, частицей, полимером или биополимером. Кольцевой полирибонуклеотид без ковалентной модификации, которая обеспечивает связывание компонента, который способствует доставке к клетке, не содержит модифицированную фосфатную группу. Например, кольцевой полирибонуклеотид без ковалентной модификации, которая обеспечивает связывание компонента, который способствует доставке к клетке, не содержит фосфотиоата, фосфоселенатов, боранофосфатов, боранофосфатных сложных эфиров, гидрофосфонатов, фосфорамидатов, фосфодиамидатов, алкил- или арилфосфонатов или фосфотриэфиров.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид можно доставлять в виде состава для доставки в "голом" виде, например такового, содержащего разбавитель. Состав для доставки в "голом" виде обеспечивает доставку линейного полирибонуклеотида к клетке без помощи носителя и без модификации или частичной или

5 полной инкапсуляции линейного полирибонуклеотида, кэпированного полирибонуклеотида или их комплекса.

Состав для доставки в "голом" виде представляет собой состав, который не содержит носителя, и где линейный полирибонуклеотид находится без ковалентной модификации, которая обеспечивает связывание компонента, который способствует доставке к клетке,

10 или без частичной или полной инкапсуляции линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид без ковалентной модификации, которая обеспечивает связывание компонента, который способствует доставке к клетке, представляет собой полирибонуклеотид, который не является ковалентно связанным с белком, малой молекулой, частицей, полимером или биополимером. Линейный

15 полирибонуклеотид без ковалентной модификации, которая обеспечивает связывание компонента, который способствует доставке к клетке, не содержит модифицированную фосфатную группу. Например, линейный полирибонуклеотид без ковалентной модификации, которая обеспечивает связывание компонента, который способствует доставке к клетке, не содержит фосфотиоата, фосфоселенатов, боранофосфатов, боранофосфатных сложных эфиров, гидрофосфонатов, фосфорамидатов, фосфодиамидатов, алкил- или арилфосфонатов или фосфотриэфиров.

20

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде не содержит каких-либо или всех из реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. В

25 некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде не содержит фитогликогена октенилсукцината, фитогликогена бета-декстрина, модифицированного ангидридом фитогликогена бета-декстрина, липофектамина, полиэтиленimina, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимина, аминокликозид-полиамина, дидезоксиамино- β -циклодекстрина, спермина, спермидина, поли(2-

30 диметиламино)этилметакрилата, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированного желатина, дендримеров, хитозана, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), хлорида N-[1-(2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорида 1-[2-(олеоилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолия (DOTIM), трифторацетата 2,3-диолеоилокси-N-

[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорида 3β-[N-(N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HCl), дигептадециламидоглицилспермидина (DOGS), бромида N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромида N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопroteина низкой плотности (LDL), липопroteина высокой плотности (HDL) или глобулина.

В определенных вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде содержит вспомогательное вещество, отличное от носителя. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество, отличное от носителя, предусматривает неактивный ингредиент, который не демонстрирует эффект проникновения в клетку. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество, отличное от носителя, предусматривает буфер, например PBS. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество, отличное от носителя, представляет собой растворитель, неводный растворитель, разбавитель, суспендирующее средство, поверхностно-активное средство, изотоническое средство, загуститель, эмульгатор, консервант, полимер, пептид, белок, клетку, гиалуронидазу, диспергирующее средство, гранулирующее средство, средство для улучшения распадаемости, связывающее средство, буферное средство, смазывающее средство или масло.

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде содержит разбавитель. Разбавитель может представлять собой жидкий разбавитель или твердый разбавитель. В некоторых вариантах осуществления разбавитель представляет собой средство для солюбилизации РНК, буфер или изотоническое средство. Примеры средства для солюбилизации РНК включают воду, этанол, метанол, ацетон, формамид и 2-пропанол. Примеры буфера включают 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), бис-Tris, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)-(карбоксиметил)амино]уксусную кислоту (ADA), N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфоновую кислоту (ACES), пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота) (PIPES), 2-[[1,3-дигидрокси-2-(гидроксиметил)пропан-2-ил]амино]этансульфоновую кислоту (TES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновую кислоту (MOPS), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), Tris, трицин, Gly-Gly, бицин или фосфат. Примеры изотонического средства включают глицерин, маннит, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, трегалозу или сахарозу.

Носитель

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит кольцевой полирибонуклеотид и носитель. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит

5 линейный полирибонуклеотид и носитель.

В определенных вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, в везикуле или другом носителе на основе мембран. В определенных вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, в

10 везикуле или другом носителе на основе мембран.

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в клетке, везикуле или другом носителе на основе мембран, или такой кольцевой полирибонуклеотид обеспечивается с их помощью. В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид в

15 клетке, везикуле или другом носителе на основе мембран, или такой линейный полирибонуклеотид обеспечивается с их помощью. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в липосомах или других сходных везикулах. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид в липосомах или других сходных везикулах.

20 Липосомы представляют собой сферические везикулярные структуры, состоящие из одно- или многослойного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и относительно непроницаемого внешнего липофильного фосфолипидного бислоя. Липосомы могут быть анионными, нейтральными или катионными. Липосомы являются биосовместимыми, нетоксичными, могут доставлять как гидрофильные, так и

25 липофильные молекулы лекарственных средств, защищать свой "груз" от разрушения под действием ферментов плазмы крови и транспортировать свою нагрузку через биологические мембраны и гематоэнцефалический барьер (BBB) (см., например, для обзора Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10,1155/2011/469679).

30 Везикулы можно получать из нескольких различных типов липидов; однако для образования липосом в качестве носителей лекарственных средств чаще всего используются фосфолипиды. Способы получения многослойных липидных везикул известны из уровня техники (см., например, патент США № 6693086, идеи которого, относящиеся к получению многослойных липидных везикул, включены в данный документ

посредством ссылки). Хотя образование везикул может быть спонтанным при смешивании липидной пленки с водным раствором, его также можно ускорить путем применения силы в форме встряхивания с использованием гомогенизатора, соникатора или экструзионного аппарата (обзор см., например, в Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679). Экструдированные липиды можно получать посредством экструзии через фильтры с уменьшающимся размером пор, как описано в работе Templeton et al., *Nature Biotech*, 15:647-652, 1997, идеи которой, относящиеся к получению экструдированных липидов, включены в данный документ посредством ссылки.

10 В определенных вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит кольцевой полирибонуклеотид и липидные наночастицы, например состав на основе липидных наночастиц, описанный в данном документе. В определенных вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит линейный полирибонуклеотид и липидные

15 наночастицы. Липидные наночастицы представляют собой другой пример носителя, который обеспечивает биосовместимую и биоразлагаемую систему доставки для молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Липидные наночастицы представляют собой другой пример носителя, который обеспечивает биосовместимую и биоразлагаемую систему доставки для молекулы линейного полирибонуклеотида,

20 описанной в данном документе. Наноструктурированные липидные носители (NLC) представляют собой модифицированные твердые липидные наночастицы (SLN), которые сохраняют характеристики SLN, улучшают стабильность и емкость загрузки лекарственного средства и предотвращают утечку лекарственного средства. Полимерные наночастицы (PNP) являются важным компонентом для доставки лекарственных средств.

25 Эти наночастицы могут эффективно направлять доставку лекарственного средства к конкретным мишеням и улучшать стабильность лекарственного средства и контролируемое высвобождение лекарственного средства. Также можно использовать липидно-полимерные наночастицы (PLN), новый тип носителя, который является комбинацией липосом и полимеров. Эти наночастицы обладают взаимодополняющими преимуществами PNP и

30 липосом. PLN состоит из структуры сердцевина-оболочка; полимерная сердцевина обеспечивает стабильную структуру, а фосфолипидная оболочка обеспечивает хорошую биосовместимость. Таким образом, эти два компонента увеличивают показатель эффективности инкапсуляции лекарственного средства, способствуют модификации

поверхности и предотвращают утечку водорастворимых лекарственных средств. Обзор см., например, в работе Li et al. 2017, *Nanomaterials* 7, 122; doi:10.3390/nano7060122.

Дополнительные неограничивающие примеры носителей включают углеводные носители (например, ангидрид-модифицированный фитогликоген или материал типа гликогена), белковые носители (например, белок, ковалентно связанный с кольцевым полирибонуклеотидом, или белок, ковалентно связанный с линейным полирибонуклеотидом), или катионные носители (например, катионный липополимер или реагент для трансфекции). Неограничивающие примеры углеводных носителей включают фитогликоген октенилсукцинат, фитогликоген бета-декстрин, модифицированный ангидридом фитогликоген бета-декстрин. Неограничивающие примеры катионных носителей включают липофектамин, полиэтиленимин, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимин, аминокликозид-полиамин, дидезоксиамино-b-циклодекстрин, спермин, спермидин, поли(2-диметиламино)этилметакрилат, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированный желатин, дендримеры, хитозан, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан(DOTAP), хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорид 1-[2-(олеилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолия (DOTIM), трифторацетат 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорид 3β-[N-(N,N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HCl), дигептадециламидоглицилспермидин (DOGS), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромид N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE) и хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC). Неограничивающие примеры белковых носителей включают человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин.

Экзосомы также можно применять в качестве носителя или сред-носителей для доставки лекарственного средства для молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Экзосомы также можно применять в качестве носителя или сред-носителей для доставки лекарственного средства для молекулы линейного полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Обзор см. в работе Ha et al. за июль 2016 года, *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, том 6, выпуск 4, страницы 287-296; <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>.

Дифференцированные *ex vivo* эритроциты также можно применять в качестве носителя для молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Дифференцированные *ex vivo* эритроциты также можно применять в качестве носителя для молекулы линейного полирибонуклеотида, описанной в данном документе. См., например, 5 документы WO2015073587; WO2017123646; WO2017123644; WO2018102740; WO2016183482; WO2015153102; WO2018151829; WO2018009838; Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131–10136; патент США № 9644180; Huang et al. 2017. Nature Communications 8: 423; Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136.

10 Композиции на основе фузосом, например, описанные в документе WO2018208728, могут также применяться в качестве носителей для доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Композиции на основе фузосом, например, описанные в документе WO2018208728, могут также применяться в качестве носителей для доставки молекулы линейного полирибонуклеотида, описанной в данном документе.

15 Вирусомы и вирусоподобные частицы (VLP) также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе, к целевым клеткам. Вирусомы и вирусоподобные частицы (VLP) также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы линейного полирибонуклеотида, описанной в данном документе, к целевым клеткам.

20 Нановезикулы растений и пакеты-мессенджеры растений (PMP), например, описанные в международных патентных публикациях №№ WO2011097480, WO2013070324, WO2017004526 или WO2020041784, также можно применять в качестве носителей для доставки кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Нановезикулы растений и пакеты-мессенджеры растений (PMP) также можно применять в 25 качестве носителей для доставки молекулы линейного полирибонуклеотида, описанной в данном документе.

Микропузырьки также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Микропузырьки также можно применять в качестве носителей для доставки линейного 30 полирибонуклеотида, описанного в данном документе. См., например, US7115583; Beerl, R. et al., Circulation. 2002 Oct 1;106(14):1756-1759; Bez, M. et al., Nat Protoc. 2019 Apr; 14(4): 1015–1026; Hernot, S. et al., Adv Drug Deliv Rev. 2008 Jun 30; 60(10): 1153–1166; Rychak, J.J. et al., Adv Drug Deliv Rev. 2014 Jun; 72: 82-93. В некоторых вариантах осуществления

микропузырьки представляют собой покрытые альбумином перфторуглеродные микропузырьки.

Липидные наночастицы

В композициях, способах и системах доставки, представленных в настоящем изобретении, может использоваться любой подходящий носитель или способ доставки, в том числе в некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы (LNP). Липидные наночастицы в некоторых вариантах осуществления предусматривают один или несколько ионных липидов, таких как некатионные липиды (например, нейтральные, или анионные, или цвиттерионные липиды); один или несколько конъюгированных липидов (таких как липиды, конъюгированные с PEG, или липиды, конъюгированные с полимерами, описанные в таблице 5 документа WO2019217941; включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте); один или несколько стеринов (например, холестерин).

Липиды, которые можно применять для образования наночастиц (например, липидных наночастиц), включают, например, липиды, описанные в таблице 4 документа WO2019217941, который включен посредством ссылки, например, липидосодержащая наночастица может содержать один или несколько липидов из таблицы 4 документа WO2019217941. Липидные наночастицы могут включать дополнительные элементы, такие как полимеры, такие как полимеры, описанные в таблице 5 документа WO2019217941, включенного посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированные липиды в случае их присутствия могут включать одно или несколько из PEG-диацилглицерина (DAG) (такого как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG)), PEG-диалкилоксипропила (DAA), PEG-фосфолипида, PEG-церамида (Cer), пегилированного фосфатидилэтаноламина (PEG-PE), PEG-сукцинатдиацилглицерина (PEG-DAG) (такого как 4-0-(2',3'-ди(тетрадеканоиокси)пропил-1-0-(w-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG)), PEG-диалкоксипропилкарбама, натриевой соли N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина и соединений, описанных в таблице 2 документа WO2019051289 (включенного посредством ссылки), а также комбинаций вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления стерина, которые могут быть включены в липидные наночастицы, включают одно или несколько из холестерина или производных холестерина, например таких, как в документах WO2009/127060 или US2010/0130588, которые включены посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные стерин

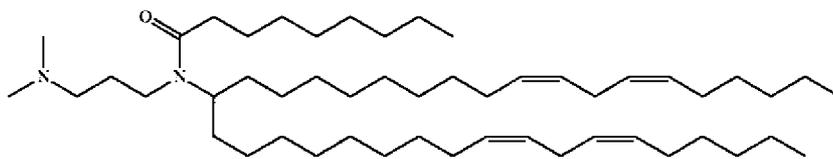
включают фитостерины, в том числе описанные в работе Eygeris et al. (2020), [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386), включенной в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит ионизируемый
5 липид, неcatiонный липид, конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию
частиц, и стерин. Количества этих компонентов могут меняться независимо и для
достижения требуемых свойств. Например, в некоторых вариантах осуществления
липидная наночастица содержит ионизируемый липид в количестве от приблизительно
10 20 мол. % до приблизительно 90 мол. % от общего количества липидов (в других вариантах
осуществления он может составлять 20-70% (мол.), 30-60% (мол.) или 40-50% (мол.); от
приблизительно 50 мол. % до приблизительно 90 мол. % от общего количества липидов,
присутствующих в липидной наночастице), неcatiонный липид в количестве от
приблизительно 5 мол. % до приблизительно 30 мол. % от общего количества липидов,
конъюгированный липид в количестве от приблизительно 0,5 мол. % до приблизительно
15 20 мол. % от общего количества липидов и стерин в количестве от приблизительно
20 мол. % до приблизительно 50 мол. % от общего количества липидов. При
необходимости отношение общего количества липидов к нуклеиновой кислоте можно
изменять. Например, отношение общего количества липидов к нуклеиновой кислоте (по
массе или весу) может составлять от приблизительно 10: 1 до приблизительно 30: 1.

В некоторых вариантах осуществления отношение липидов к нуклеиновой кислоте
20 (отношение масса/масса; отношение вес/вес) может находиться в диапазоне от
приблизительно 1: 1 до приблизительно 25: 1, от приблизительно 10: 1 до приблизительно
14: 1, от приблизительно 3: 1 до приблизительно 15: 1, от приблизительно 4: 1 до
приблизительно 10: 1, от приблизительно 5: 1 до приблизительно 9: 1 или от
25 приблизительно 6: 1 до приблизительно 9: 1. Количества липидов и нуклеиновой кислоты
можно регулировать для обеспечения требуемого отношения N/P, например отношения
N/P, составляющего 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше. В целом, общее содержание липидов в
составе на основе липидных наночастиц может находиться в диапазоне от приблизительно
5 мг/мл до приблизительно 30 мг/мл.

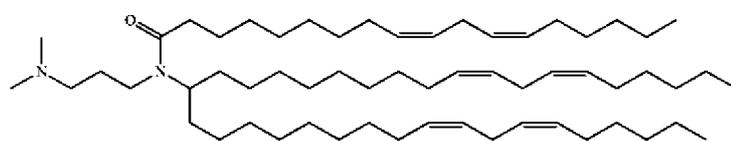
30 Некоторые неограничивающие примеры липидных соединений, которые можно
применять (например, в комбинации с другими липидными компонентами) для
образования липидных наночастиц для доставки композиций, описанных в данном
документе, например, нуклеиновой кислоты (например, РНК (например, кольцевого

полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида)), описанной в данном документе, включают



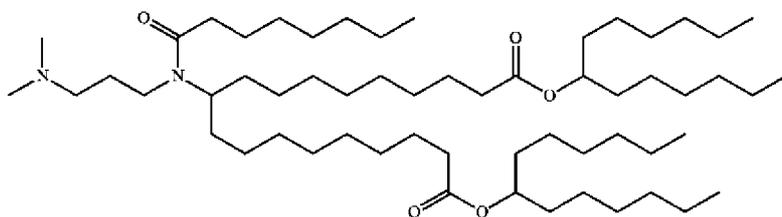
(i).

В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (i),
5 применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



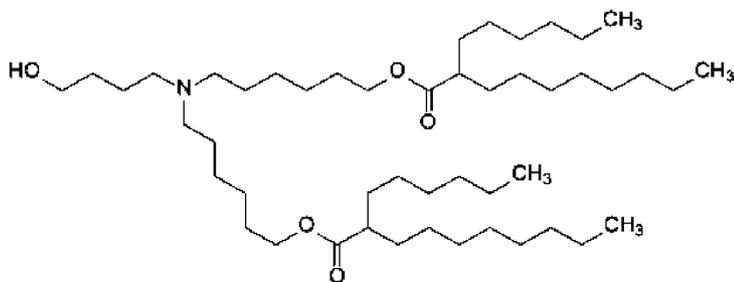
(ii)

В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (ii),
10 применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.

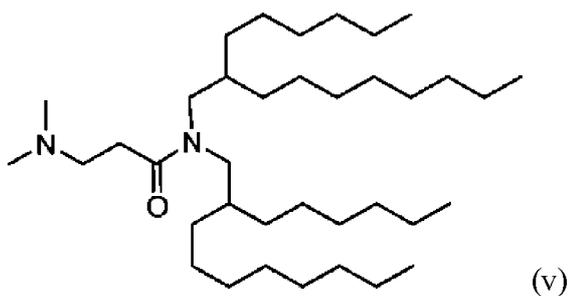


(iii)

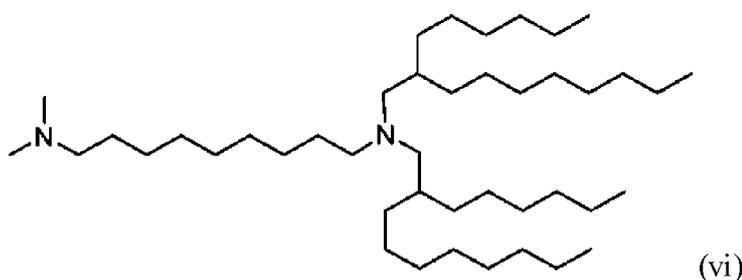
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (iii),
15 применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



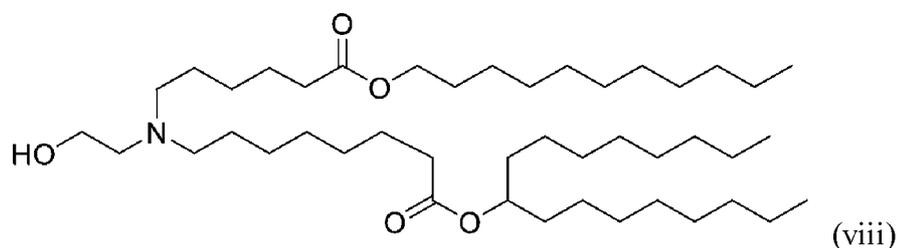
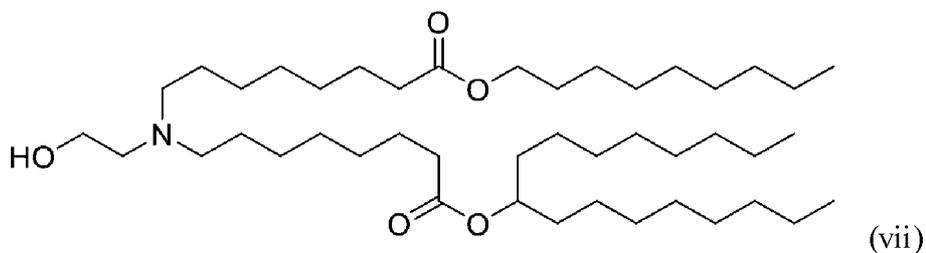
(iv)



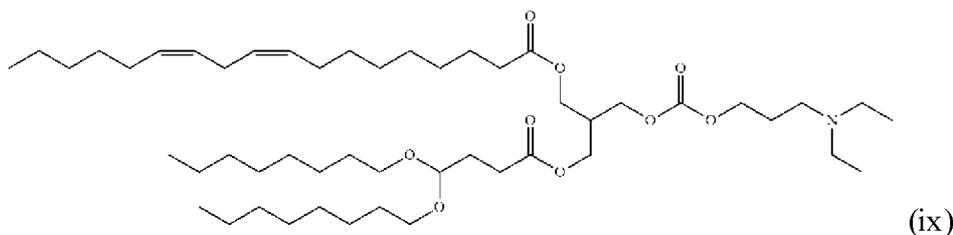
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (v), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



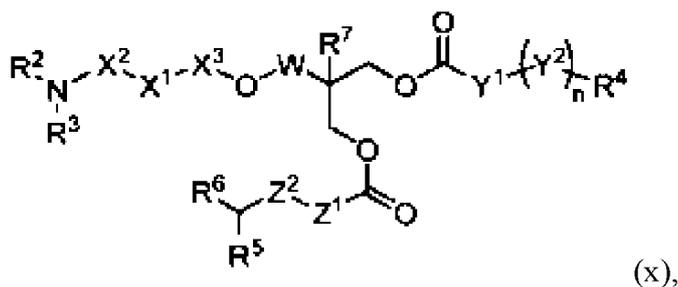
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (vi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (viii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.

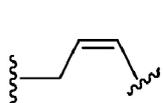


В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (ix), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.

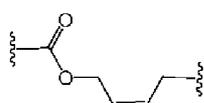


где

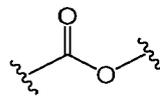
X^1 представляет собой O, NR^1 или прямую связь, X^2 представляет собой C2-5алкилен, X^3 представляет собой C(=O) или прямую связь, R^1 представляет собой H или Me, R^3 представляет собой C1-3алкил, R^2 представляет собой C1-3алкил, или R^2 , взятый вместе с атомом азота, к которому он присоединен, и 1-3 атома углерода из X^2 образуют 4-, 5- или 6-членное кольцо, или X^1 представляет собой NR^1 , R^1 и R^2 , взятые вместе с атомами азота, к которому они присоединены, образуют 5- или 6-членное кольцо, или R^2 , взятый вместе с R^3 и атомом азота, к которому они присоединены, образует 5-, 6- или 7-членное кольцо, Y^1 представляет собой C2-12алкилен, Y^2 выбран из



(в любой ориентации),

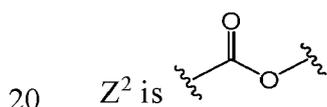


(в любой ориентации),



(в любой ориентации),

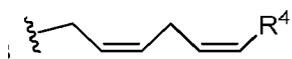
n равняется 0-3, R^4 представляет собой C1-15алкил, Z^1 представляет собой C1-алкилен или прямую связь,



(в любой ориентации) или отсутствует, при условии, что если Z^1 представляет собой прямую связь, то Z^2 отсутствует;

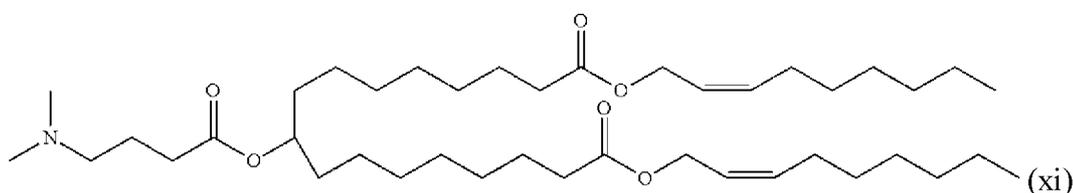
R^5 представляет собой C5-9-алкил или C6-10-алкокси, R^6 представляет собой C5-9-алкил или C6-10-алкокси, W представляет собой метилен или прямую связь, и R^7 представляет

собой H или Me или их соль, при условии, что если R^3 и R^2 представляют собой C2-алкилы, X^1 представляет собой O, X^2 представляет собой линейный C3-алкилен, X^3 представляет собой C(=O), Y^1 представляет собой линейный C₆-алкилен, $(Y^2)_n-R^4$ представляет собой

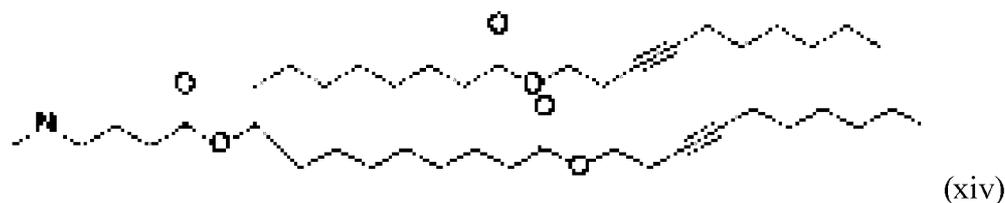
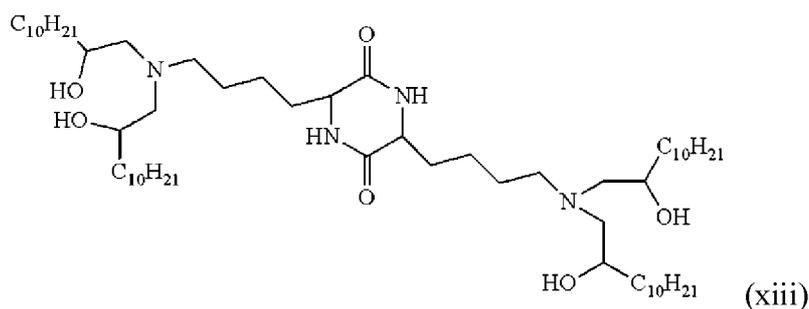
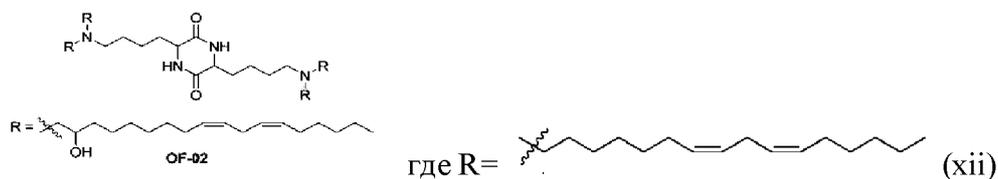


5, R^4 представляет собой линейный C5-алкил, Z^1 представляет собой C2-алкилен, Z^2 отсутствует, W представляет собой метилен, и R^7 представляет собой H, то R^5 и R^6 не представляют собой C_x-алкокси.

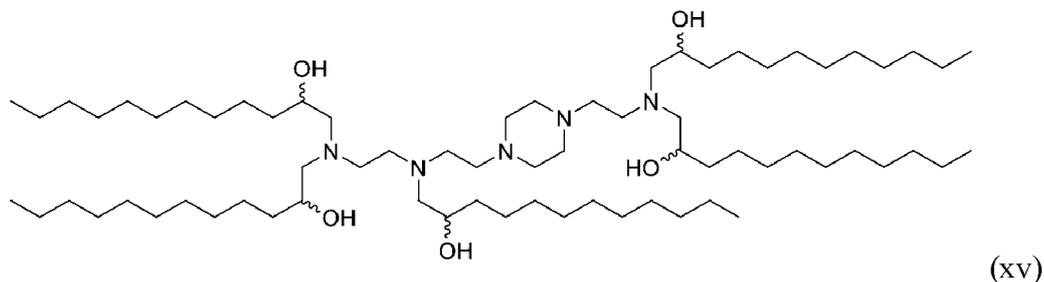
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



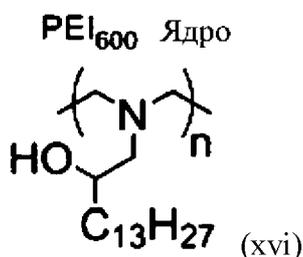
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



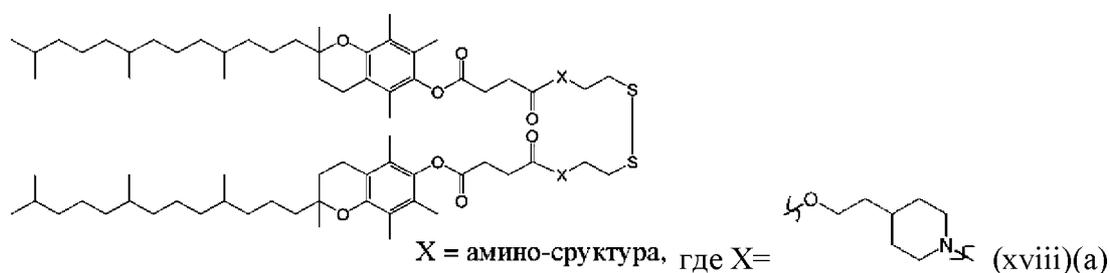
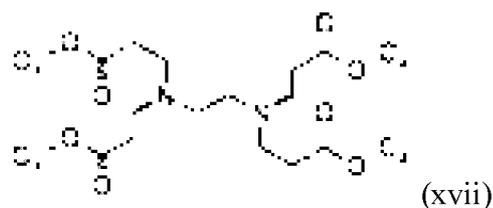
В некоторых вариантах осуществления LNP содержит соединение формулы (xiii) и соединение формулы (xiv).

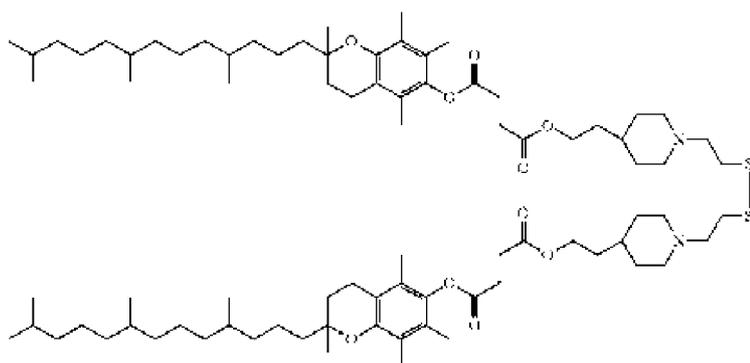


5 В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xv), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.

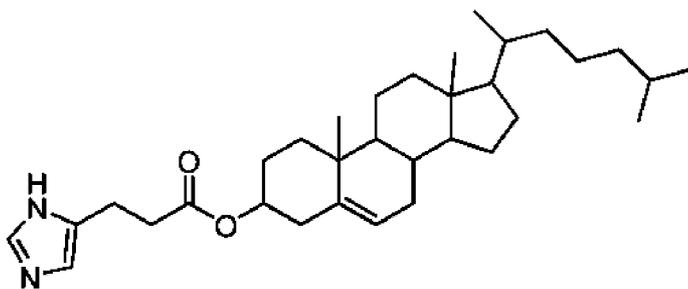


10 В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xvi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



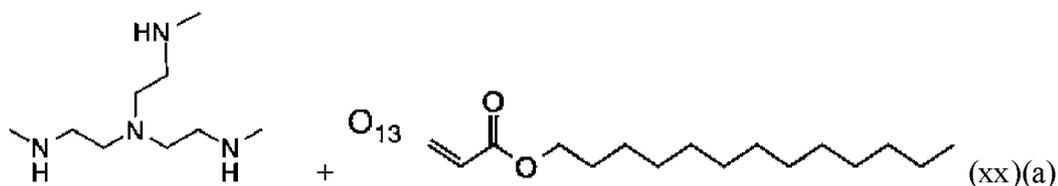


(xviii)(b)

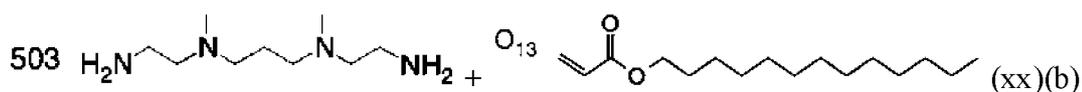


(xix)

В некоторых вариантах осуществления липидное соединение, применяемое для образования липидных наночастиц для доставки композиций, описанных в данном документе, например нуклеиновой кислоты (например, РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид)), описанной в данном документе, получают с помощью одной из следующих реакций:



(xx)(a)



(xx)(b)

В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе (например, нуклеиновую кислоту или белок), представляют в LNP, которая содержит ионизируемый липид. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой гептадекан-9-ил-8-((2-гидроксиэтил)(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил)амино)октаноат (SM-102); например, описанный в примере 1 документа US9867888 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой (9Z,12Z)-3-(((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилотдадека-9,12-диеноат (LP01), например, синтезированный в примере 13 из документа WO2015/095340 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах

осуществления ионизируемый липид представляет собой ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)-9-(((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L319), например, синтезированный в примерах 7, 8 или 9 документа US2012/0027803 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления

5 ионизируемый липид представляет собой 1,1'-((2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азандиил)бис(додекан-2-ол) (C12-200), например, синтезированный в примерах 14 и 16 документа WO2010/053572 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид

10 представляет собой липид на основе сложного эфира холестерина, содержащего имидазол (ICE) – (3S,10R,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил-3-(1H-имидазол-4-ил)пропаноат, например структуру (I) из документа WO2020/106946 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

15 В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид может быть катионным липидом, ионизируемым катионным липидом, например катионным липидом, который может существовать в положительно заряженной или нейтральной форме в зависимости от pH, или аминоксодержащим липидом, который может быть легко протонирован. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет

20 собой липид, способный быть положительно заряженным, например, в физиологических условиях. Иллюстративные катионные липиды содержат одну или несколько аминогрупп, которые несут положительный заряд. В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит катионный липид в составе с одним или несколькими нейтральными липидами, ионизируемыми аминоксодержащими липидами, биоразлагаемыми алкиновыми

25 липидами, стероидами, фосфолипидами, включающими полиненасыщенные липиды, структурными липидами (например, стеринами), PEG, холестерином и липидами, конъюгированными с полимером. В некоторых вариантах осуществления катионный липид может представлять собой ионизируемый катионный липид. Иллюстративный катионный липид, раскрытый в данном документе, может характеризоваться значением эффективной

30 pKa, составляющим более 6,0. В вариантах осуществления липидная наночастица может содержать второй катионный липид, характеризующийся другим значением эффективной pKa (например, более высоким, чем первое значение эффективной pKa) по сравнению с первым катионным липидом. Липидная наночастица может содержать от 40 до 60 молярных процентов катионного липида, нейтрального липида, стероида, липида,

конъюгированного с полимером, и терапевтического средства, например нуклеиновой кислоты (например, РНК (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида)), описанной в данном документе, инкапсулированного внутри липидной наночастицы или ассоциированного с ней. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота составлена совместно с катионным липидом. Нуклеиновая кислота может быть адсорбирована на поверхности LNP, например LNP, содержащей катионный липид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть инкапсулирована в LNP, например в LNP, содержащую катионный липид. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица может содержать нацеливающий компонент, например быть покрытой нацеливающим средством. В вариантах осуществления состав на основе LNP является биоразлагаемым. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица, содержащая один или несколько липидов, описанных в данном документе, например соединения формулы (i), (ii), (ii), (vii) и/или (ix), инкапсулирует по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или 100% молекулы РНК.

Иллюстративные ионизируемые липиды, которые можно применять в составах на основе липидных наночастиц, включают без ограничения липиды, перечисленные в таблице 1 документа WO2019051289, включенного в данный документ посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные липиды включают без ограничения соединения одной или нескольких из следующих формул: X из документа US2016/0311759; I из документа US20150376115 или из документа US2016/0376224; I, II или III из документа US20160151284; I, IA, II или IIA из документа US20170210967; I-с из документа US20150140070; A из документа US2013/0178541; I из документа US2013/0303587 или документа US2013/0123338; I из документа US2015/0141678; II, III, IV или V из документа US2015/0239926; I из документа US2017/0119904; I или II из документа WO2017/117528; A из документа US2012/0149894; A из документа US2015/0057373; A из документа WO2013/116126; A из документа US2013/0090372; A из документа US2013/0274523; A из документа US2013/0274504; A из документа US2013/0053572; A из документа WO2013/016058; A из документа WO2012/162210; I из документа US2008/042973; I, II, III или IV из документа US2012/01287670; I или II из документа US2014/0200257; I, II или III из документа US2015/0203446; I или III из документа US2015/0005363; I, IA, IB, IC, ID, II,

ПА, ПБ, ПС, ПД или III-XXIV из документа US2014/0308304; из документа US2013/0338210; I, II, III или IV из документа W02009/132131; А из документа US2012/01011478; I или XXXV из документа US2012/0027796; XIV или XVII из документа US2012/0058144; из документа US2013/0323269; I из документа US2011/0117125; I, II или III из документа US2011/0256175; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII из документа US2012/0202871; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV или XVI из документа US2011/0076335; I или II из документа US2006/008378; I из документа US2013/0123338; I или X-A-Y-Z из документа US2015/0064242; XVI, XVII или XVIII из документа US2013/0022649; I, II или III из документа US2013/0116307; I, II или III из документа US2013/0116307; I или II из документа US2010/0062967; I-X из документа US2013/0189351; I из документа US2014/0039032; V из документа US2018/0028664; I из документа US2016/0317458; I из документа US2013/0195920; 5, 6 или 10 из документа US10221127; III-3 из документа WO2018/081480; I-5 или I-8 из документа WO2020/081938; 18 или 25 из документа US9867888; А из документа US2019/0136231; II из документа WO2020/219876; 1 из документа US2012/0027803; OF-02 из документа US2019/0240349; 23 из документа US10086013; сКК-E12/A6 из работы Miao et al. (2020); C12-200 из документа WO2010/053572; 7C1 из работы Dahlman et al. (2017); 304-O13 или 503-O13 из работы Whitehead et al.; TS-P4C2 из документа US9708628; I из документа WO2020/106946; I из документа WO2020/106946.

В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой MC3 (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (DLin-MC3-DMA или MC3), например, описанный в примере 9 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой липид ATX-002, например, описанный в примере 10 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой (13Z,16Z)-А,А-диметил-3-нонилдокоза-13-16-диен-1-амин (соединение 32), например, описанное в примере 11 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение 6 или соединение 22, например, описанные в примере 12 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Иллюстративные некатيونные липиды включают без ограничения дистеароил-sn-глицерофосфоэтаноламин, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG),
5 диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-Mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), монометилфосфатидилэтаноламин (такой как
10 16-О-монометил-PE), диметилфосфатидилэтаноламин (такой как 16-О-диметил-PE), 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE), гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC), яичный фосфатидилхолин (EPC), диолеоилфосфатидилсерин (DOPS), сфингомиелин (SM), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG), диэрукоилфосфатидилхолин (DEPC), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG), диэлаидоилфосфатидилэтаноламин (DEPE), лецитин, фосфатидилэтаноламин, лизолецитин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидинозитол, сфингомиелин, яичный сфингомиелин (ESM), цефалин, кардиолипин, фосфатидную кислоту, цереброзиды, дицетилфосфат, лизофосфатидилхолин,
20 дилинолеоилфосфатидилхолин или их смеси. Понятно, что можно также применять другие диацилфосфатидилхолиновые и диацилфосфатидилэтаноламиновые фосфолипиды. Ацильные группы в данных липидах предпочтительно представляют собой ацильные группы, полученные из жирных кислот, имеющих C10-C24-углеродные цепи, например лауроила, миристоила, пальмитоила, стеароила или олеоила. Дополнительные
25 иллюстративные липиды в определенных вариантах осуществления включают без ограничения липиды, описанные в работе Kim et al. (2020) [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386), включенной в данный документ посредством ссылки. Такие липиды включают в некоторых вариантах осуществления липиды растений, которые, как было обнаружено, обеспечивают улучшение трансфекции с использованием
30 мРНК в печени (например, DGTS).

Другие примеры некатюнных липидов, пригодных для применения в липидных наночастицах, включают без ограничения липиды, не содержащие фосфор, такие как, например, стеариламин, додециламин, гексадециламин, ацетилпальмитат, глицеринрицинолеат, гексадецилстеарат, изопропилмириститат, амфотерные акриловые

полимеры, лаурилсульфат триэтаноламина, алкиларилсульфат, полиэтилоксилированные амиды жирных кислот, бромид диоктадецилдиметиламмония, керамид, сфингомиелин и т. п. Другие некатيونные липиды описаны в документе WO2017/099823 или в публикации заявки на патент США US2018/0028664, содержание которых включено в данный документ

5 посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления некатионный липид представляет собой олеиновую кислоту или соединение формулы I, II или IV из документа US2018/0028664, включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Некатионный липид может составлять, например, 0-30% (мол.) от общего количества липидов,

10 присутствующих в липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления содержание некатионных липидов составляет 5-20% (мол.) или 10-15% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. В вариантах осуществления молярное отношение ионизируемых липидов к нейтральным липидам находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 8:1 (например, составляет

15 приблизительно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 или 8:1).

В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы не содержат каких-либо фосфолипидов.

В некоторых аспектах липидная наночастица может дополнительно содержать компонент, такой как стерин, для обеспечения целостности мембраны. Одним

20 иллюстративным стеринном, который можно применять в липидной наночастице, является холестерин и его производные. Неограничивающие примеры производных холестерина включают полярные аналоги, такие как 5 α -холестанол, 5 β -копростанол, холестерил-(2'-гидрокси)-этиловый эфир, холестерил-(4'-гидрокси)-бутиловый эфир и 6-кетохолестанол; неполярные аналоги, такие как 5 α -холестан, холестенон, 5 α -холестанон, 5 β -холестанон и

25 холестерилдеcanoат и их смеси. В некоторых вариантах осуществления производное холестерина представляет собой полярный аналог, например холестерил-(4'-гидрокси)бутиловый эфир. Иллюстративные производные холестерина описаны в публикации согласно PCT WO2009/127060 и публикации заявки на патент США US2010/0130588, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во

30 всей своей полноте.

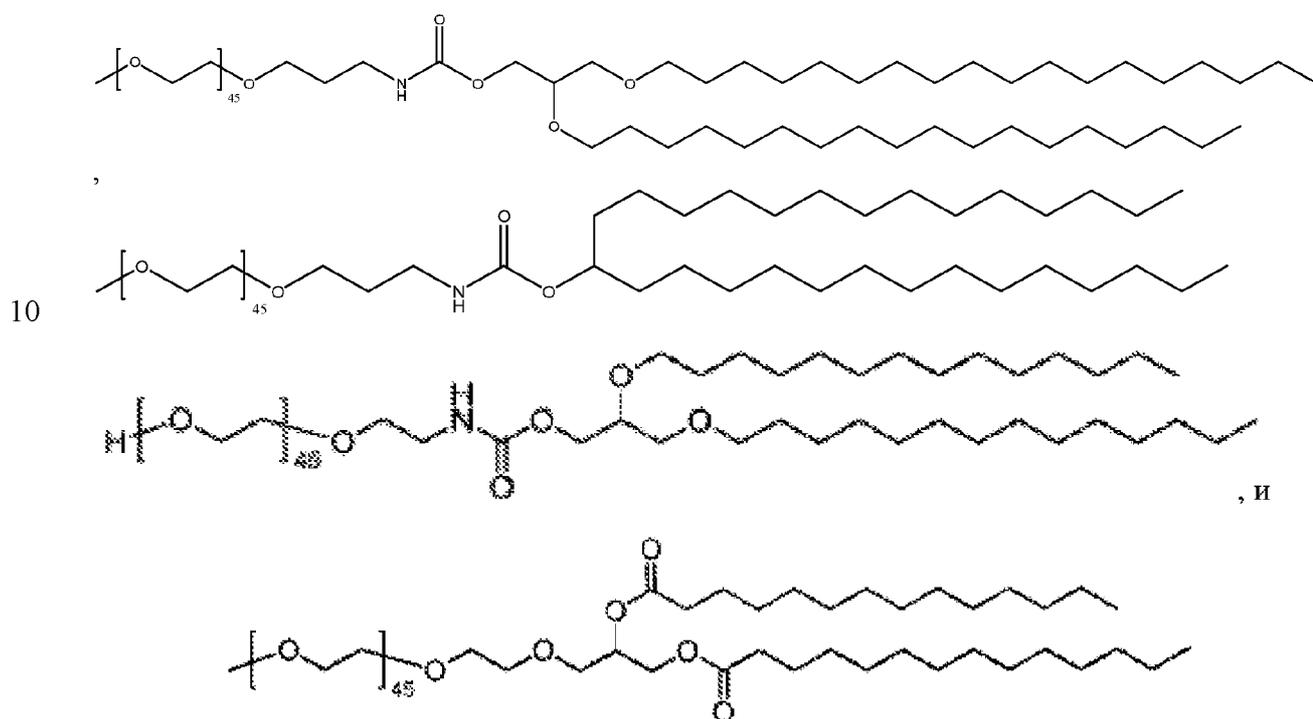
В некоторых вариантах осуществления компонент, обеспечивающий целостность мембраны, такой как стерин, может составлять 0-50% (мол.) (например, 0-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40% или 40-50%) от общего количества липидов, присутствующих в липидной

наночастице. В некоторых вариантах осуществления такой компонент составляет 20-50% (мол.) или 30-40% (мол.) от общего количества липидов в липидной наночастице.

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица может содержать полиэтиленгликоль (PEG) или конъюгированную молекулу липида. Обычно они
5 применяются для ингибирования агрегации липидных наночастиц и/или обеспечения стерической стабилизации. Иллюстративные конъюгированные липиды включают без ограничения конъюгаты PEG-липид, конъюгаты полиоксазолин (POZ)-липид, конъюгаты полиамид-липид (такие как конъюгаты АТТА-липид), конъюгаты катионный полимер-липид (CPL) и их смеси. В некоторых вариантах осуществления молекула
10 конъюгированного липида представляет собой конъюгат PEG-липид, например, липид, конъюгированный с (метоксиполиэтиленгликолем).

Иллюстративные конъюгаты PEG-липид включают без ограничения PEG-диацилглицерин (DAG) (такой как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG)), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид,
15 PEG-церамид (Cer), пегилированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), PEG-сукцинатдиацилглицерин (PEG-DAG) (например, 4-0-(2',3'-ди(тетрадеканоиокси)пропил-1-0-(ω-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG)), PEG-диалкоксипропилкарбам, натриевую соль N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль 2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина или их смесь. Дополнительные
20 иллюстративные конъюгаты PEG-липид описаны, например, в документах US5885613, US6287591, US2003/0077829, US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2010/0130588, US2016/0376224, US2017/0119904 и US/099823, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В
25 некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы III, III-a-1, III-a-2, III-b-1, III-b-2 или V из документа US2018/0028664, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы II из документов US20150376115 или US2016/0376224, содержание которых включено в данный
30 документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил, PEG-димиристилоксипропил, PEG-дипальмитилоксипропил или PEG-дистеарилоксипропил. PEG-липид может представлять собой один или несколько из PEG-DMG, PEG-дилаурилглицерина, PEG-дипальмитоилглицерина, PEG-

дистерилглицерина, PEG-дилаурилгликамида, PEG-димиристилгликамида, PEG-дипальмитоилгликамида, PEG-дистерилгликамида, PEG-холестерин-(1-[8'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диоксоктанил]карбамоил-[омега]-метилполи(этиленгликоля), PEG-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполи(этиленгликолевого) эфира) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоля)-2000]. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид предусматривает PEG-DMG, 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид предусматривает структуру, выбранную из следующего:



В некоторых вариантах осуществления вместо PEG-липида также можно использовать липиды, конъюгированные с молекулой, отличной от PEG. Например, вместо PEG-липида или в дополнение к нему можно использовать конъюгаты полиоксазолин (POZ)-липид, конъюгаты полиамид-липид (такие как конъюгаты АТТА-липид) и конъюгаты катионный полимер-липид (GPL).

Иллюстративные конъюгированные липиды, т.е. конъюгаты PEG-липид, конъюгаты (POZ)-липид, конъюгаты АТТА-липид и катионный полимер-липид, описаны в патентных заявках согласно PCT и LIS, указанных в таблице 2 документа WO2019051289A9, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления PEG или конъюгированный липид могут составлять 0-20% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной

наночастице. В некоторых вариантах осуществления содержание PEG или конъюгированного липида составляет 0,5-10% или 2-5% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. Молярные отношения ионизируемого липида, некатионного липида, стерина и PEG-конъюгированного липида можно изменять по мере необходимости. Например, липидная частица может содержать 30-70% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 0-60% холестерина по молям или от общего веса композиции, 0-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции и 1-10% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции. Предпочтительно композиция содержит 30-40% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 40-50% холестерина по молям или от общего веса композиции и 10-20% некатионного липида по молям или от общего веса композиции. В некоторых других вариантах осуществления композиция содержит 50-75% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 20-40% холестерина по молям или от общего веса композиции, 5-10% некатионного липида по молям или от общего веса композиции и 1-10% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции. Композиция может содержать 60-70% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 25-35% холестерина по молям или от общего веса композиции и 5-10% некатионного липида по молям или от общего веса композиции. Композиция может также содержать до 90% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции и 2-15% некатионного липида по молям или от общего веса композиции. Состав также может представлять собой состав на основе липидных наночастиц, например, содержащий 8-30% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 5-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции и 0-20% холестерина по молям или от общего веса композиции; 4-25% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 4-25% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, 2-25% холестерина по молям или от общего веса композиции, 10-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 5% холестерина по молям или от общего веса композиции; или 2-30% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 2-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, 1-15% холестерина по молям или от общего веса композиции, 2-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 1-20% холестерина по молям или от общего веса композиции; или даже до 90% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции и 2-10% некатионных липидов по молям или от общего веса композиции, или даже 100% катионного липида по молям или от общего веса композиции. В некоторых вариантах осуществления

состав на основе липидных частиц содержит ионизируемый липид, фосфолипид, холестерин и пегилированный липид при молярном отношении 50: 10:38,5: 1,5. В некоторых других вариантах осуществления состав на основе липидных частиц содержит ионизируемый липид, холестерин и пегилированный липид при молярном отношении

5 60:38,5: 1,5.

В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит ионизируемый липид, некатионный липид (например, фосфолипид), стерин (например, холестерин) и пегилированный липид, где молярное соотношение липидов находится в диапазоне от 20 до 70 молярных процентов для ионизируемого липида при целевом значении 40-60, молярный процент для некатионного липида находится в диапазоне от 0 до 30 при целевом значении от 0 до 15, молярный процент стерина находится в диапазоне от 20 до 70 при целевом значении от 30 до 50, и молярный процент пегилированного липида находится в диапазоне от 1 до 6 при целевом значении от 2 до 5.

10

В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит ионизируемый липид/некатионный липид/стерин/конъюгированный липид при молярном отношении 50: 10:38,5: 1,5.

15

В одном аспекте в настоящем изобретении представлен состав на основе липидных наночастиц, содержащий фосфолипиды, лецитин, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин.

В некоторых вариантах осуществления также могут быть включены одно или несколько дополнительных соединений. Данные соединения можно вводить отдельно, или дополнительные соединения могут быть включены в липидные наночастицы по настоящему изобретению. Другими словами, липидные наночастицы могут содержать другие соединения в дополнение к нуклеиновой кислоте или по меньшей мере вторую нуклеиновую кислоту, отличающуюся от первой. Другие дополнительные соединения могут без ограничений быть выбраны из группы, состоящей из малых или больших органических или неорганических молекул, моносахаридов, дисахаридов, трисахаридов, олигосахаридов, полисахаридов, пептидов, белков, аналогов пептидов и их производных, пептидомиметиков, нуклеиновых кислот, аналогов нуклеиновых кислот и производных, экстрактов, полученных из биологических материалов, или любых их комбинаций.

20

25

30

В некоторых вариантах осуществления LNP содержат биоразлагаемые ионизируемые липиды. В некоторых вариантах осуществления LNP содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилотдадека-9,12-диеноат, также

называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат, или другой ионизируемый липид. См., например, липиды в документах WO2019/067992, WO/2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086, а также представленные в них 5 ссылки. В некоторых вариантах осуществления термины "катионный" и "ионизируемый" применительно к липидам LNP являются взаимозаменяемыми, например, где ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от значения pH.

В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от нескольких 10 до нескольких 100 нм, например, как измерено с 10 помощью динамического светорассеяния (DLS). В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 40 нм до приблизительно 150 нм, например приблизительно 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм. В некоторых вариантах осуществления 15 средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 50 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 70 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 60 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 60 нм до 20 приблизительно 90 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 70 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 80 до приблизительно 100 нм, от приблизительно 80 до приблизительно 90 нм или от приблизительно 90 нм до 25 приблизительно 100 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм. В конкретном варианте осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять приблизительно 80 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять приблизительно 100 нм. 30 В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP находится в диапазоне от приблизительно 1 мм до приблизительно 500 мм, от приблизительно 5 мм до приблизительно 200 мм, от приблизительно 10 мм до приблизительно 100 мм, от приблизительно 20 мм до приблизительно 80 мм, от приблизительно 25 мм до приблизительно 60 мм, от приблизительно 30 мм до

приблизительно 55 мм, от приблизительно 35 мм до приблизительно 50 мм или от приблизительно 38 мм до приблизительно 42 мм.

В некоторых случаях LNP может быть относительно однородной. Индекс полидисперсности может применяться для указания однородности LNP, например, распределения липидных наночастиц по размерам. Небольшой (например, менее 0,3) индекс полидисперсности обычно указывает на узкое распределение частиц по размерам. LNP может характеризоваться индексом полидисперсности, составляющим от приблизительно 0 до приблизительно 0,25, таким как 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, или 0,25. В некоторых вариантах осуществления индекс полидисперсности LNP может составлять от приблизительно 0,10 до приблизительно 0,20.

Дзета-потенциал LNP можно использовать для обозначения электрокинетического потенциала композиции. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал может описывать поверхностный заряд LNP. Обычно требуются липидные наночастицы с относительно низким зарядом, положительным или отрицательным, поскольку более сильно заряженные соединения могут взаимодействовать с клетками, тканями и другими элементами в организме нежелательным образом. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал LNP может составлять от приблизительно -10 мВ до приблизительно +20 мВ, от приблизительно -10 мВ до приблизительно +15 мВ, от приблизительно -10 мВ до приблизительно +10 мВ, от приблизительно -10 мВ до приблизительно +5 мВ, от приблизительно -10 мВ до приблизительно 0 мВ, от приблизительно -10 мВ до приблизительно -5 мВ, от приблизительно -5 мВ до приблизительно +20 мВ, от приблизительно -5 мВ до приблизительно +15 мВ, от приблизительно -5 мВ до приблизительно +10 мВ, от приблизительно -5 мВ до приблизительно +5 мВ, от приблизительно -5 мВ до приблизительно 0 мВ, от приблизительно 0 мВ до приблизительно +20 мВ, от приблизительно 0 мВ до приблизительно +15 мВ, от приблизительно 0 мВ до приблизительно +10 мВ, от приблизительно 0 мВ до приблизительно +5 мВ, от приблизительно +5 мВ до приблизительно +20 мВ, от приблизительно +5 мВ до приблизительно +15 мВ или от приблизительно +5 мВ до приблизительно +10 мВ.

Эффективность инкапсуляции белка и/или нуклеиновой кислоты описывает количество белка и/или нуклеиновой кислоты, которое инкапсулировано или иным образом ассоциировано с LNP после получения, относительно предоставленного исходного количества. Требуется, чтобы эффективность инкапсуляции была высокой (например,

близкой к 100%). Эффективность инкапсуляции можно измерить, например, путем сравнения количества белка или нуклеиновой кислоты в растворе, содержащем липидную наночастицу, до и после разрушения липидной наночастицы с помощью одного или нескольких органических растворителей или детергентов. Анионообменную смолу можно
5 применять для измерения количества свободного белка или нуклеиновой кислоты (например, РНК) в растворе. Флуоресценцию можно применять для измерения количества свободного белка и/или нуклеиновой кислоты (например, РНК) в растворе. Для липидных наночастиц, описанных в данном документе, эффективность инкапсуляции белка и/или нуклеиновой кислоты может составлять по меньшей мере 50%, например 50%, 55%, 60%,
10 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 90%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 95%.

15 LNP может необязательно содержать одно или несколько покрытий. В некоторых вариантах осуществления LNP может быть составлена в виде капсулы, пленки или таблетки с покрытием. Капсула, пленка или таблетка, содержащие композицию, описанную в данном документе, могут иметь любой пригодный размер, прочность на растяжение, твердость или плотность.

20 Дополнительные иллюстративные липиды, составы, способы и определение характеристик LNP описаны в документе WO2020061457, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления липофекцию клеток *in vitro* или *ex vivo* осуществляют с использованием Lipofectamine MessengerMax (Thermo Fisher) или реагента
25 для трансфекции TransIT-мРНК (Mirus Bio). В определенных вариантах осуществления LNP составляют с использованием смеси ионизируемых липидов GenVoy_ILM (Precision NanoSystems). В некоторых вариантах осуществления LNP составлены с использованием 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA) или дилинолеилметил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA или MC3), состав и
30 применение которых *in vivo* описаны в работе Jayaraman et al. Angew Chem Int Ed Engl 51(34):8529-8533 (2012), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Составы на основе LNP, оптимизированные для доставки систем CRISPR-Cas, например, RNP Cas9-gRNA, gRNA, мРНК Cas9, описаны в документах WO2019067992 и

WO2019067910, оба из которых включены посредством ссылки, и являются применимыми для доставки кольцевых полирибонуклеотидов и линейных полирибонуклеотидов, описанных в данном документе.

5 Дополнительные конкретные составы на основе LNP, пригодные для доставки нуклеиновых кислот (например, кольцевых полирибонуклеотидов, линейных полирибонуклеотидов), описаны в документах US8158601 и US8168775, оба из которых включены посредством ссылки, и они включают составы, применяемые в патисиране, продаваемом под названием ONPATTRO.

10 Иллюстративная дозировка LNP на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида) может предусматривать приблизительно 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 или 100 мг/кг (РНК). Иллюстративная дозировка AAV, содержащего полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может предусматривать MOI, составляющую приблизительно 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , и 10^{14} vg/кг.

Адьювант

15 Адьювант обеспечивает усиление видов иммунного ответа (гуморального и/или клеточного), вызываемых у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта), который получает адьювант и/или иммуногенную композицию, содержащую адьювант. В некоторых вариантах осуществления адьювант вводят субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) для получения поликлональных антител из кольцевого полирибонуклеотида, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления адьювант вводят субъекту для получения поликлональных антител из линейного полирибонуклеотида, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления адьювант применяют в способах, описанных в данном документе, для получения поликлональных антител, описанных в данном документе. В конкретном варианте осуществления адьювант применяют для содействия выработке у субъекта поликлональных антител к антигену и/или эпитопу коронавируса, экспрессируемых из кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления адьювант и кольцевой полирибонуклеотид вводят совместно в отдельных композициях. В некоторых вариантах осуществления адьювант смешивают или составляют с кольцевым полирибонуклеотидом в виде одной композиции с получением иммуногенной композиции, которую вводят субъекту. В конкретном варианте осуществления адьювант применяют для содействия выработке у субъекта поликлональных антител к антигену и/или эпитопу коронавируса, экспрессируемых из линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления адьювант и линейный полирибонуклеотид вводят совместно в

20

25

30

отдельных композициях. В некоторых вариантах осуществления адъювант смешивают или составляют с линейным полирибонуклеотидом в виде одной композиции с получением иммуногенной композиции, которую вводят субъекту.

Адъюванты могут представлять собой адъювант ТН1 и/или адъювант ТН2.

5 Предпочтительные адъюванты включают без ограничения одно или несколько из следующего.

Минералосодержащие композиции. Минералосодержащие композиции, подходящие для применения в качестве адъювантов в настоящем изобретении, включают минеральные соли, такие как соли алюминия и соли кальция. Настоящее изобретение
10 предусматривает минеральные соли, такие как гидроксиды (например, оксигидроксиды), фосфаты (например, гидроксифосфаты, ортофосфаты), сульфаты и т. д., или смеси разных минеральных соединений, при этом соединения принимают любую подходящую форму (например, геля, кристаллическую, аморфную и т. д.). Соли кальция включают фосфат кальция (например, "САР"). Соли алюминия включают гидроксиды, фосфаты, сульфаты и
15 т. п.

Композиции на основе масляных эмульсий. Композиции на основе масляных эмульсий, подходящие для применения в качестве адъювантов в настоящем изобретении, включают эмульсии сквален-вода, такие как MF59 (5% сквален, 0,5% Tween 80 и 0,5% Span, составленные в субмикронные частицы с применением микрофлюидайзера), AS03 (α -
20 токоферол, сквален и полисорбат 80 в эмульсии типа масло-в-воде), составы на основе Montanide (например, Montanide ISA 51, Montanide ISA 720), неполный адъювант Фрейнда (IFA), полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (IFA).

Малые молекулы. Малые молекулы, подходящие для применения в качестве адъювантов в настоящем изобретении, включают имиквимод или 847, резиквимод или R848
25 или гардиквимод.

Полимерные наночастицы. Полимерные наночастицы, подходящие для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включают поли(а-гидроксикислоты), полигидроксимасляные кислоты, полилактоны (включая поликапролактоны), полидиоксаноны, поливалеролактон, сложные полиортоэфирсы, полиангидриды,
30 полицианоакрилаты, поликарбонаты, полученные из тирозина, поливинилпирролидоны или сложные полиэфиры амидов и их комбинации.

Сапонин (т. е. гликозид, полициклические агликоны, присоединенные к одной или нескольким сахарным боковым цепям). Составы на основе сапонина, подходящие для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включают очищенные

составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOM и матрица ISCOM. QS21 представлен на рынке как STIMULON (TM). Составы на основе сапонины могут также предусматривать стерин, такой как холестерин. Комбинации сапонинов и холестерин могут применяться для образования уникальных частиц, называемых

5 иммуностимулирующими комплексами (ISCOM). ISCOM, как правило, также содержат фосфолипид, такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. Любой известный сапонин можно применять в ISCOM. Предпочтительно ISCOM предусматривает один или несколько из QuilA, QHA и QHC. Необязательно ISCOM могут быть лишены дополнительного детергента.

10 Липополисахариды. Адъюванты, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают нетоксичные производные энтеробактериального липополисахарида (LPS). Такие производные включают монофосфорил-липид А (MPLA), глюкопиранозил-липид А (GLA) и 3-О-деацелированный MPL (3dMPL). 3dMPL представляет собой смесь 3-О-деацелированного монофосфорил-липид А с 4, 5 или 6

15 ацилированными цепями. Другие нетоксичные производные LPS включают миметики монофосфорил-липид А, такие как производные аминокилглюкозаминидфосфата, например RC-529.

Липосомы. Липосомы, подходящие для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включают вирусомы и CAF01.

20 Липидные наночастицы. Адъюванты, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают липидные наночастицы (LNP) и их компоненты.

Липопептиды (т. е. соединения, содержащие один или несколько остатков жирных кислот и два или больше аминокислотных остатков). Липопептид, подходящий для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включает Pam2 (Pam2CSK4)

25 и Pam3 (Pam3CSK4).

Гликолипиды. Гликолипиды, подходящие для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включают фактор жгутообразования (димиколят трегалозы).

Пептиды и пептидогликаны (синтетические или очищенные), полученные из грамотрицательных или грамположительных бактерий, такие как MDP (N-ацетилмурамил-

30 L-аланил-D-изоглутамин), подходят для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении.

Углеводы (содержащие углеводов) или полисахариды, подходящие для применения в качестве адъюванта, включают декстран (например, разветвленный микробный полисахарид), декстрансульфат, лентинан, зимозан, бета-глюкан, делтин, маннан и хитин.

Адьюванты на основе РНК. Адьюванты на основе РНК, подходящие для применения в настоящем изобретении, представляют собой поли(IC), поли(IC:LC), шпилечные РНК с 5'-трифосфатом или без него, вирусные последовательности, поли(U)-содержащую последовательность, природные или синтетические РНК-последовательности dsRNA и аналоги нуклеиновой кислоты (например, циклический GMP-AMP или другие циклические динуклеотиды, например циклический ди-GMP, иммуностимулирующие аналоги оснований, например C8-замещенные и N7,C8-дизамещенные по гуанину рибонуклеотиды).

Адьюванты на основе ДНК. Адьюванты на основе ДНК, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают CpG, dsDNA и природные или синтетические иммуностимулирующие последовательности ДНК.

Белки или пептиды. Белки и пептиды, подходящие для применения в качестве адьюванта в настоящем изобретении, включают слитые белки, содержащие флагеллин, MBL (лектин, связывающий маннозу), цитокины и хемокины.

Вирусные частицы. Вирусные частицы, подходящие для применения в качестве адьюванта, включают виросомы (фосфолипидный бислой клеточной мембраны).

Адьювант для применения в настоящем изобретении, может быть получено из бактерий, например, флагеллин, LPS или бактериальный токсин (например, энтеротоксины (белок), например, термолабильный токсин или холерный токсин). Адьювант для применения в настоящем изобретении может представлять собой гибридную молекулу, такую как CpG, конъюгированный с имиквимодом. Адьювант для применения в настоящем изобретении может представлять собой MAMP грибов или оомицетов, такие как хитин или бета-глюкан. В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет собой неорганическую наночастицу, такую как золотые наностержни или наночастицы на основе диоксида кремния (например, наночастицы на основе мезопористого диоксида кремния (MSN)). В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет собой многокомпонентный адьювант или систему на основе адьюванта, такие как AS01, AS03, AS04 (MLP5 + алюминиевые квасцы), CFA (полный адьювант Фрейнда: IFA + пептидогликан + димиколят трегалозы), CAF01 (двухкомпонентная система, состоящая из среды-носителя на основе катионной липосомы (диметилдиоктадециламмония (DDA)), стабилизированной с помощью гликолипидного иммуномодулятора (6,6-дибегената трегалозы (TDB), который может представлять собой синтетический вариант фактора жгутообразования, расположенного в клеточной стенке микобактерий).

Цитокины. Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую цитокин, такой как провоспалительный цитокин (например, GM-CSF, IL-1-альфа, IL-1-бета, TGF-бета, TNF-альфа, TNF-бета), индуцирующие Th-1 цитокины (например, IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18) или индуцирующие Th-2 цитокины (например, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13).

Хемокины. Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую хемокин, такой как MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes или TCA-3.

Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую костимулирующую молекулу, такую как CD80, CD86, CD40-L, CD70 или CD27.

Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую индикаторную молекулу врожденной иммунной системы (ее часть, полноразмерную или мутантную) или конститутивно активную (са) индикаторную молекулу врожденной иммунной системы, такую как саTLR4, саSTING, саTLR3, саTLR3, саTLR9, саTLR7, саTLR8, саTLR7, саRIG-I/DDX58 или саMDA-5/IFIH1.

Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую адаптерную или сигнальную молекулу, такую как STING, TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, ИКК-альфа, комплекс ИКК, TBK1, бета-катенин и каспаза 1.

Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую активатор транскрипции, такой как активатор транскрипции, который обладает способностью усиливать иммунный ответ (например, AP1, NF-каппа В, IRF3, IRF7, IRF1 или IRF5). Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую цитокиновый рецептор, такой как IL-2-бета, IFN-гамма или IL-6.

Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую бактериальный компонент, такой как флагеллин или MBL.

Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую любой компонент врожденной иммунной системы.

В конкретном варианте осуществления адъювант, применяемый в настоящем изобретении, представляет собой состав на основе запатентованного адъюванта компании SAB, SAB-adj-1 или SAB-adj-2.

Вакцина

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) также вводят второе средство, например, субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) также вводят вторую
5 вакцину. В некоторых вариантах осуществления композиция, которую вводят субъекту, содержит кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и вторую вакцину. В некоторых вариантах осуществления вакцину и кольцевой полирибонуклеотид вводят совместно в отдельных композициях. Вакцину вводят одновременно с иммунизацией с помощью кольцевого полирибонуклеотида, вводят до иммунизации с
10 помощью кольцевого полирибонуклеотида или после иммунизации с помощью кольцевого полирибонуклеотида.

Например, в некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) иммунизируют с помощью вакцины против коронавируса, не содержащей кольцевой полирибонуклеотид (например, субъединичной белковой вакцины),
15 и иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют с помощью не содержащей полирибонуклеотида вакцины против первого микроорганизма (например, пневмококка) и иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе. Вакцина может представлять собой любую вакцину против
20 бактериальной инфекции или вакцину против вирусной инфекции. В конкретном варианте осуществления вакцина представляет собой пневмококковую полисахаридную вакцину, такую как PCV13 или PPSV23. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против RSV (например, паливизумаб).

В некоторых вариантах осуществления композиция, которую вводят субъекту, содержит линейный полирибонуклеотид и вакцину. В некоторых вариантах осуществления вакцину и линейный полирибонуклеотид вводят совместно в отдельных композициях. Вакцину вводят одновременно с иммунизацией с помощью линейного полирибонуклеотида, вводят до иммунизации с помощью линейного полирибонуклеотида
30 или после иммунизации с помощью линейного полирибонуклеотида.

Например, в некоторых вариантах осуществления субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта) иммунизируют с помощью вакцины против коронавируса, не содержащей полирибонуклеотида (например, не содержащей линейный полирибонуклеотид) (например, субъединичной белковой вакцины), и иммуногенной

композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе, содержащий последовательность кодирующую антиген коронавируса. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют с помощью не содержащей полирибонуклеотида вакцины против первого микроорганизма (например, пневмококка) и

5 иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе, содержащий последовательность, кодирующую антиген коронавируса. Вакцина может представлять собой любую вакцину против бактериальной инфекции или вакцину против вирусной инфекции. В конкретном варианте осуществления вакцина представляет собой пневмококковую полисахаридную вакцину, такую как PCV13 или

10 PPSV23. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против RSV (например, паливизумаб).

Подлежащий иммунизации субъект

В настоящем изобретении представлено введение субъекту (например,

15 подлежащему иммунизации субъекту) иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп коронавируса, или иммунизацию субъекта иммуногенной композицией. В настоящем изобретении представлено введение субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид,

20 содержащий последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп коронавируса, или иммунизацию субъекта иммуногенной композицией. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект) представляет собой животное. В конкретном варианте осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект) представляет собой млекопитающее. В определенных вариантах

25 осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект) представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект) представляет собой животное, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризуется наличием гуманизированной иммунной системы. Плазма крови или кровь субъекта применяются для

30 обеспечения образования гипериммунной плазмы крови, например плазмы крови с высокой концентрацией антител, которые связываются с антигенами и/или эпитопами коронавируса, представляющими интерес.

Подлежащее иммунизации животное, отличное от человека

В настоящем изобретении представлено введение животному, отличному от человека (например, подлежащему иммунизации животному, отличному от человека), иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп коронавируса, или его иммунизацию иммуногенной композицией. В настоящем изобретении представлено введение животному, отличному от человека (например, подлежащему иммунизации животному, отличному от человека), иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген и/или эпитоп коронавируса, или его иммунизацию иммуногенной композицией.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой домашнего питомца. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой животное, относящееся к домашнему скоту. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой сельскохозяйственное животное. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой животное зоопарка (например, тигра, льва, волка и т. д.).

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой млекопитающее. Животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), включает копытное, например осла, козу, лошадь, корову или свинью. Животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), также включает кролика, крысу или мышь. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой корову (крупный рогатый скот). В других вариантах осуществления животное, отличное от человека, представляет собой козу.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), представляет собой курицу.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека), характеризуется наличием

гуманизированной иммунной системы и используется для получения человеческих поликлональных антител.

Гуманизированная иммунная система

Животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы), включает копытное, например осла, козу, лошадь, корову или свинью. Животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, также включает кролика, крысу или мышь. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, представляет собой корову (крупный рогатый скот). В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, представляет собой козу. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, представляет собой курицу.

Животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы), представляет собой животное, у которого вырабатываются человеческие антитела или варианты антител, их фрагменты и производные. Гуманизированная иммунная система предусматривает гуманизированный локус гена иммуноглобулина или несколько гуманизированных локусов гена иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус гена иммуноглобулина предусматривает последовательность человеческого иммуноглобулина зародышевой линии, что обеспечивает выработку гуманизированные антитела (например, полностью человеческие антитела) у животного, отличного от человека.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, с гуманизированной иммунной системой по настоящему изобретению предусматривает В-клетки, отличные от человеческих, с гуманизированным локусом гена иммуноглобулина. Гуманизированный локус гена иммуноглобулина подвергается VDJ-рекомбинации во время развития В-клетки, тем самым обеспечивая возможность образования В-клеток с широким разнообразием антигенсвязывающей специфичности.

Специфичность связывания антител обеспечивается посредством процесса VDJ-рекомбинации. Экзоны, кодирующие антигенсвязывающие части (вариабельные области),

собираются посредством разрыва и повторного соединения хромосомы в развивающихся В-клетках. Экзоны, кодирующие антигенсвязывающие домены, собираются из так называемых генных сегментов V (вариабельность), D (разнообразие) и J (соединение) посредством перестройки ДНК по типу "вырезания и вставки". В ходе данного процесса, называемого V(D)J-рекомбинацией, осуществляется выбор пары сегментов, введение двухнитевых разрывов рядом с каждым из сегментов, удаление (или, в выбранных случаях, инвертирование) находящейся между ними ДНК и лигирование сегментов друг с другом. Перестройки могут происходить упорядоченно, при этом соединение D с J осуществляется до того, как V-сегмент соединяется с перестроенными DJ-сегментами. Данный процесс комбинаторной сборки – выбор одного сегмента каждого типа из нескольких (иногда большого количества) возможных – представляет собой фундаментальный механизм, управляющий разнообразием антигенных рецепторов у млекопитающих. Разнообразие значительно повышается благодаря характерной вариабельности в области соединений (утрате или добавлению незначительных количеств нуклеотидов) между различными сегментами. В ходе данного процесса относительно небольшой вклад в кодирующую способность зародышевой линии превращается в почти безграничный репертуар возможных антигенсвязывающих специфичностей.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, с гуманизированной иммунной системой содержит совокупность В-клеток с разнообразием специфичностей, образование которых обеспечивается VDJ-рекомбинацией, например, гуманизированного локуса гена иммуноглобулина. В-клетка, которая кодирует В-клеточный рецептор (и антитело), который специфически связывается с антигеном и/или эпитопом по настоящему изобретению, активируется при встрече с когнатным антигеном, например, после встречи с антигеном и/или эпитопом, которые экспрессируются из кольцевого полирибонуклеотида по настоящему изобретению. В-клетка, которая кодирует В-клеточный рецептор (и антитело), который специфически связывается с антигеном и/или эпитопом по настоящему изобретению, активируется при встрече с когнатным антигеном, например, после встречи с антигеном и/или эпитопом, которые экспрессируются из линейного полирибонуклеотида по настоящему изобретению. Активированная В-клетка вырабатывает антитела, которые специфически связывают антиген и/или эпитоп по настоящему изобретению. Активированная В-клетка пролиферирует. В некоторых вариантах осуществления активированная В-клетка, отличная от человеческой, дифференцируется в В-клетки памяти и/или плазмциты. В некоторых вариантах осуществления активированная В-клетка, отличная от человеческой, подвергается

переключению класса с обеспечением образования антител других изотипов, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления В-клетка, отличная от человеческой, подвергается соматической гипермутации с обеспечением антител, которые связываются с антигеном и/или эпитопом с более высокой аффинностью.

5 При иммунизации с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих один или несколько кольцевых полирибонуклеотидов по настоящему изобретению, которые экспрессируют совокупность антигенов и/или эпитопов, совокупность клонов В-клеток реагирует на их соответствующие когнатные антигены, что приводит к образованию поликлональных антител с совокупностью специфичностей

10 связывания. В некоторых вариантах осуществления иммунизация животного, отличного от человека, по настоящему изобретению с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих один или несколько кольцевых полирибонуклеотидов по настоящему изобретению, обеспечивает активацию по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по

15 меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 клонов В-клеток, отличных

20 от человеческих. В некоторых вариантах осуществления иммунизация животного, отличного от человека, по настоящему изобретению с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих один или несколько кольцевых полирибонуклеотидов по настоящему изобретению, приводит к получению поликлональной антисыворотки, которая содержит антитела, которые специфически

25 связывают по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по

30 меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 антигенов и/или эпитопов по настоящему изобретению.

При иммунизации с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих один или несколько линейных полирибонуклеотидов по настоящему изобретению, которые экспрессируют совокупность антигенов и/или эпитопов,

совокупность клонов В-клеток реагируют на их соответствующие когнатные антигены, что приводит к образованию поликлональных антител со совокупностью специфичностей связывания. В некоторых вариантах осуществления иммунизация животного, отличного от человека, по настоящему изобретению с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих один или несколько линейных полирибонуклеотидов по настоящему изобретению, обеспечивает активацию по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 клонов В-клеток, отличных от человеческих. В некоторых вариантах осуществления иммунизация животного, отличного от человека, по настоящему изобретению с помощью одной или нескольких иммуногенных композиций, содержащих один или несколько линейных полирибонуклеотидов по настоящему изобретению, приводит к получению поликлональной антисыворотки, которая содержит антитела, которые специфически связывают по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 антигенов и/или эпитопов по настоящему изобретению.

Различные методики для модифицирования генома животных, отличных от человека (например, подлежащих иммунизации животных, отличных от человека), могут использоваться для разработки животного, обладающего способностью вырабатывать гуманизированные антитела. Животное, отличное от человека, может представлять собой трансгенное животное, например трансгенное животное, содержащее весь гуманизированный локус или локусы гена иммуноглобулина или существенную их часть. Животное, отличное от человека, может представлять собой трансхромосомное животное, например животное, отличное от человека, которое содержит искусственную хромосому человека или искусственную хромосому дрожжей.

Гуманизированный локус гена иммуноглобулина может присутствовать в векторе, например искусственной хромосоме человека или искусственной хромосоме дрожжей (YAC). Искусственную хромосому человека (HAC), содержащую гуманизированный локус гена иммуноглобулина, можно вводить в организм животного. Вектор (например, HAC) может содержать зародышевый репертуар генов тяжелой цепи антитела человека (из 14 хромосомы человека) и генов легкой цепи антитела человека, например одной или обеих из kappa-цепей (из 2 хромосомы человека) и lambda-цепей (из 22 хромосомы человека). HAC можно переносить в клетки видов животных, отличных от человека, и трансгенных животных можно получать посредством переноса ядра соматической клетки. Трансгенных животных также можно разводить для получения животных, отличных от человека, содержащих гуманизированный локус гена иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус гена иммуноглобулина интегрируют в геном животного, отличного от человека. Например, методики, предусматривающие гомологичную рекомбинацию или репарацию, направляемую гомологией, могут использоваться для модификации генома животного для введения человеческих нуклеотидных последовательностей. Инструменты, такие как CRISPR/Cas, TALEN и нуклеазы с "цинковыми пальцами", могут применяться для нацеливания интеграции.

Способы обеспечения образования животных, отличных от человека, характеризующихся наличием гуманизированных иммунных систем (например, подлежащих иммунизации животных, отличных от человека, характеризующихся наличием гуманизированных иммунных систем), были раскрыты. Например, искусственную хромосому человека можно образовывать и переносить в клетку, которая содержит дополнительные геномные модификации, представляющие интерес (например, делеции эндогенных генов иммунной системы, отличных от человеческих), и клетку можно использовать в качестве донора ядра для обеспечения образования трансгенного животного, отличного от человека.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованная иммунная система предусматривает одну или несколько тяжелых цепей антитела человека, где каждый ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, функционально связан с регуляторным элементом переключения класса. Выражение "функционально связанный" может означать, что первая молекула ДНК (например, ген тяжелой цепи) соединена со второй молекулой ДНК (например, регуляторным элементом переключения класса), при этом первая и вторая молекулы ДНК располагаются таким образом, что первая молекула ДНК влияет на

функцию второй молекулы ДНК. Две молекулы ДНК могут являться или не являться частью одной непрерывной молекулы ДНК и могут являться или не являться расположенными рядом друг с другом. Например, промотор функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, если промотор способен влиять на транскрипцию или трансляцию транскрибируемой молекулы ДНК.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованная иммунная система предусматривает одну или несколько легких цепей антитела человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная иммунная система предусматривает одну или несколько суррогатных легких цепей антитела человека.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованная иммунная система предусматривает аминокислотную последовательность, которая получена от животного, отличного от человека, например константную область, такую как константная область тяжелой цепи или ее часть. В некоторых вариантах осуществления гуманизованная иммунная система предусматривает константную область тяжелой цепи IgM от животного, отличного от человека (например, константную область тяжелой цепи IgM, полученную от копытного). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один регуляторный элемент переключения класса для генов, кодирующих одну или несколько тяжелых цепей антитела человека, замещают отличным от человеческого (например, полученным от копытного) регуляторным элементом переключения класса, например, для обеспечения переключения класса антитела при выработке в организме животного, отличного от человека, антител к антигенам и/или эпитопам по настоящему изобретению.

Гуманизованный локус гена иммуноглобулина может содержать элементы, отличные от человеческих, которые включены для обеспечения совместимости с животным, отличным от человека. В некоторых вариантах осуществления элемент, отличный от человеческого, может присутствовать в гуманизованном локусе гена иммуноглобулина для снижения распознавания какими-либо оставшимися элементами иммунной системы животного, отличного от человека). В некоторых вариантах осуществления ген иммуноглобулина (например, IgM) может быть частично замещен аминокислотной последовательностью от животного, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент, отличный от человеческого, присутствует в гуманизованном локусе гена иммуноглобулина для облегчения экспрессии и регуляции локуса в пределах организма животного, отличного от человека.

Гуманизованный локус гена иммуноглобулина может предусматривать человеческую последовательность ДНК. Гуманизованный локус гена иммуноглобулина

может являться кодон-оптимизированным для облегчения экспрессии охватываемых генов (например, генов антитела) в организме животного, отличного от человека.

Животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы), может содержать или может не содержать эндогенные компоненты иммунной системы, отличной от человеческой. В некоторых вариантах осуществления у животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой могут отсутствовать антитела, отличные от человеческих (например, у них отсутствует способность вырабатывать антитела, отличные от человеческих). У животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой может отсутствовать, например, один или несколько отличных от человеческих генов тяжелой цепи иммуноглобулина, один или несколько отличных от человеческих генов легкой цепи иммуноглобулина или их комбинация.

У животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой (например, подлежащего иммунизации животного, отличного от человека, характеризующегося наличием гуманизированной иммунной системы) могут сохраняться, например, иммунные клетки, отличные от человеческих. У животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой могут сохраняться компоненты врожденной иммунной системы, отличные от человеческих (например, клетки, система комплемента, антимикробные пептиды и т. д.). В некоторых вариантах осуществления у животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой могут сохраняться Т-клетки, отличные от человеческих. В некоторых вариантах осуществления у животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой могут сохраняться В-клетки, отличные от человеческих. В некоторых вариантах осуществления у животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой могут сохраняться антигенпрезентирующие клетки, отличные от человеческих. В некоторых вариантах осуществления у животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой могут сохраняться антитела, отличные от человеческих.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированная иммунная система предусматривает человеческие белки врожденной иммунной системы, например белки системы комплемента.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированная иммунная система предусматривает гуманизированные Т-клетки и/или антигенпрезентирующие клетки.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению предусматривают Т-клетки. Например, кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению может содержать антигены, распознаваемые В-клетками и Т-клетками, и после иммунизации животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой Т-клетки могут обеспечивать помощь Т-клеток, тем самым повышая уровень выработки антител у животного, отличного от человека. В другом примере линейный полирибонуклеотид по настоящему изобретению может содержать антигены, распознаваемые В-клетками и Т-клетками, и после иммунизации животного, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой Т-клетки могут обеспечивать помощь Т-клеток, тем самым повышая уровень выработки антител у животного, отличного от человека.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы), предусматривает любой признак, или любую комбинацию признаков, или любые способы получения, раскрытые в документе US20170233459, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы (например, подлежащее иммунизации животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы), предусматривает любой признак, или любую комбинацию признаков, или любые способы получения, раскрытые в работах Kuroiwa, Y et al. *Nat Biotechnol*, 2009 Feb; 27(2):173-81; Matsushita, H. et al. *PLoS ONE*, 2014 Mar 6;9(3): e90383; Hooper, J.W. et al. *Sci Transl Med*, 2014 Nov 26; 6(264): 264ra162; Matsushita, H. et al., *PLoS ONE* 2015 Jun 24;10(6): e0130699; Luke, T. et al. *Sci Transl Med*, 2016 Feb 17; 8(326): 326ra21; Dye, J. et al., *Sci Rep*. 2016 Apr 25;6:24897; Gardner, C. et al. *J Virol*. 2017 Jun 26;91(14); Stein, D. et al., *Antiviral Res* 2017 Oct; 146:164-173; Silver, J.N., *Clin Infect Dis*. 2018 Mar 19;66(7):1116-1119; Beigel, J.H. et al., *Lancet Infect Dis*, 2018 Apr;18(4):410-418; Luke, T. et al., *J Inf Dis*. 2018 Nov 33;218(suppl_5):S636-S648, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Сбор плазмы крови

Плазму крови, содержащую поликлональные антитела, полученные с использованием иммуногенных композиций, содержащих кольцевые полирибонуклеотиды, кодирующие антиген и/или эпитоп коронавируса, экспрессируемые

из кольцевого полирибонуклеотида, раскрытого в данном документе, можно собирать у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта после иммунизации), которого иммунизировали с помощью кольцевого полирибонуклеотида. Данные поликлональные антитела можно применять в профилактике или лечении коронавирусной инфекции, ассоциированной с антигеном и/или эпитопом, экспрессируемыми из кольцевого полирибонуклеотида. Плазму крови, содержащую поликлональные антитела, полученные с использованием иммуногенных композиций, содержащих линейные полирибонуклеотиды, кодирующие антиген и/или эпитоп коронавируса, экспрессируемые из линейного полирибонуклеотида, раскрытого в данном документе, можно собирать у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта после иммунизации), которого иммунизировали с помощью линейного полирибонуклеотида. Данные поликлональные антитела можно применять в профилактике или лечении коронавирусной инфекции, ассоциированной с антигеном и/или эпитопом, экспрессируемыми из линейного полирибонуклеотида. Плазму крови можно собирать посредством плазмафереза. Плазму крови можно собирать у одного и того же субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта после иммунизации) один раз или несколько раз, например несколько раз, каждый раз через заданный промежуток времени после иммунизации, несколько раз после иммунизации, несколько раз между иммунизациями или при любой их комбинации.

Плазму крови можно собирать у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта после иммунизации) по прошествии любого подходящего промежутка времени после иммунизации, например первой иммунизации, наиболее недавней иммунизации или промежуточной иммунизации. Плазму крови можно собирать у субъекта через по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26 по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, или по меньшей мере 30 дней или больше после иммунизации. В некоторых вариантах осуществления плазму крови собирают у субъекта через не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 21, не более чем 22, не более чем 23, не более чем 24, не более чем 25, не более чем 26, не более чем 27, не более чем 28, не более чем 29, не более чем 30, не более чем не более чем 35, не более чем 42, не более чем 49 или не более чем 56 дней после иммунизации. В некоторых вариантах осуществления плазму крови собирают у

субъекта через приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, или 42 дней или больше после иммунизации. В некоторых вариантах осуществления композиция предусматривает плазму крови, собранную после введения иммуногенной композиции, описанной в данном документе.

Плазма крови может быть заморожена (например, ее можно хранить или транспортировать в замороженном виде). В некоторых вариантах осуществления плазму крови сохраняют в свежем виде или антитела подвергают очистке от свежей плазмы крови.

В некоторых вариантах осуществления композиция предусматривает собранную плазму крови. Например, композиция содержит плазму крови от субъекта и кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит плазму крови от субъекта, и кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген, и антиген. В примере композиция содержит плазму крови от субъекта и линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит плазму крови от субъекта, и линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген, и антиген.

Очистка поликлональных антител

В настоящем изобретении представлены поликлональные антитела, специфические в отношении антигенов и/или эпитопов коронавируса по настоящему изобретению, и способы лечения или предупреждения заболевания или инфекции, связанных с коронавирусом, посредством введения эффективного количества поликлональных антител субъекту (например, лечения субъекта). Поликлональные антитела получают, как раскрыто в данном документе, и подвергают очистке после сбора плазмы крови у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта), которого иммунизировали с помощью иммуногенных композиций, содержащих кольцевой полирибонуклеотид. Поликлональные антитела получают, как раскрыто в данном документе, и подвергают очистке после сбора плазмы крови у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта), которого иммунизировали с помощью иммуногенных композиций, содержащих линейный полирибонуклеотид.

Поликлональные антитела подвергают очистке от плазмы крови с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, рН плазмы крови регулируют до 4,8 (например, посредством добавления по каплям 20% уксусной кислоты), плазму крови фракционируют с помощью каприловой кислоты при соотношении

каприловая кислота/общий белок, составляющем 1,0, и затем осветляют посредством центрифугирования (например, при 10000 g в течение 20 мин при комнатной температуре). Надосадочную жидкость, содержащую поликлональные антитела (например, поликлональные антитела IgG), нейтрализуют до pH 7,5 с помощью 1 М Tris, фильтруют
5 через поры размером 0,22 мкм и очищают посредством аффинной хроматографии с помощью колонки со специфичностью в отношении иммуноглобулина человека (например, колонки со специфичностью в отношении легкой цепи IgG человека). Поликлональные антитела дополнительно очищают посредством пропускания через колонку для аффинной хроматографии, которая специфически связывает примеси, например, отличные от
10 человеческих антитела от животного, отличного от человека. Поликлональные антитела хранят в подходящем буфере, например в стерилизованном фильтрацией буфере, содержащем 10 мМ моноводной соли глутаминовой кислоты, 262 мМ D-сорбита и Tween (0,05 мг/мл) (pH 5,5). Определяют количество и концентрацию очищенных поликлональных антител. Проводят эксклюзионную хроматографию HPLC для
15 определения наличия агрегатов или мультимеров.

В некоторых вариантах осуществления человеческие поликлональные антитела очищают от компонентов животного, отличного от человека, характеризующегося наличием гуманизированной иммунной системы, в соответствии с работой Beigel, JH et al. (*Lancet Infect. Dis.*, 18:410-418 (2018), включая дополнительное приложение), которая
20 включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вкратце, гуманизированные поликлональные антитела IgG, полученные от животного, отличного от человека, характеризующегося наличием гуманизированной иммунной системы, очищают с применением хроматографии. Полностью человеческий IgG отделяют от IgG животного, отличного от человека, с применением колонки для аффинной хроматографии со
25 специфичностью в отношении каппа-цепи IgG человека (например, KappaSelect от GE Healthcare) в качестве стадии захвата. Колонка для аффинной хроматографии со специфичностью в отношении каппа-цепи IgG человека специфически связывает полностью человеческий IgG при минимальной перекрестной реактивности в отношении Fc IgG и IgG животного, отличного от человека. Далее IgG животного, отличного от
30 человека, удаляют с применением колонки для аффинной хроматографии со специфичностью в отношении Fc IgG, которая специфически связывается с IgG животного, отличного от человека (например, в случае крупного рогатого скота, Capto HC15 от GE Healthcare), что используется в качестве стадии отрицательной аффинности для специфической очистки от IgG животного, отличного от человека. Стадия анионообменной

хроматографии также применяется для дополнительного снижения содержания загрязнителей, таких как ДНК организма-хозяина, эндотоксин, агрегаты IgG и вымываемые лиганды аффинного сорбента.

Поликлональные антитела

5 Поликлональные антитела, полученные, как раскрыто в данном документе, связываются с антигенами и/или эпитопами коронавируса (например, антигенами и/или эпитопами SARS-CoV-2). Данные поликлональные антитела применяют в способах лечения или предупреждения заболевания или инфекции, связанных с коронавирусом (например, инфекции COVID-19 или SARS-CoV-2), например, антитела могут
10 обеспечивать защиту против коронавируса, который экспрессирует указанные антигены и/или эпитопы или сходные антигены и/или эпитопы.

Поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по
15 меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по
20 меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или большим числом антигенов или эпитопов коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем
25 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450, не более чем 500 или меньшим числом антигенов или эпитопов коронавируса.

30 В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 антигенами или эпитопами коронавируса.

Поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются с одним или несколькими эпитопами из антигена коронавируса. Например, антиген коронавируса предусматривает аминокислотную последовательность, которая содержит несколько эпитопов (например, эпитопов, распознаваемых В-клетками и/или Т-клетками), и клоны антител связываются с одним или несколькими из данных эпитопов.

В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или большим числом эпитопов из одного антигена коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450, или не более чем 500, или меньшим числом эпитопов из одного антигена коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 эпитопами из одного антигена коронавируса.

Поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются с вариантами антигена или эпитопа коронавируса. Варианты могут представлять собой встречающиеся в природе варианты (например, варианты, идентифицированные в данных о последовательностях, полученных от различных видов, изолятов или квазивидов коронавируса) или могут представлять собой производные последовательности, раскрытые в данном документе, которые были образованы *in silico* (например, антиген или эпитопы с

одной или несколькими аминокислотными вставками, делециями, заменами или их комбинациями по сравнению с антигеном или эпитопом дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или большим числом вариантов антигена или эпитопа коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4, не более чем 5, не более чем 6, не более чем 7, не более чем 8, не более чем 9, не более чем 10, не более чем 15, не более чем 20, не более чем 25, не более чем 30, не более чем 40, не более чем 50, не более чем 60, не более чем 70, не более чем 80, не более чем 90, не более чем 100, не более чем 120, не более чем 140, не более чем 160, не более чем 180, не более чем 200, не более чем 250, не более чем 300, не более чем 350, не более чем 400, не более чем 450, не более чем 500 или меньшим числом вариантов антигена или эпитопа коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела по настоящему изобретению связываются, например, с приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, или 500 вариантами антигена или эпитопа коронавируса.

В конкретном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению могут представлять собой нейтрализующие антитела, антитела, отличные от нейтрализующих, или их комбинацию.

Гуманизированные антитела или их варианты, фрагменты и производные могут представлять собой антитела, которые могут быть составлены для введения человеку. Гуманизированные антитела могут представлять собой химерные гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела.

Гуманизированные антитела могут представлять собой химерные гуманизированные антитела, например, содержащие аминокислотную последовательность из аминокислотной последовательности человеческого антитела или аминокислотную

последовательность, сходную с таковой, и аминокислотную последовательность, отличную от человеческой. Например, часть тяжелой и/или легкой цепи из химерного гуманизированного антитела может быть идентичной или сходной с соответствующей последовательностью в человеческом антителе, в то время как остальная(остальные) цепь(цепи) может(могут) быть отличной(отличными) от человеческой(человеческих), например, может(могут) быть идентичной(идентичными) или сходной(сходными) с соответствующей последовательностью в антителе, полученной от другого вида или принадлежащей к другому классу или подклассу антител. Последовательность, отличную от человеческой, можно гуманизировать для снижения вероятности иммуногенности при одновременном сохранении специфичности в отношении мишени, например, посредством включения человеческой ДНК в генетическую последовательность генов, которые обеспечивают выработку антител у животного, отличного от человека.

Гуманизированные антитела могут представлять собой полностью человеческие антитела, например, содержащие аминокислотную последовательность, которая представляет собой аминокислотную последовательность человеческого антитела.

В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, с гуманизированной иммунной системой вырабатывает только полностью человеческие антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой антитела, которые предусматривают базовую четырехцепочечную структурную единицу антитела. Базовая четырехцепочечная структурная единица антитела может содержать две полипептидные последовательности тяжелой цепи (H) и две полипептидные последовательности легкой цепи (L). Каждая из тяжелых цепей может содержать одну N-концевую переменную область (V_H) и три или четыре C-концевые константные области (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}). Каждая из легких цепей может содержать одну N-концевую переменную область (V_L) и одну C-концевую константную область (C_L). Переменная область легкой цепи совмещена с переменной областью тяжелой цепи и константная область легкой цепи совмещена с первой константной областью тяжелой цепи C_{H1} . Сочетание переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи обеспечивает образование одного антигенсвязывающего сайта. Каждая легкая цепь соединена с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью. Две тяжелые цепи соединены друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа тяжелой цепи. Каждая тяжелая и легкая цепь также может содержать равномерно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. C-концевые константные области тяжелых

цепей составляют Fc-область антитела, которая может опосредовать эффекторные функции, например, посредством взаимодействий с Fc-рецепторами или белками системы комплемента.

Легкая цепь может обозначаться как каппа или лямбда исходя из аминокислотной последовательности константной области. Тяжелая цепь может обозначаться как альфа, дельта, эpsilon, гамма или мю исходя из аминокислотной последовательности константной области. Антитела подразделяют на пять классов иммуноглобулинов или изотипов исходя из тяжелой цепи. IgA содержит тяжелые альфа-цепи, IgD содержит тяжелые дельта-цепи, IgE содержит тяжелые эpsilon-цепи, IgG содержит тяжелые гамма-цепи, и IgM содержит тяжелые мю-цепи. Антитела классов IgG, IgD и IgE содержат момеры четырехцепочечной структурной единицы, описанной выше (две тяжелые и две легкие цепи), в то время как классы IgM и IgA могут содержать мультимеры четырехцепочечной структурной единицы. Классы альфа и гамма дополнительно подразделяют на подклассы исходя из различий в последовательности и функции константной области тяжелой цепи. Подклассы IgA и IgG, экспрессируемые у людей, включают IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Иллюстративные аминокислотные последовательности последовательностей константного домена человека представлены в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgG1 человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 34** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgG2 человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 35** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgG3 человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 36** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgG4 человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 37** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-

клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgE человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 38** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgA1 человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 39** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgA2 человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 40** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgM человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 41** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат последовательность константного домена IgD человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 42** или ее вариант, производное или фрагмент.

ТАБЛИЦА 4. Иллюстративные аминокислотные последовательности последовательностей константного домена человека.

ТАБЛИЦА 4		
SEQ ID NO:	Название	Аминокислотная последовательность
34	Константный домен IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
35	Конста	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

	нтный домен IgG2	SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCAPPVAGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
36	Конста нтный домен IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTC NVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSL SLSPGK
37	Конста нтный домен IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
38	Конста нтный домен IgE	ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEPVMVT WDTGSLNGTTMTLPATTLTSLGHYATISLLTVSGAWAKQM FTCRVAHTPSSTDWVDNKTFVCSRDFTPPTVKILQSSCDG GGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTAST TQEGELASTQSELTSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDST KKCADSNPRGVSAYLSRPSFDLFIKRSPTITCLVVDLAPSK GTVNLTWSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGT RDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTSGPRAAPEVYAF ATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDAR

		HSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEA ASPSQTVQRAVSVNPGK
39	Конста нтный домен IgA1	ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWS ESGQGV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSV TCHVKHYTNPSQDVTVPCVPVSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPR LSLHRPALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSG KSAVQGP PERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAA YPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTC LARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGT TFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDR LAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
40	Конста нтный домен IgGA2	ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTW SESGQNV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKS VTCHVKHYTNSSQDVTVPCRVPPPPCCHPRLSLHRPALED LLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGP PER DLCGCYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTAN ITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVL VRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTYAVTSILRVA AEDWKKGETFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHINV SVVMAEADGTCY
41	Конста нтный домен IgM	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSW KYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGT DEHV VCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS VFPVPRDGF FGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVSGSVTTDQV QAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLT FQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTD LTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASI CEDDWNSGERFTCTVTHDLP SPLKQTISRPKGVALHRPDV YLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPL SPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTC VVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
42	Конста нтный домен	APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLA CLITGYHPTS VTVTW YMGTSQSQPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEY KCVVQHTASKSKKEIFRWPEPKAQASSVPTAQQAEGSLA

	IgD	KATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSH TQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAG TSVTCTLNHPQLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPP EAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPP QPRSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDESRTLLNA SRSLEVS YVTDHGPMK
--	-----	---

Антитело по настоящему изобретению может содержать последовательность константного домена легкой цепи человека, например каппа- (IgK) или лямбда-цепи (IgL). В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат

5 последовательность константного домена IgK человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 43** или ее вариант, производное или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело, животное, отличное от человека, или В-клетка, отличная от человеческой, по настоящему изобретению содержат

10 последовательность константного домена IgL человека, например содержат последовательность под **SEQ ID NO: 44** или ее вариант, производное или фрагмент.

В **таблице 5** представлены последовательности иллюстративных константных доменов легкой цепи.

ТАБЛИЦА 5		
SEQ ID NO:	Название	Аминокислотная последовательность
43	Константный домен IgK	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
44	Константный домен IgL	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Наличие сигнальных пептидов может приводить к более высокому уровню экспрессии и/или секреции белка клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело

15 по настоящему изобретению содержит сигнальный пептид. Сигнальные пептидазы могут отщеплять сигнальный пептид от белка, например, в ходе процесса секреции, с

образованием зрелого белка, который не содержит последовательность сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид отщепляется от соединения или антитела по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления зрелое соединение или антитело по настоящему изобретению не содержат

5 сигнального пептида.

Константные области могут опосредовать различные эффекторные функции и могут быть минимально вовлечены в связывание антигена. Разные изотипы или подклассы IgG могут быть ассоциированы с разными эффекторными функциями или терапевтическими характеристиками, например, по причине взаимодействий с разными Fc-рецепторами и/или

10 белками системы комплемента. Антитела, содержащие Fc-области, которые задействуют активирующие Fc-рецепторы, могут, например, участвовать в осуществлении антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), индукции передачи сигнала через иммунорецепторные

15 тирозиновые активирующие мотивы (ITAM) и индукции секреции цитокинов. Антитела, содержащие Fc-области, которые задействуют ингибирующие Fc-рецепторы, могут, например, индуцировать передачу сигнала через иммунорецепторные тирозиновые ингибирующие мотивы (ITIM).

Разные подклассы антител предусматривают разные способности вызывать

20 иммунные эффекторные функции. Например, IgG1 и IgG3 могут эффективно рекрутировать комплемент для активации CDC, IgG2 вызывает минимальную ADCC. IgG4 обладает менее выраженной способностью запускать иммунные эффекторные функции. Модификации константных областей могут также влиять на характеристики антитела, например обеспечивать усиление или снижение лигирования Fc-рецептора, усиление или

25 снижение ADCC, усиление или снижение ADCP, усиление или снижение CDC, усиление или снижение передачи сигнала через ITAM, усиление или снижение индукции цитокинов, усиление или снижение передачи сигнала через ITIM, увеличение или уменьшение периода полужизни или усиление или снижение взаимодействия антигена с Fc-рецепторами. Модификации могут включать, например, аминокислотные мутации, изменение

30 посредством посттрансляционных модификаций (например, гликозилирование), комбинирование доменов из разных изотипов или подклассов или их комбинацию.

Антитела по настоящему изобретению могут содержать константные области или Fc-области, которые были выбраны или модифицированы для обеспечения подходящих характеристик антитела, например подходящих характеристик для лечения заболевания

или состояния, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления IgG1 можно применять, например, для стимуляции воспаления, активации иммунной системы и иммунных эффекторных функций для лечения инфекции. В некоторых вариантах осуществления IgG4 можно применять, например, в случаях, где требуются антагонистические свойства антитела с ослабленными иммунными эффекторными функциями (например, для нейтрализации антигенов коронавируса и ингибирования проникновения вируса в клетки без стимуляции воспаления и активации иммунной системы).

Неограничивающие примеры модификаций антител и их эффектов представлены в таблице 6.

ТАБЛИЦА 6		
Эффект	Изотип	Мутация(мутации)/модификация(модификации)
Усиление ADCC	IgG1	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
Усиление ADCC	IgG1	S239D/I332E
Усиление ADCC	IgG1	S239D/I332E/A330L
Усиление ADCC	IgG1	S298A/E333A/K334A
Усиление ADCC	IgG1	В одной тяжелой цепи: L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A В противоположной тяжелой цепи: D270E/K326D/A330M/K334E
Усиление ADCP	IgG1	G236A/S239D/I332E
Усиление CDC	IgG1	K326W/E333S
Усиление CDC	IgG1	S267E/H268F/S324T
Усиление CDC	IgG1, IgG3	Комбинация доменов из IgG1/IgG3
Усиление CDC	IgG1	E345R/E430G/S440Y
Утрата гликозилирования, ослабление эффекторных функций	IgG1	N297A, или N297Q, или N297G
Ослабление эффекторных функций	IgG1, IgG4	L235E
Ослабление эффекторных функций	IgG1	L234A/L235A

Ослабление эффекторных функций	IgG4	F234A/L235A
Ослабление эффекторных функций	IgG4	F234A/L235A/G237A/P238S
Ослабление эффекторных функций	IgG4	F234A/L235A/ΔG236/G237A/P238S
Ослабление эффекторных функций	IgG2, IgG4	Комбинация доменов из IgG2/IgG4
Ослабление эффекторных функций	IgG2	H268Q/V309L/A330S/P331S
Ослабление эффекторных функций	IgG2	V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S
Ослабление эффекторных функций	IgG1	L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S
Увеличение периода полужизни	IgG1	M252Y/S254T/T256E
Увеличение периода полужизни	IgG1	M428L/N434S
Усиление взаимодействия антиген/Fc-рецептор	IgG1	S267E/L328F
Изменение взаимодействия антиген/Fc рецептор	IgG1	N325S/L328F
Снижение обмена Fab- плечами	IgG4	S228P

Вариабельные (V) области могут опосредовать связывание антигена и определять специфичность конкретного антитела в отношении антигена. Вариабельная область содержит относительно инвариантные последовательности, называемые каркасными областями, и гипервариабельные области, которые существенно отличаются по последовательности среди антител с разными специфичностями связывания. Вариабельная область тяжелой или легкой цепи каждого антитела содержит четыре каркасные области, разделенные тремя гипервариабельными областями. Вариабельные области тяжелых и легких цепей сворачиваются таким образом, что гипервариабельные области оказываются

в непосредственной близости друг от друга с образованием антигенсвязывающего сайта. Четыре каркасные области в целом принимают f3-складчатую конфигурацию, в то время как гипервариабельные области образуют петли, соединяющие и, в некоторых случаях, образующие часть f3-складчатой структуры.

5 В пределах гипервариабельных областей находятся аминокислотные остатки, которые главным образом определяют специфичность связывания антитела. Последовательности, содержащие данные остатки, известны как области, определяющие комплементарность (CDR). Один антигенсвязывающий сайт антитела может содержать шесть CDR: три в гипервариабельных областях легкой цепи и три в гипервариабельных
10 областях тяжелой цепи. CDR в легкой цепи могут обозначаться как LCDR1, LCDR2, LCDR3, в то время как CDR в тяжелой цепи могут обозначаться как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению включают их варианты, производные и антигенсвязывающие фрагменты. Например,
15 животное, отличное от человека, может быть генетически модифицировано для выработки вариантов антител, их производных и антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой однодоменное антитело (sdAb), например антитело VHH, содержащее только тяжелую цепь (HCAb), или нанотело. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab, Fab', F(ab')₂,
20 димеры и тримеры конъюгатов Fab, Fv, scFv, миниантитела, диа-, триа- и тетратела, а также линейные антитела. Fab и Fab' представляют собой антигенсвязывающие фрагменты, которые могут содержать домены V_H и C_{H1} тяжелой цепи, соединенные с доменами V_L и C_L легкой цепи дисульфидной связью. F(ab')₂ может содержать два Fab или Fab', которые соединены дисульфидными связями. Fv может содержать домены V_H и V_L, удерживаемые
25 вместе с помощью нековалентных взаимодействий. scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент) представляет собой слитый белок, который может содержать домены V_H и V_L, связанные пептидным линкером. Манипуляции с ориентацией доменов V_H и V_L и длиной линкера могут применяться для получения разных форм молекул, которые могут быть мономерными, димерными (диатело), тримерными (триатело) или тетрамерными
30 (тетратело). Миниантитела представляют собой слитые белки, содержащие scFv-C_{H3}, которые собираются в бивалентные димеры.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело к коронавирусу, полученное посредством введения иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, субъекту, представляющему

собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека). В некоторых вариантах осуществления совокупность антител по настоящему изобретению представляет собой совокупность поликлональных антител к коронавирусу, полученных посредством иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека), с помощью иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к коронавирусу или совокупность поликлональных антител к коронавирусу дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека (например, подлежащий иммунизации субъект, представляющий собой животное, отличное от человека), представляет собой животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы.

15 **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ**

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции, вводимые субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту), представляют собой фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, предусмотренные в настоящем изобретении, могут также включать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В настоящем изобретении также представлены фармацевтические композиции, содержащие совокупность поликлональных антител или препарат на основе поликлонального антитела против коронавируса, раскрытые в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой вспомогательное вещество, отличное от носителя. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, служит в качестве среды-носителя или среды для композиции, такой как композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида, описанная в данном документе. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, служит в качестве среды-носителя или среды для композиции, такой как композиция на основе линейного полирибонуклеотида, описанная в данном документе. Неограничивающие примеры вспомогательного вещества, отличного от носителя, включают растворители, водные растворители, неводные растворители, дисперсионные среды, разбавители, дисперсии, суспендирующие средства, поверхностно-активные средства, изотонические средства, загустители, эмульгаторы,

консерванты, полимеры, пептиды, белки, клетки, гиалуронидазы, диспергирующие средства, гранулирующие средства, средства для улучшения распадаемости, связывающие средства, буферные средства (например, фосфатно-солевой буфер (PBS)), смазывающие средства, масла и их смеси. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой любой из неактивных ингредиентов, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством продуктов и лекарственных средств (FDA) Соединенных Штатов Америки и перечисленных в Базе данных неактивных ингредиентов, который не демонстрирует эффекта проникновения в клетку. Фармацевтические композиции могут необязательно содержать одно или несколько дополнительных активных веществ, например, терапевтически и/или профилактически активные вещества. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть стерильными и/или апирогенными. Общие соображения относительно составления и/или изготовления фармацевтических средств можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (включенной в данный документ посредством ссылки).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать поликлональные антитела по настоящему изобретению, кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению или их комбинацию. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать поликлональные антитела по настоящему изобретению, линейный полирибонуклеотид по настоящему изобретению или их комбинацию. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать поликлональные антитела по настоящему изобретению, кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению, линейный полирибонуклеотид по настоящему изобретению или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в данном документе, являются подходящими для введения людям. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции (например, содержащие кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид или иммуногенную композицию, описанные в данном документе), представленные в данном документе, являются подходящими для введения субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту), где субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции (например, содержащие совокупность поликлональных антител или препарат на основе поликлональных антител, описанные в данном документе), представленные в данном документе, являются подходящими для

введения субъекту (например, подлежащему лечению субъекту), где субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции (например, содержащие кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид или иммуногенную композицию, описанные в данном документе), представленные в данном документе, являются подходящими для введения субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту), где субъект представляет собой животное, отличное от человека, например, являются подходящими для ветеринарного применения. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения людям, для того, чтобы сделать композиции подходящими для введения различным животным, является широко распространенной, и средний специалист в области ветеринарной фармакологии может разработать и/или осуществить такую модификацию путем проведения лишь обычных экспериментов в случае необходимости в таковых. Субъекты, которым предусмотрено введение фармацевтических композиций, включают без ограничения любых животных, таких как люди и/или другие приматы, млекопитающих, включая коммерчески значимых млекопитающих, например домашних питомцев и домашний скот, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, мыши и/или крысы; и/или птиц, включая коммерчески значимых птиц, таких как попугаи, домашняя птица, цыплята, утки, гуси, куры или петухи и/или индейки; животных зоопарка, например представителя семейства кошачьих; животных, отличных от млекопитающих, например рептилий, рыб, земноводных и т. д.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции (например, содержащие совокупность поликлональных антител или препарат на основе поликлональных антител, описанные в данном документе), представленные в данном документе, являются подходящими для введения субъекту (например, подлежащему лечению субъекту), где субъект представляет собой животное, отличное от человека, например, являются подходящими для ветеринарного применения. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения людям, для того, чтобы сделать композиции подходящими для введения различным животным, является широко распространенной, и средний специалист в области ветеринарной фармакологии может разработать и/или осуществить такую модификацию путем проведения лишь обычных экспериментов в случае необходимости в таковых. Субъекты, которым предусмотрено введение фармацевтических композиций, включают без ограничения любых животных, таких как люди и/или другие приматы, млекопитающих, включая коммерчески значимых

млекопитающих, например домашних питомцев и домашний скот, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, мыши и/или крысы; и/или птиц, включая коммерчески значимых птиц, таких как попугаи, домашняя птица, цыплята, утки, гуси, куры или петухи и/или индейки; животных зоопарка, например представителя семейства кошачьих; животных, отличных от млекопитающих, например рептилий, рыб, земноводных и т. д.

Субъекты (например, субъекты, подлежащие иммунизации, или субъекты, подлежащие лечению), которым предусмотрено введение фармацевтических композиций, включают любых копытных.

10 Составы на основе фармацевтических композиций, описанных в данном документе, можно получать с помощью любого способа, известного или разработанного в будущем в области фармакологии. Как правило, такие способы получения включают стадию объединения активного ингредиента со вспомогательным веществом и/или одним или несколькими другими вспомогательными ингредиентами и затем, при необходимости и/или при желании, разделения, придания формы и/или упаковки продукта.

15 Фармацевтические композиции могут быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Примеры подходящих водных и неводных композиций, которые могут использоваться в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения материалов для покрытия, таких как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и посредством применения поверхностно-активных веществ.

25 Стерильные растворы для инъекций можно получать посредством включения активного соединения (например, средства, такого как кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид или антитело) в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, например, перечисленных выше, как это требуется, с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают посредством включения активного соединения в стерильную среду-носитель, которая содержит основную среду для диспергирования и другие требуемые

ингредиенты, например, из таковых, перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и сублимационную сушку (лиофилизацию), в результате которых получают порошок активного ингредиента с любым требуемым

5 дополнительным ингредиентом из их раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации.

Средства (например, кольцевые полирибонуклеотиды, линейные полирибонуклеотиды или антитела) по настоящему изобретению можно получать в виде композиции, которая будет защищать их от быстрого высвобождения, такой как состав с

10 контролируемым высвобождением, включающий импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы для получения таких составов в целом известны специалистам в данной области техники. См.,

15 например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Композиция по настоящему изобретению может представлять собой, например, форму с немедленным высвобождением или состав с контролируемым высвобождением. Состав с немедленным высвобождением может быть составлен таким образом, чтобы обеспечивать возможность быстрого действия соединений (например,

20 средств, таких как кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид или антитело). Неограничивающие примеры составов с немедленным высвобождением включают легкорастворимые составы. Состав с контролируемым высвобождением может представлять собой фармацевтический состав, который был адаптирован таким образом, чтобы скорости высвобождения и профили высвобождения активного средства могли

25 соответствовать физиологическим и хронотерапевтическим требованиям, или, в качестве альтернативы, который был составлен таким образом, чтобы обеспечивать высвобождение активного средства с заданной скоростью. Неограничивающие примеры составов с контролируемым высвобождением включают гранулы, гранулы с замедленным высвобождением, гидрогели (например, синтетического или природного происхождения),

30 другие желирующие средства (например, гелеобразующие пищевые волокна), составы на основе матрицы (например, составы, содержащие полимерный материал, в котором диспергирован по меньшей мере один активный ингредиент), гранулы в матрице, полимерные смеси и гранулированные массы.

Фармацевтические составы для введения могут включать водные растворы активных соединений (например, средств, таких как кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид или антитело) в водорастворимой форме. Суспензии активных соединений можно получать в виде масляных суспензий для инъекций.

5 Подходящие липофильные растворители или среды-носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Суспензия может также содержать
10 подходящие стабилизаторы или средства, которые повышают растворимость средств таким образом, чтобы обеспечивать возможность получения высококонцентрированных растворов. Активный ингредиент может находиться в форме порошка для восстановления с помощью подходящей среды-носителя, например стерильной апиrogenной воды, перед применением.

15 Способы получения композиций, содержащих средства, описанные в данном документе, включают составление средств с одним или несколькими инертными, фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами или носителями с образованием твердой, полутвердой или жидкой композиции. Твердые композиции включают, например, порошки, диспергируемые гранулы и облатки. Жидкие композиции
20 включают, например, растворы, в которых растворяют средство, эмульсии, содержащие средство, или раствор, содержащий липосомы, мицеллы или наночастицы, содержащие средство, раскрытое в данном документе. Полутвердые композиции включают, например, гели, суспензии и кремы. Композиции могут находиться в жидких растворах или суспензиях, твердых формах, подходящих для растворения или суспендирования в
25 жидкости перед применением, или в виде эмульсий. Данные композиции могут также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, буферные средства для поддержания pH и другие фармацевтически приемлемые добавки.

Неограничивающие примеры лекарственных форм, подходящих для применения в
30 настоящем изобретении, включают жидкость, порошок, гель, наносуспензию, наночастицу, микрогель, водные или масляные суспензии, эмульсию и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления состав по настоящему изобретению содержит термостабилизатор, такой как сахар или сахарный спирт, например сахарозу, сорбит, глицерин, трегалозу или маннит или любую их комбинацию. В некоторых

вариантах осуществления стабилизатор представляет собой сахар. В некоторых вариантах осуществления сахар представляет собой сахарозу, маннит или трегалозу.

5 Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены, например, таким образом, чтобы они содержали фармацевтическое вспомогательное вещество или носитель. Фармацевтический носитель может представлять собой мембрану, липидный бислой и/или полимерный носитель, например липосому или частицу, такую как наночастица, например липидная наночастица, и доставляться посредством известных способов, таких как частичная или полная инкапсуляция кольцевого полирибонуклеотида, субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту, или подлежащему лечению субъекту), нуждающемуся в этом (например, человеку или отличному от человека сельскохозяйственному или домашнему животному, например, крупному рогатому скоту, собаке, кошке, лошади, домашней птице).

Способы доставки

15 Кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, или фармацевтическую композицию на его основе, описанную в данном документе, можно вводить в клетку в везикуле или другом носителе на основе мембран, описанном в данном документе. Линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, или фармацевтическую композицию на его основе, описанную в данном документе, можно вводить в клетку в везикуле или другом носителе на основе мембран, описанном в данном документе.

20 В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку копытного. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой соединительную ткань, мышечную ткань, нервную ткань или эпителиальную ткань. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой орган (например, печень, легкое, селезенку, почку и т. д.). В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект) представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект) представляет собой копытное.

30 В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, может содержать: (i) соединение (например, кольцевой

полирибонуклеотид или антитело), раскрытое в данном документе; (ii) буфер; (iii) неионогенный детергент; (iv) средство, регулирующее тоничность; и (v) стабилизатор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, может содержать: (i) соединение (например, линейный полирибонуклеотид или антитело), раскрытое в данном документе; (ii) буфер; (iii) неионогенный детергент; (iv) средство, регулирующее тоничность; и (v) стабилизатор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, представляет собой стабильный жидкий фармацевтический состав.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

10 В настоящем изобретении представлены композиции и способы, которые являются применимыми в качестве видов лечения или профилактики, например, композиции и способы, которые предусматривают антитела, которые можно применять для защиты субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта или подлежащего лечению субъекта) от эффектов коронавирусной инфекции. Например, кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению можно вводить субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) для стимуляции выработки антител (например, человеческих поликлональных антител), которые связываются с требуемыми антигенами и/или эпитопами коронавируса. Линейный полирибонуклеотид по настоящему изобретению можно вводить субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту) для стимуляции выработки антител (например, человеческих поликлональных антител), которые связываются с требуемыми антигенами и/или эпитопами коронавируса. Антитела можно получать от субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта после иммунизации) и составлять для введения субъекту (например, подлежащему лечению субъекту, такому как подлежащий лечению субъект, представляющий собой человека), например, в качестве лечения или профилактики. Антитела могут обеспечивать защиту, например, от коронавируса, который экспрессирует указанные антигены и/или эпитопы. В другом примере кольцевой полирибонуклеотид можно вводить субъекту, представляющему собой человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой человека), для стимуляции выработки антител у субъекта, представляющего собой человека, которые связываются с требуемыми антигенами и/или эпитопами. В другом примере линейный полирибонуклеотид можно вводить субъекту, представляющему собой человека (например, подлежащему иммунизации субъекту, представляющему собой человека) для стимуляции выработки антител у субъекта, представляющего собой человека, которые связываются с требуемыми антигенами и/или

эпитопами. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены композиции для применения в лечении или профилактике коронавирусной инфекции.

Неограничивающие примеры состояний и заболеваний, которые можно лечить с помощью композиций и способов по настоящему изобретению, включают таковые, вызванные коронавирусом, раскрытым в данном документе, или ассоциированные с ним, например, инфекции, вызванные коронавирусом. В некоторых вариантах осуществления состояние вызвано SARS-CoV или ассоциировано с ним. В некоторых вариантах осуществления состояние вызвано SARS-CoV-2 или ассоциировано с ним. В некоторых вариантах осуществления состояние представляет собой заболевание, вызванное коронавирусом 2019 года (COVID-19). В некоторых вариантах осуществления состояние вызвано MERS-CoV или ассоциировано с ним.

В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела получают посредством иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека), с помощью кольцевого полирибонуклеотида по настоящему изобретению, при этом у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, после иммунизации) собирают плазму крови и поликлональные антитела подвергают очистке от плазмы крови. В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела получают посредством иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека), с помощью линейного полирибонуклеотида по настоящему изобретению, при этом у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, после иммунизации) собирают плазму крови и поликлональные антитела подвергают очистке от плазмы крови. Необязательно очищенные поликлональные антитела от более чем одного субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, более чем одного подлежащего иммунизации субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, после иммунизации), несколько образцов очищенных поликлональных антител от одного и того же субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека (например, подлежащего иммунизации субъекта,

представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, после иммунизации), или их комбинацию объединяют и вводят субъекту (например, подлежащему лечению субъекту), нуждающемуся в этом, например субъекту, представляющему собой человека (например, подлежащему лечению субъекту, представляющему собой человека), нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления поликлональные антитела составлены в виде препарата на основе поликлонального антитела, например препарата на основе поликлонального антитела против коронавируса. Способ получения препарата на основе человеческих поликлональных антител против коронавируса, включающий: (а) введение животному (например, подлежащему иммунизации животному), способному вырабатывать антитела, иммуногенной композиции, содержащей полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид или линейный полирибонуклеотид), который содержит последовательность, кодирующую антиген коронавируса, (b) осуществление сбора крови или плазмы крови у млекопитающего, (с) осуществление очистки поликлональных антител к коронавирусу от крови или плазмы крови и (d) составление поликлональных антител в виде терапевтического или фармацевтического препарата для применения у человека (например, введения подлежащему лечению субъекту, представляющему собой человека) или ветеринарного препарата для применения у животного, отличного от человека (например, введения подлежащему лечению субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает осуществление мониторинга субъекта (например, подлежащего лечению субъекта), у которого имеется коронавирусная инфекция, субъекта (например, подлежащего лечению субъекта), подверженного риску воздействия коронавирусной инфекции, или субъекта (например, подлежащего лечению субъекта), нуждающегося в этом, в отношении наличия поликлональных антител к антигену коронавируса. В некоторых вариантах осуществления мониторинг осуществляют перед введением поликлональных антител и/или после введения поликлональных антител.

При практическом осуществлении способов лечения или применения, представленных в данном документе, терапевтически эффективные количества соединения (например, средства, такого как кольцевой полирибонуклеотид или антитело), описанного в данном документе, вводят в виде фармацевтической композиции субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту или подлежащему лечению субъекту), у которого имеется заболевание или состояние, подлежащие лечению или требующие профилактики.

При практическом осуществлении способов лечения или применения, представленных в данном документе, терапевтически эффективные количества соединения (например, средства, такого как линейный полирибонуклеотид или антитело), описанного в данном документе, вводят в виде фармацевтической композиции субъекту (например, 5 подлежащему иммунизации субъекту или подлежащему лечению субъекту), у которого имеется заболевание или состояние, подлежащие лечению или требующие профилактики. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) представляет собой млекопитающее, такое как человек. Терапевтически эффективное количество может широко варьировать в 10 зависимости от степени тяжести заболевания, возраста и относительного состояния здоровья субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта или подлежащего лечению субъекта), активности применяемых соединений, характеристик рассматриваемого коронавируса и других факторов.

Способы и пути введения

15 Композицию (например, фармацевтическую композицию), раскрытую в данном документе, можно вводить в терапевтически эффективном количестве в различных формах и различными путями, включающими, например, пероральное или местное введение. В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить путем парентерального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, внутрикожного, внутрибрюшинного, 20 интрацеребрального, субарахноидального, внутриглазного, внутригрудного, офтальмологического, эндотелиального, местного, интраназального, внутрилегочного, ректального, внутриартериального, интратекального, ингаляционного, внутриочагового, внутрикожного, эпидурального, интракапсулярного, субкапсулярного, внутрисердечного, транстрахеального, субкутикулярного, субарахноидального или интраспинального 25 введения, например, посредством инъекции или инфузии. . В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить посредством абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные оболочки (например, введение через слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника). В некоторых вариантах осуществления композицию доставляют посредством нескольких путей введения.

30 В некоторых вариантах осуществления композицию вводят посредством внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят посредством медленной непрерывной инфузии в течение длительного промежутка времени, например в течение более чем 24 часов. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в виде внутривенной инъекции или короткой инфузии.

Фармацевтическую композицию можно вводить местно, например, путем инъекции средства непосредственно в орган, необязательно в виде депо, или состава с замедленным высвобождением, или импланта. Фармацевтическую композицию можно обеспечивать в форме состава с быстрым высвобождением, в форме состава с пролонгированным высвобождением или в форме состава с промежуточным высвобождением. Форма с быстрым высвобождением может обеспечивать немедленное высвобождение. Состав с пролонгированным высвобождением может обеспечивать контролируемое высвобождение или устойчивое замедленное высвобождение. В некоторых вариантах осуществления для доставки фармацевтической композиции можно применять помпу. В некоторых вариантах осуществления можно применять устройство доставки в виде ручки, например, для подкожной доставки композиции по настоящему изобретению.

Фармацевтическую композицию, представленную в данном документе, можно вводить в сочетании с другими средствами терапии, например противовирусным средством терапии, антибиотиком, средством клеточной терапии, средством терапии на основе цитокинов или противовоспалительным средством. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид или антитело, описанные в данном документе, можно применять по отдельности или в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами в качестве компонента смесей. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид или антитело, описанные в данном документе, можно применять по отдельности или в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами в качестве компонента смесей.

Дозы и частота введения доз

Терапевтические средства, описанные в данном документе, можно вводить до, во время или после возникновения заболевания или состояния, и время введения композиции, содержащей терапевтическое средство, может варьировать. В некоторых случаях композиции можно применять в качестве профилактического средства и можно вводить непрерывно субъектам (например, подлежащему иммунизации субъекту или подлежащему лечению субъекту) с восприимчивостью к коронавирусу или с предрасположенностью к состоянию или заболеванию, ассоциированным с коронавирусом. Профилактическое введение может снижать вероятность возникновения инфекции, заболевания или состояния или может снижать степень тяжести инфекции, заболевания или состояния.

Композиции можно вводить субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту или подлежащему лечению субъекту) после (например, как можно раньше после) возникновения симптомов. Композиции можно вводить субъекту (например, подлежащему

иммунизации субъекту или подлежащему лечению субъекту) после (например, как можно раньше после) получения результата теста, например результата теста, который обеспечивает постановку диагноза, теста, который показывает наличие коронавируса у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта или подлежащего лечению субъекта), или теста, показывающего прогрессирование состояния, например снижение уровня кислорода в крови. Терапевтическое средство можно вводить после (например, насколько это практически возможно раньше после) того, как было выявлено или заподозрено возникновение заболевания или состояния. Терапевтическое средство можно вводить после (например, насколько это практически возможно раньше после) потенциального воздействия коронавируса, например после того, как субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) осуществит контакт с инфицированным субъектом или узнает, что он имел контакт с инфицированным субъектом, который может быть заразным.

Кольцевой полирибонуклеотид, антитело или терапевтическое средство, описанные в данном документе, вводят через любые требуемые промежутки времени. Линейный полирибонуклеотид, антитело или терапевтическое средство, описанные в данном документе, вводят через любые требуемые промежутки времени.

Фактические уровни дозировки средства по настоящему изобретению (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида, антитела или терапевтического средства) можно изменять таким образом, чтобы получить количество средства, достаточное для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного субъекта, композиции и режима введения, не вызывающее токсического эффекта у субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта или подлежащего лечению субъекта). Выбранный уровень дозировки может зависеть от ряда фармакокинетических факторов, включающих активность конкретных применяемых композиций по настоящему изобретению, путь введения, время введения, скорость выведения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, применяемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и медицинский анамнез пациента, подвергаемого лечению, и тому подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Режимы введения доз можно регулировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического и/или профилактического ответа). Например, можно осуществлять введение в виде одного болюса, несколько частей

разделенной дозы можно вводить в течение определенного периода времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать согласно требованиям терапевтической ситуации. Особым преимуществом обладает составление композиций для парентерального введения в виде стандартной лекарственной формы для удобства введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма, как используется в данном документе, 5 относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве однократных доз для субъектов (например, подлежащих иммунизации субъектов или подлежащих лечению субъектов); каждая единица содержит предустановленное количество активного средства, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в ассоциации с 10 требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению определяется и непосредственно зависит от следующего: (a) уникальных характеристик активного средства и конкретного терапевтического эффекта, которого нужно достичь, и (b) ограничений, присущих области составления такого активного средства для лечения чувствительности у индивидуумов. 15 Дозу можно определить исходя из концентрации в плазме крови или локальной концентрации кольцевого полирибонуклеотида или антитела. Дозу можно определить исходя из концентрации в плазме крови или локальной концентрации линейного полирибонуклеотида или антитела.

Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может быть 20 представлена в виде стандартной лекарственной формы, подходящей для однократного введения точно отмеренной дозировки. В стандартной лекарственной форме состав может быть разделен на однократные дозы, содержащие подходящие количества одного или нескольких кольцевых полирибонуклеотидов, антител и/или терапевтических средств. В стандартной лекарственной форме состав может быть разделен на однократные дозы, 25 содержащие подходящие количества одного или нескольких линейных полирибонуклеотидов, антител и/или терапевтических средств. Однократная дозировка может быть представлена в форме упаковки, в которой содержатся дискретные количества состава. Неограничивающие примеры представляют собой упакованные лекарственные формы для инъекций, флаконы и ампулы. Композиции в виде водной суспензии, раскрытые 30 в данном документе, могут быть упакованы в однодозовый контейнер без возможности повторного закрывания. Многодозовые контейнеры с возможностью повторного закрывания могут использоваться, например, в комбинации с консервантом или без него. Состав для инъекций, раскрытый в данном документе, может быть представлен в виде

стандартной лекарственной формы, например, в ампулах или многодозовых контейнерах с консервантом.

Доза может быть основана на количестве средства на килограмм веса тела субъекта (например, подлежащего иммунизации субъекта или подлежащего лечению субъекта). Доза средства (например, антитела) находится в диапазоне 10-3000 мг/кг, например 100-2000 мг/кг, например 300-500 мг/кг/сутки в течение 1-10 или 1-5 дней, например 400 мг/кг/сутки в течение 3-6 дней, например 1 г/кг/сутки в течение 2-3 дней.

Субъекты

Представлена композиция для применения в лечении или профилактике состояния, раскрытого в данном документе, такого как инфекция, вызванная коронавирусом. Композицию можно вводить субъекту (например, подлежащему иммунизации субъекту или подлежащему лечению субъекту), у которого имеется коронавирусная инфекция или ассоциированное заболевание или состояние. Композицию можно вводить в качестве профилактического средства субъектам (например, подлежащим иммунизации субъектам или подлежащим лечению субъектам) с предрасположенностью к коронавирусной инфекции или восприимчивостью к ассоциированному состоянию или заболеванию с целью снижения вероятности возникновения инфекции, заболевания или состояния или снижения степени тяжести инфекции, заболевания или состояния.

Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может представлять собой субъекта, который является инфицированным коронавирусом. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может представлять собой субъекта, который получил положительный результат теста на коронавирус. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может представлять собой субъекта, который подвергся воздействию коронавируса. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может представлять собой субъекта, который потенциально подвергался воздействию коронавируса. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может представлять собой субъекта, который демонстрирует один или несколько признаков и/или симптомов, соответствующих инфицированию коронавирусом.

В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) представляет собой субъекта, который подвержен высокому риску контакта с коронавирусом по настоящему изобретению. Например, субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или

подлежащий лечению субъект) может представлять собой работника системы здравоохранения, работника лаборатории или сотрудника экстренной службы, который с большей вероятностью вступит в контакт с коронавирусом (например, SARS-CoV2) по настоящему изобретению. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или

5 подлежащий лечению субъект) может работать в медицинском учреждении, например в больнице, клинике врача общей практики, стационарном лечебном учреждении, амбулаторном лечебном учреждении, учреждении неотложной помощи, доме престарелых, учреждении по уходу за престарелыми или учреждении по уходу за престарелыми с медицинским обслуживанием.

10 В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) представляет собой субъекта, который подвержен высокому риску развития осложнений в случае инфицирования коронавирусом по настоящему изобретению. Например, субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может характеризоваться

15 наличием сопутствующего заболевания, возрастом старше 50 лет, наличием сахарного диабета типа 1, наличием сахарного диабета типа 2, наличием инсулинорезистентности или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта с ослабленным иммунитетом. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект)

20 получает лечение иммуносупрессивными лекарственными средствами. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) представляет собой реципиента трансплантата, который получает лечение иммуносупрессивными лекарственными средствами. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или

25 подлежащий лечению субъект) получает терапию по поводу рака, например химиотерапию, которая может ослаблять функцию иммунной системы.

Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может представлять собой млекопитающее. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может представлять собой

30 человека. Субъект (например, подлежащий иммунизации субъект или подлежащий лечению субъект) может представлять собой животное, отличное от человека. Животное, отличное от человека, может представлять собой сельскохозяйственное животное, например корову, свинью, овцу, лошадь или козу; домашнего питомца, например кошку или собаку; или животное зоопарка, например представителя семейства кошачьих.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предполагают ограничение объема настоящего изобретения.

Пример 1. Конструкции кольцевой РНК

5 В данном примере описана разработка новых открытых рамок считывания (ORF) и конструкций circRNA SARS-CoV-2.

В данном примере ORF SARS-CoV-2 и конструкции кольцевой РНК, кодирующей ORF SARS-CoV-2, разрабатывали, как описано в таблице 2.

Пример 2. Получение кольцевых РНК, кодирующих антигены SARS-CoV-2, *in vitro*

10 В данном примере продемонстрировано получение кольцевых РНК *in vitro*.

Кольцевые РНК разрабатывали таким образом, чтобы они содержали IRES, ORF, кодирующую антиген, представляющий собой модифицированный шиповидный белок SARS-CoV-2, или антиген, представляющий собой RBD (как описано в **примере 1**), и два спейсерных элемента, фланкирующие IRES-ORF. Циркуляризация обеспечивает трансляцию по типу "катящегося кольца", несколько ORF с переменными сдвигающими элементами для дискретной экспрессии ORF и регулируемого белкового стехиометрического соотношения, а также IRES, который нацеливается на РНК для посадки рибосомы. Иллюстративное графическое изображение кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую антиген коронавируса, показано на фиг. 1.

15
20

В данном примере образование кольцевых РНК обеспечивали следующим образом. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищали с помощью системы для очистки РНК (New England Biolabs, Inc.), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью системы для очистки РНК. Обработанную с помощью RppH линейную РНК подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта. В качестве альтернативы или дополнения к обработке с помощью 5'-RppH РНК транскрибировали в условиях с избытком GMP относительно GTP.

25
30

Лигирование с помощью шунта выполняли следующим образом: образование кольцевой РНК обеспечивали посредством обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта (5'-GTTTTTCGGCTATTCCCAATAGCCGTTTTG-3') (SEQ ID NO: 47) с применением ДНК-лигазы 1 T4 (New England Bio, Inc., M0437M). Для очистки кольцевых РНК смеси для лигирования разделяли в 4% денатурирующем геле для PAGE, и РНК,

соответствующие каждой из кольцевых РНК, вырезали. Вырезанные фрагменты геля с РНК измельчали, и РНК элюировали с помощью буфера для элюирования из геля (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA) в течение одного часа при 37°C. Элюированный буфер собирали, и РНК элюировали снова посредством добавления буфера для элюирования из геля к измельченному гелю и инкубировали в течение одного часа. Остатки геля удаляли с помощью центрифужных фильтров, и РНК осаждали этанолом. Электрофорез в агарозном геле применяли в качестве измерения для контроля качества для валидации чистоты и циркуляризации. Дополнительно или в качестве альтернативы кольцевые РНК очищали с применением колоночной хроматографии.

10 **Пример 3: Конструкции мРНК**

В данном примере описана разработка новых конструкций мРНК, кодирующей ORF SARS-CoV-2.

В данном примере конструкции линейной РНК, кодирующей ORF SARS-CoV-2, разрабатывали, как описано в таблице 3.

15 **Пример 4. Получение мРНК, кодирующих антигены SARS-CoV-2, *in vitro***

В данном примере продемонстрировано получение мРНК *in vitro*.

В данном примере мРНК разрабатывали с ORF, кодирующей антиген, представляющий собой модифицированный шиповидный белок SARS-CoV-2, или RBD, как описано в **примере 3**.

20 В данном примере модифицированную мРНК получали посредством транскрипции *in vitro*. РНК была полностью замещена с помощью псевдоуридина и 5-метил-С, кэпирована с помощью CleanCap™ AG, содержала 5'- и 3'-UTR альфа-глобина человека и была полиаденилирована. мРНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфер (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали с помощью этанола и повторно
25 суспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, номер по каталогу AM7000). Электрофорез в агарозном геле применяли в качестве измерения для контроля качества для валидации чистоты и циркуляризации.

Пример 5. Экспрессия секретлируемого антигена SARS-CoV-2 из кольцевой РНК в клетках млекопитающего

30 В данном примере продемонстрирована возможность экспрессии вирусных антигенов из кольцевой РНК в клетках млекопитающего.

В данном примере кольцевые РНК, кодирующие антигены, представляющие собой RBD SARS-CoV-2, разрабатывали, и получали, и очищали посредством способов, описанных в данном документе.

Экспрессию кольцевой РНК, кодирующей RBD, проверяли посредством иммунопреципитации в сочетании с вестерн-блотом (IP-вестерн). Вкратце, кольцевой РНК, кодирующей RBD (0,1 пикомоль) трансфицировали фибробласты VJ и клетки HeLa (10000 клеток на лунку в 96-луночном планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015). MessengerMax отдельно использовали в качестве контроля. Надосадочную жидкость собирали через 24 часа и выполняли иммунопреципитацию с использованием кроличьего антитела, специфического в отношении гликопротеина RBD-шиповидный белок SARS-CoV-2 (Sino Biologicals, № по кат.: 40592-T62), в сочетании с Dynabeads, покрытыми белком G (Invitrogen, 10003D), и то же антитело применяли для выявления продуктов иммунопреципитации, разделенных с помощью PAGE. Иммунопреципитацию рекомбинантного RBD (42 нг) применяли в качестве контроля и для количественного определения экспрессии белка в клетке. Мембранную хемилюминесценцию количественно определяли с применением программного обеспечения для количественного анализа результатов вестерн-блота Image Studio™ Lite (Li-COR Biosciences).

Антиген, представляющий собой RBD, кодируемый кольцевой РНК, выявляли в надосадочных жидкостях фибробластов VJ и клеток HeLa и не выявляли в контролях (фиг. 3).

В данном примере показано, что антигены, представляющие собой RBD SAR-CoV-2 (которые представляют собой секретируемые белки), экспрессировались из кольцевой РНК в клетках млекопитающего.

Пример 6. Экспрессия несекретируемого антигена SARS-CoV-2 из РНК в клетках млекопитающего

В данном примере кольцевую РНК или мРНК, кодирующую антигены, представляющие собой шиповидные белки SARS-CoV-2, разрабатывали, и получали, и очищали посредством способов, описанных в данном документе. Кольцевые РНК и мРНК составляют в MessengerMax и с помощью 0,1 пикомоль кольцевой РНК трансфицируют клетки HEK293 (10000 клеток на лунку) в соответствии с инструкциями производителя.

Экспрессию антигена, представляющего собой шиповидный белок, измеряют с применением ELISA, специфического в отношении антигена, представляющего собой шиповидный белок SARS-CoV-2, через 24, 48 и 72 часа. Для измерения уровня экспрессии клетки подвергают лизису в каждой лунке в подходящий момент времени с применением буфера для лизиса и ингибитора протеазы. Клеточный лизат извлекают и центрифугируют при 12000 об./мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость собирают. В данном

примере применяют набор для сэндвич-ELISA для выявления антигена, представляющего собой шиповидный белок SARS-CoV-2 2019 (SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Detection ELISA Kit, Sino Biological, KIT40591), в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 7. Составление РНК для введения животному, отличному от человека

5 В данном примере кольцевую РНК или мРНК, кодирующую антигены, представляющие собой RBDSARS-CoV-2, разрабатывали, и получали, и очищали посредством способов, описанных в данном документе.

После очистки кольцевую РНК или мРНК составляли следующим образом.

10 А. Кольцевую РНК или мРНК разбавляли в PBS до конечной концентрации 2,5 или 25 пикомоль в 50 мкл с получением препарата на основе кольцевой РНК или препарата на основе линейной РНК (несоставленного).

15 В. Кольцевую РНК или мРНК составляли с липидным носителем (например, TransIT (Mirus Bio)) и реагентом для повышения эффективности трансфекции с помощью мРНК (Mirus Bio) в соответствии с инструкциями производителя (15% TransIT, 5% реагента для повышения эффективности трансфекции) с получением конечной концентрации РНК 2,5 или 25 пикомоль в 50 мкл с получением препарата на основе кольцевой РНК или препарата на основе линейной РНК.

20 С. Кольцевую РНК или мРНК составляли с катионным полимером (например, протамином). Вкратце, кольцевую РНК или мРНК разбавляли в чистой воде. Протаминсульфат растворяли в растворе Рингера с лактатом (4000 нг/мкл). При одновременном перемешивании раствор протамин в растворе Рингера с лактатом добавляли к половине раствора кольцевой РНК или мРНК до тех пор, пока весовое соотношение РНК:протамин не составляло 2:1. Раствор перемешивали в течение еще 10 минут для обеспечения образования стабильных комплексов. Затем добавляли оставшуюся 25 кольцевую РНК или мРНК (т. е. оставшуюся кольцевую РНК к раствору кольцевой РНК, оставшуюся мРНК к раствору мРНК) и раствор перемешивали в течение непродолжительного времени. Конечную концентрацию смеси (т. е. смеси кольцевой РНК или смеси мРНК) регулировали с применением раствора Рингера с лактатом с получением 30 препарата на основе кольцевой РНК или препарата на основе линейной РНК с конечной концентрацией РНК, составляющей 2,5 или 25 пикомоль на 50 мкл.

Д. Кольцевую РНК или мРНК составляли с липидной наночастицей. Вкратце, кольцевую РНК или мРНК разбавляли в 25 мМ ацетатного буфера с рН=4 (профильтрованного через фильтр с размером пор 0,2 мкм) до концентрации 0,2 мкг/мкл. Липидные наночастицы (LNP) составляли посредством предварительного растворения

ионизируемого липида (например, ALC0315), холестерина, DSPC и DMG-PEG2000 в этаноле (профильтрованном через стерилизующий фильтр с размером пор 0,2 мкм) при молярном соотношении 50/38,5/10/1,5 мол. %. Конечное весовое соотношение ионизируемый липид/РНК составляло 8/1 вес/вес. Растворы липида и РНК смешивали в чипе-микромиксере с применением микрофлюидной системы при соотношении скоростей потока буфер/этанол 3/1 и общей скорости потока 1 мл/мин. Затем LNP подвергали диализу в PBS pH=7,4 в течение 3 ч с удалением этанола. Концентрацию РНК внутри LNP и эффективность инкапсуляции измеряли с применением анализа на основе Ribogreen. При необходимости LNP концентрировали до требуемой концентрации РНК с применением центрифужных фильтров Amicon с отсечкой по 100 кДа. Размер, концентрацию и заряд частиц измеряли с применением Zetasizer Ultra (Malvern Pananalytical). Концентрацию РНК регулировали с помощью PBS с получением конечной концентрации, составляющей 0,1 или 0,2 мкг/мкл. В случае составов, содержащих две последовательности РНК, РНК смешивали либо до составления с LNP, либо после того, как каждую РНК составляли по отдельности. В случае экспериментов *in vivo* конечные РНК, составленные в LNP, фильтровали через стерилизующие фильтры из восстановленной целлюлозы с размером пор 0,2 мкм.

Пример 8. Введение РНК животному, отличному от человека

В данном примере мыши получали инъекции объемом 50 мкл каждого из препарата на основе кольцевой РНК или препарата на основе линейной РНК посредством либо однократной внутримышечной инъекции в заднюю конечность, либо однократной внутрикожной инъекции в область спины.

Пример 9. Выявление секретируемого антигена в крови

У каждой мыши собирают образцы крови (~25 мкл) для анализа посредством забора крови из подскуловой области. Кровь собирают в пробирки с EDTA через 0, 6 часов, 24, 48 часов и 7 дней после введения дозы кольцевой РНК. Плазму крови отделяют посредством центрифугирования в течение 30 минут при 1300 g при 4°C. Экспрессию секретируемого антигена оценивают с применением ELISA или вестерн-блота, например, в случае с антигеном, представляющим собой RBD – с применением способов, описанных в **примере 5**.

Пример 10. Выявление антител к антигену

В данном примере описан способ определения наличия антител к антигену.

ELISA применяют, как описано Chen X et al. (*medRxiv*, doi: doi.org/10.1101/2020.04.06.20055475 (2020)). Вкратце, белком SARS-CoV-2 в 100 мкл PBS на лунку покрывают планшеты для ELISA в течение ночи при 4°C. Затем планшеты для

ELISA блокируют в течение 1 часа с помощью блокирующего буфера (5% FBS с 0,05% Tween 20). Затем в каждую лунку добавляют 10-кратно разбавленную плазму крови в 100 мкл блокирующего буфера на 1 час. После промывки с помощью 1X фосфатно-солевого буфера с детергентом Tween[®] (PBST) связанные антитела инкубируют с антителом выявления к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Invitrogen), в течение 30 мин с последующей промывкой с помощью PBST, затем PBS и добавлением тетраметилбензола. В планшете для ELISA обеспечивают протекания реакции в течение 5 мин и затем гасят с помощью 1 М останавливающего буфера на основе HCl. Значение оптической плотности (OD) определяют при 450 нм.

10 **А. Для антител к антигену, представляющему собой RBD SARS-CoV-2,** используемый белок SARS-CoV-2 представляет собой RBD SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40592-V08B).

15 **В. Для антител к антигену, представляющему собой шиповидный белок SARS-CoV-2,** используемый белок SARS-CoV-2 представляет собой шиповидный белок SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40591-V08H)

Пример 11. Оценка нейтрализующих антител к SARS-CoV-2

Анализ нейтрализации вируса SARS-CoV-2 применяют для проверки нейтрализующей способности антител в отношении инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Пример такого анализа описан Okba NMA et al. (*Emerg Infect Dis.*, doi: 10.3201/eid2607.200841 (2020)). В ходе данного анализа выявляют выработку антител, которые функционально ингибируют вирусную инфекцию, что демонстрируется в виде уменьшения числа вирусных бляшек. Незначительные вариации данного анализа описаны в работе Gauger PC и Vincent AL (*в Animal Influenza Virus: Methods and Protocols*, 3-е издание, под ред. E. Spackman, стр. 311-320 (2014)) и Wilson HL et al. (*J. Clin. Microbiol.*, 25 55(10):3104-3112 (2017)). Вкратце, в ходе анализа нейтрализации вируса SARS-CoV-2 определяют нейтрализующую способность плазмы крови, содержащей антитела к SARS-CoV-2, вырабатываемые в организме мышей в ответ на иммунизацию с помощью кольцевой РНК, кодирующей антигена SARS-CoV-2. Плазму крови от наивных мышей, которые получали инъекцию только среды-носителя (без кольцевой РНК), применяли в 30 качестве контроля.

Пример 12. Иммуногенность антигенов, представляющих собой RBD SARS-CoV-2, в мышинной модели

Иммуногенность кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, составленной с катионным полимером (например, протамином),

оценивали в мышинной модели. Выработку антител к антигену, представляющему собой RBD SARS-CoV-2, составленному с катионным полимером, также оценивали в мышинной модели.

В данном примере кольцевую РНК разрабатывали с IRES и ORF, кодирующей
5 антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, посредством способов, описанных в
данном документе. Немодифицированную линейную РНК синтезировали посредством
транскрипции *in vitro* с избытком гуанозин-5'-монофосфата с применением РНК-
полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищали с помощью системы
для очистки РНК (New England Biolabs, Inc.) в соответствии с инструкциями производителя.
10 Очищенную линейную РНК подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта.

Образование кольцевой РНК обеспечивали посредством лигирования с помощью
шунта следующим образом: Транскрибированную линейную РНК и ДНК-шунт (5'-
GTTTTTCGGCTATTCSSAATAGCCGTTTTG-3') (SEQ ID NO: 47) смешивали, и отжигали,
и обрабатывали РНК-лигазой. Для очистки кольцевых РНК смеси для лигирования
15 разделяли посредством обращенно-фазовой хроматографии. Кольцевую РНК селективно
элюировали из линейной РНК посредством увеличения содержания органических веществ
в подвижной фазе. Элюированную РНК собирали в виде фракций и анализировали в
отношении чистоты кольцевой РНК. Выбранные фракции объединяли и подвергали замене
буфера с удалением солей подвижной фазы и растворителей. Электрофорез в
20 акриламидном геле применяли в качестве измерения для контроля качества для валидации
чистоты и циркуляризации.

Очищенную кольцевую РНК разбавляли в чистой воде до концентрации
1100 нг/мкл. Протаминсульфат растворяли в растворе Рингера с лактатом (4000 нг/мкл).
При одновременном перемешивании раствор протамина в растворе Рингера с лактатом
25 добавляли к половине раствора кольцевой РНК до тех пор, пока весовое соотношение
РНК:протамин не составляло 2:1. Раствор перемешивали в течение еще 10 минут для
обеспечения образования стабильных комплексов. Затем добавляли оставшуюся
кольцевую РНК (т. е. оставшуюся кольцевую РНК к раствору кольцевая РНК:протамин) и
раствор перемешивали в течение непродолжительного времени. Конечную концентрацию
30 смеси (т. е. смеси кольцевой РНК) регулировали с применением раствора Рингера с
лактатом с получением препарата на основе кольцевой РНК с конечной концентрацией
РНК, составляющей 2 мкг или 10 мкг РНК в 50 мкл.

Три мыши в каждой группе вакцинировали внутримышечно или внутрикожно с
помощью препарата на основе кольцевой РНК в дозе 2 мкг или 10 мкг или контроля,

представляющего собой среду-носитель в виде протамина, в день 0 и день 21. Адьювант Addavax™ (Invivogen) вводили однократно каждой мыши внутримышечно или внутрикожно через 24 часа после введения препарата на основе кольцевой РНК в день 0 и день 21. Адьювант Addavax™ вводили в виде 50% раствора в 1X PBS в объеме 50 мкл в соответствии с инструкциями производителя.

Сбор крови у каждой мыши осуществляли посредством забора крови из подскуловой области. Кровь собирали в сухие пробирки без антикоагулянта в день 7, 14, 21, 23, 28, 35, 41, 49, 56, 63, 69, 77, 84, 108 и 115 после введения дозы кольцевой РНК. Сыворотку крови отделяли от цельной крови посредством центрифугирования при 1200 g в течение 30 минут при 4°C. Сыворотка крови была термоинактивирована посредством нагревания при 56°C в течение 1 часа. Отдельные термоинактивированные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия RBD-специфического IgG посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96-луночные, Nunc) покрывали с помощью RBD SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40592-V08B; 100 нг) в 100 мкл PBS на ночь при 4°C. Затем планшеты блокировали на 1 час с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% FBS и 0,05% Tween 20). Затем разбавления сыворотки крови добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-солевого буфера с детергентом Tween® (TBS-T) планшеты инкубировали с антителом выявления к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Jackson 115-035-071), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, после чего добавляли тетраметилбензол (Pierce 34021). В планшете для ELISA обеспечивали протекания реакции в течение 5 мин и затем гасили с помощью 2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (OD) определяли при 450 нм.

Значение оптической плотности для каждого образца сыворотки крови делили на таковое для фона (планшетов, покрытых с помощью RBD, инкубированных только со вторичным антителом). Для каждого образца кратность изменения показателей по сравнению с фоном наносили на график.

Результаты показывали, что антитела к RBD были получены в дни 14, 21, 23, 28, 35, 41, 49, 56, 63, 69, 77, 84, 108 и 115 после инъекции препаратов на основе кольцевой РНК (фиг. 4). После инъекции среды-носителя в виде протамина антитела к RBD не получали. Данные результаты также показывали, что кольцевая РНК, кодирующая антиген, представляющий собой RBD, индуцировала антигенспецифический иммунный ответ у мышей.

Сходный ELISA применяли для анализа образцов сыворотки крови в отношении IgG, специфического в отношении шиповидного белка. Планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96-луночные, Nunc) покрывали с помощью шиповидного белка SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40589-V08B1; 100 нг) в 100 мкл PBS на ночь при 4°C. Затем планшеты
5 блокировали на 1 час с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% FBS и 0,05% Tween 20). Затем разбавления сыворотки крови добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-солевого буфера с детергентом Tween® (TBS-T) планшеты инкубировали с антителом выявления к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Jackson 115-
10 035-071), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, после чего добавляли тетраметилбензол (Pierce 34021). В планшете для ELISA обеспечивали протекания реакции в течение 5 мин и затем гасили с помощью 2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (OD) определяли при 450 нм.

Результаты показывали, что антитела к шиповидному белку получали через 35 дней
15 после инъекции препаратов на основе кольцевой РНК (фиг. 5). После инъекции среды-носителя антитела к шиповидному белку не получали.

Антитела в сыворотке крови в день 14 после введения дозы характеризовали с применением анализа для измерения относительного уровня изоформа IgG1 по сравнению с изоформой IgG2a (фиг. 6), и способность антител в сыворотке крови нейтрализовать вирус
20 характеризовали с применением анализа нейтрализации PRNT. Результаты показывали, что eRNA RBD, вводимая внутримышечно в дозе 2 мкг, с адьювантом обладала нейтрализующей способностью.

Пример 13. Модулирование получения люциферазы Gaussia из кольцевой РНК у мышей *in vivo* с применением заданной по времени доставки адьюванта

25 В данном примере продемонстрирована экспрессия белков из кольцевой РНК *in vivo* при одновременной доставке адьюванта для стимуляции иммунного ответа.

В данном примере кольцевую РНК разрабатывали с IRES и ORF, кодирующей полипептид люциферазы Gaussia (GLuc). В данном примере кольцевые РНК получали и очищали посредством способов, описанных в данном документе. Кольцевые РНК
30 составляли, как описано в **примере 7**, с получением препаратов на основе кольцевой РНК (например, составленных с TransIT, составленных с протаминам, составленных с PBS/несоставленных). Мышам внутримышечно вводили каждый препарат на основе кольцевой РНК, как описано в **примере 8**.

Для стимуляции иммунного ответа адъювант Addavax™ (Invivogen), который представляет собой наноэмульсию типа масло-в-воде на основе сквалена с составом, сходным с адъювантом MF59®, вводили в заднюю конечность мыши в момент времени 0 часов (одновременная доставка с препаратом на основе кольцевой РНК) или в момент
5 времени 24 часа. Адъювант Addavax™ вводили в объеме 50 мкл в соответствии с инструкциями производителя.

У каждой мыши собирали образцы крови (~25 мкл) посредством забора крови из подскуловой области. Кровь собирали в пробирки с EDTA через 0, 6, 24 и 48 часов после введения дозы кольцевой РНК. Плазму крови отделяли с помощью центрифугирования в
10 течение 30 минут при 1300 g при 4°C, и активность люциферазы *Gaussia*, секретируемого фермента, тестировали с применением анализа активности люциферазы *Gaussia* (Thermo Scientific Pierce). 50 мкл 1x субстрата GLuc добавляли к 5 мкл плазмы крови для осуществления анализа активности люциферазы GLuc. Планшеты прочитывали непосредственно после смешивания на люминометрическом приборе (Promega).

В данном примере продемонстрирована успешная экспрессия белка из кольцевой РНК *in vivo* в течение продолжительных промежутков времени с применением: (a) внутримышечной инъекции составленных с TransIT, составленных с протамином и несоставленных препаратов на основе кольцевой РНК без адъюванта (**фиг. 7**), а также при доставке адъюванта в моменты времени 0 и 24 ч (**фиг. 8**); и (b) внутрикожной инъекции
20 составленного с протамином препарата на основе кольцевой РНК без адъюванта, а также при доставке адъюванта в момент времени 24 ч (**фиг. 9**).

Пример 14. Введение РНК, кодирующей антигена SARS-CoV-2, трансхромосомному (Тс) крупному рогатому скоту

В данном примере описано получение полностью человеческих нейтрализующих
25 поликлональных антител к антигену коронавируса у млекопитающих, отличных от человека, с гуманизированной иммунной системой, с использованием кольцевой РНК, кодирующей антиген коронавируса.

В данном примере кольцевую РНК или мРНК, кодирующую антигена SARS-CoV-2, разрабатывали, и получали, и очищали посредством способов, описанных в данном
30 документе.

В данном примере в одном подходе РНК составлена, как описано в **примере 7** (например, составлена с липидным носителем (например, TransIT), составлена с катионным полимером (например, протамином) или является несоставленной), с получением первого набора препаратов на основе кольцевой РНК или первого набора препаратов на основе

линейной РНК. Во втором подходе адъювант Addavax™ (Invivogen), адъювант MF59®, полный адъювант Фрейнда, AS03 или состав на основе запатентованного адъюванта компании SAB (SAB-adj-1) составляют со смесью РНК-липидный носитель или несоставленным препаратом на основе РНК (например, препаратом на основе кольцевой РНК или препаратом на основе линейной РНК), как описано в работе Beigel JH et al. (*Lancet Infect. Dis.*, 18: 410-418 (2018)), с получением второго набора препаратов на основе кольцевой РНК или второго набора препаратов на основе линейной РНК с конечной концентрацией РНК, составляющей 25 пикомоль в 100 мкл. Для каждого подхода обеспечивают образование общего объема, составляющего 8 мл, что соответствует 2 наномоль кольцевой РНК или линейной РНК. Кольцевую РНК или линейную РНК составляют с получением препаратов на основе кольцевой РНК или препаратов на основе линейной РНК незадолго до осуществления инъекции животным.

В данном примере крупный рогатый скот Тс иммунизируют с помощью препаратов на основе кольцевой РНК (т. е. первого препарата на основе кольцевой РНК или второго препарата на основе кольцевой РНК), препаратов на основе линейной РНК (т. е. первого препарата на основе линейной РНК или второго препарата на основе линейной РНК) или контроля, представляющего собой отдельно среду-носитель (т. е. контроля без РНК), путем внутримышечной или внутрикожной инъекции.

А. Внутримышечная инъекция. В общей сложности 4 инъекции осуществляют в каждый момент времени в следующие участки: одну инъекцию объемом 2 мл (каждая) в каждую заушную область; и одну инъекцию объемом 2 мл (каждая) в каждую боковую область шеи.

В. Внутрикожная инъекция. В общей сложности 4 инъекции осуществляют в каждый момент времени в следующие участки: четыре инъекции объемом 2 мл в отдельные участки на границе шея-плечо.

Используют в общей сложности 8 моментов времени: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 21 неделя.

Если вводят первый набор препаратов на основе РНК (например, препаратов на основе кольцевой РНК или препаратов на основе линейной РНК), адъювант Addavax™ (Invivogen), адъювант MF59®, полный адъювант Фрейнда, AS03 или SAB-adj-1 компании SAB вводят по отдельности рядом (1-2 см) с каждым участком инъекции (всего 2 мл) в первые 3 момента времени. Перед первой инъекцией (V1) объем плазмы крови до инъекции собирают от каждого представителя крупного рогатого скота Тс для использования в качестве отрицательного контроля. Образцы крови, составляющие не более 2,1% веса тела представителя крупного рогатого скота, собирают путем прокола яремной вены в дни 8, 9,

10, 11, 12 и 14 после инъекции в каждый момент времени и в дополнительный момент времени, 60 дней, после заключительной инъекции. Плазму крови собирают с применением автоматизированной системы для плазмафереза (Baxter Healthcare, Autopheresis C Model 200). Затем подтверждают наличие антигенспецифических антител в плазме крови с применением ELISA на основе антигена. Человеческие поликлональные антитела очищают от плазмы крови с применением способа очистки Кона-Онкли и каприлатного фракционирования для антигенспецифических поликлональных антител, как описано ниже в примере 21).

5
10 **Пример 15. Выявление секретируемого антигена, экспрессируемого из кольцевой РНК, введенной крупному рогатому скоту Тс**

Для выявления экспрессии антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, секретируемого белка, из кольцевой РНК образцы крови, составляющие не более 2,1% веса тела крупного рогатого скота, собирают путем прокола яремной вены в дни 1, 3, 5, 7, 14 и 21 после инъекции. Плазму крови собирают с применением автоматизированной системы для плазмафереза (Baxter Healthcare, Autopheresis C Model 200). Затем подтверждают экспрессию антигенов, представляющих собой RBD SARS-CoV-2, в плазме крови. Экспрессию антигена, представляющего собой RBD, оценивают, как описано в примере 5. Для данных анализов применяют антитело выявления к IgG человека, конъюгированное с HRP (Invitrogen).

15
20 **Пример 16. Выявление несекретируемого антигена, экспрессируемого из кольцевой РНК, вводимой крупному рогатому скоту Тс**

Для выявления экспрессии антигена, представляющего собой шиповидный белок SARS-CoV-2, несекретируемого белка, из кольцевой РНК ткани собирают для анализа экспрессии белка. Через 0, 2, 5, 7 и 21 день после введения дозы представителя крупного рогатого скота Тс умерщвляют и собирают печень, селезенку и мышечную ткань (из участка инъекции). Экспрессию антигена, представляющего собой шиповидный белок, оценивают, как описано в примере 6, на основании белка, экстрагированного из каждой ткани. В данных ELISA антитело выявления к IgG человека, конъюгированное с HRP (Invitrogen), применяют вместо антитела выявления к IgG мыши, конъюгированного с HRP.

25
30 **Пример 17. Получение человеческих поликлональных антител, специфических в отношении антигенов SARS-CoV-2, из кольцевой РНК, вводимой крупному рогатому скоту Тс**

Для определения наличия антител к антигенам SARS-CoV-2 образцы крови, составляющие не более 2,1% веса тела субъекта, являющегося представителем крупного

рогатого скота, собирают путем прокола яремной вены в дни 8, 9, 10, 11, 12, 14, 20, 40 и 60 после инъекции. Плазму крови собирают с применением автоматизированной системы для плазмафереза (Baxter Healthcare, Autopheresis C Model 200). Затем подтверждают наличие антигенспецифических антител в плазме крови. Наличие антител к антигенам SARS-CoV-2 определяют, как описано в **примере 10**. В ходе данных анализов применяют антитело выявления к IgG человека, конъюгированное с HRP (Invitrogen).

Пример 18. Получение человеческих нейтрализующих поликлональных антител к SARS-CoV-2 из кольцевой РНК, вводимой крупному рогатому скоту Тс

Образцы крови, составляющие не более 2,1% веса тела субъекта, являющегося представителем крупного рогатого скота, собирают путем прокола яремной вены в дни 8, 9, 10, 11, 12 и 14 после инъекции в каждый момент времени и в дополнительный момент времени, 60 дней, после заключительной инъекции. Плазму крови собирают с применением автоматизированной системы для плазмафереза (Baxter Healthcare, Autopheresis C Model 200). Затем подтверждают наличие антигенспецифических антител в плазме крови. Анализ нейтрализации вируса SARS-CoV-2 выполняют для определения нейтрализующей способности антител в плазме крови, как описано в **примере 11**.

Пример 19. Введение РНК, кодирующей антигены SARS-CoV-2, трансхромосомному (Тс) крупному рогатому скоту с введением адьюванта

В данном примере кольцевую РНК или мРНК, кодирующую антигены SARS-CoV-2, разрабатывали, получали и очищали посредством способов, описанных в данном документе.

Кольцевую РНК и мРНК составляют с адьювантом или без него следующим образом.

А. РНК (например, кольцевую РНК или мРНК) и адьювант вводят независимо друг от друга. РНК составлена, как описано в **примере 7** (например, составлена с липидным носителем (например, TransIT), составлена с катионным полимером (например, протамином) или является несоставленной), с получением препаратов на основе кольцевой РНК или препаратов на основе линейной РНК. Конечная концентрация РНК составляет 25 пикомоль в 100 мкл. Обеспечивают образование общего объема, составляющего 8 мл, что соответствует 2 наномоль кольцевой РНК или мРНК. Кольцевую РНК или мРНК составляют незадолго до осуществления инъекции животным. Для в общей сложности 8 инъекций составляют кольцевую РНК или мРНК с общим объемом 64 мл. В данном примере представителей крупного рогатого скота Тс иммунизируют с помощью препаратов на основе кольцевой РНК, препаратов на основе линейной РНК или контроля,

представляющего собой отдельно среду-носитель (т. е. контроля без РНК), путем внутримышечной или внутривожной инъекции.

(i) Внутримышечная инъекция. В общей сложности 4 инъекции осуществляют в каждый момент времени в следующие участки: одну инъекцию объемом 2 мл (каждая) в каждую заушную область; и одну инъекцию объемом 2 мл (каждая) в каждую заднюю конечность.

(ii) Внутривожная инъекция. В общей сложности 4 инъекции осуществляют в каждый момент времени в следующие участки: 4 инъекции объемом 2 мл в отдельные участки на границе шея-плечо.

Используют в общей сложности 8 моментов времени: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 21 неделя. Адьювант Addavax™ (Invivogen), адьювант MF59®, полный адьювант Фрейнда, AS03 или состав на основе запатентованного адьюванта компании SAB (SAB-adj-1) вводят рядом (1-2 см) с каждым участком вакцинации (всего 2 мл) в первые 3 момента времени.

В. РНК (например, кольцевую РНК или мРНК) и адьювант вводят совместно.

РНК составлена, как описано в **примере 7** (например, составлена с липидным носителем (например, TransIT), составлена с катионным полимером (например, протамином) или является несоставленной). Затем адьювант Addavax™ (Invivogen), адьювант MF59®, полный адьювант Фрейнда, AS03 или состав на основе запатентованного адьюванта компании SAB (SAB-adj-1) составляют с составом РНК-носитель, составом РНК-полимер или несоставленной РНК, как описано в работе Beigel JH et al. (*Lancet Infect. Dis.*, 18: 410-418 (2018)), с получением препаратов на основе кольцевой РНК или препаратов на основе линейной РНК с конечной концентрацией РНК, составляющей 25 пикомоль в 100 мкл. Обеспечивают образование общего объема, составляющего 8 мл, что соответствует 2 наномоль РНК. Кольцевую РНК и мРНК составляют незадолго до осуществления инъекции животным. Для в общей сложности 8 инъекций составляют кольцевую РНК с общим объемом 64 мл и мРНК с общим объемом 64 мл.

В данном примере представителей крупного рогатого скота Тс иммунизируют с помощью препаратов на основе кольцевой РНК, препаратов на основе линейной РНК или контроля, представляющего собой отдельно среду-носитель (т. е. контроля без РНК), путем внутримышечной или внутривожной инъекции.

А. Внутримышечная инъекция. В общей сложности 4 инъекции осуществляют в каждый момент времени в следующие участки: одну инъекцию объемом 2 мл (каждая) в каждую заушную область; и одну инъекцию объемом 2 мл (каждая) в каждую заднюю конечность.

В. Внутривенная инъекция. В общей сложности 4 инъекции осуществляют в каждый момент времени в следующие участки: 4 инъекции объемом 2 мл в отдельные участки на границе шея-плечо.

Пример 20. Получение нейтрализующих поликлональных антител, специфических в отношении SARS-CoV-2, из кольцевой РНК у представителей подсемейства козьих Tc

В данном примере кольцевую РНК или мРНК, кодирующую антигены SARS-CoV-2, разрабатывали, получали и очищали посредством способов, описанных в данном документе.

Кольцевая РНК и мРНК составлены, как описано в **примере 7** (например, составлены с липидным носителем (например, TransIT), составлены с катионным полимером (например, протамином) или являются несоставленными), с получением препаратов на основе кольцевой РНК или препаратов на основе линейной РНК. Конечная концентрация РНК составляет 25 пикомоль в 100 мкл. Обеспечивают образование общего объема, составляющего 1 мл, что соответствует 0,25 наномоль кольцевой РНК или 0,25 наномоль мРНК. Кольцевую РНК и мРНК составляют с получением препаратов на основе кольцевой РНК и препаратов на основе линейной РНК незадолго до осуществления инъекции животным. Для в общей сложности 4 инъекций составляют кольцевую РНК с общим объемом 4 мл и линейную РНК с общим объемом 4 мл.

В данном примере используют трансхромосомных коз (представителей подсемейства козьих Tc), где искусственная хромосома человека (HAC), содержащая репертуар генов человеческого иммуноглобулина (Ig) в конфигурации зародышевой линии, была включена в состав генов домашней козы. У представителей подсемейства козьих Tc человеческие поликлональные антитела вырабатываются в их сыворотке крови (см. Wu H et al. (*Sci Rep*, 9(1): 366, doi: doi.org/10.1038/s41598-018-36961-5 (2019)).

В данном примере представителей подсемейства козьих Tc иммунизируют с помощью препаратов на основе кольцевой РНК, препаратов на основе линейной РНК или контроля, представляющего собой отдельно среду-носитель (т. е. контроля без РНК), путем внутримышечной или внутривенной инъекции.

А. Внутримышечная инъекция. В общей сложности 2 инъекции осуществляют в каждый момент времени в следующие участки: одну инъекцию объемом 0,5 мл (каждая) в каждую боковую область шеи.

В. Внутривенная инъекция. В общей сложности 2 инъекции осуществляют в каждый момент времени в следующие участки: одну инъекцию объемом 0,5 мл (каждая) в противоположные стороны нижней шейно-плечевой области.

Используют в общей сложности 4 моментов времени: 0, 3, 6 и 9 недель.

Адьювант Addavax™ (Invivogen), адьювант MF59®, полный адьювант Фрейнда, AS03 или состав на основе запатентованного адьюванта компании SAB (SAB-adj-1) вводят рядом (1-2 см) с каждым участком инъекции (всего 0,5 мл) в первые 3 момента времени.

5 Образцы крови (40 мл) собирают путем прокола яремной вены в дни 8 и 14 после инъекции в каждый момент времени и в дополнительный момент времени, 60 дней, после заключительной инъекции. Плазму крови собирают с применением автоматизированной системы для плазмафереза (Baxter Healthcare, Autopheresis C Model 200). Затем подтверждают наличие антигенспецифических антител в плазме крови.

10 **Пример 21. Очистка фракций поликлональных антител**

В данном примере описана очистка человеческих поликлональных антител от плазмы крови млекопитающего, отличного от человека, с гуманизированной иммунной системой.

Для очистки человеческих поликлональных антител к SARS-CoV-2 из собранной
15 плазмы крови и последующего применения у субъектов, представляющих собой людей, требуется инактивация и удаление белкового антигена. В данном примере человеческие поликлональные антитела к SARS-CoV-CoV-2 очищают от плазмы крови с применением способа Кона-Онкли, как описано в работе Ofosu FA et al. (*Thromb. Haemost.*, 99(5):851-862 (2008)); работе Buchacher A и Iberer G (*Biotechnol. J.*, 1(2): 148-163 (2006)); работе Buchacher
20 A и Curling JM (в *Biopharm. Process.*, глава 42, стр. 857-876, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00043-8> (2018)). Собирают фракцию (I+) II+III, полученную способом Кона-Онкли, и человеческие поликлональные антитела к SARS-CoV-CoV-2 очищают от данной фракции с применением способов, описанных в работе Lebing et al. (*Vox Sanguinis*, 84(3):193-201 (2003)). Вкратце, фракцию II+III суспендируют в 12 объемах воды для
25 инъекций (WFI) при pH 4,2. Добавляют каприлат натрия (20 мМ) и pH регулируют до pH 5,1 с помощью гидроксида натрия. Во время данной стадии липопротеины, альбумин и часть каприлата осаждаются. Осадок удаляют с помощью тканевого фильтра в присутствии вспомогательного фильтрующего средства. После фильтрации концентрацию каприлата повторно регулируют до 20 мМ и раствор инкубируют при pH 5,1 в течение 1 часа при 25°C
30 для инактивации оболочечного вируса. Раствор осветляют посредством глубоинной фильтрации с помощью вспомогательного фильтрующего средства. Затем фильтрат пропускают через две последовательные колонки для анионообменной хроматографии (Q-сефароза FF, затем ANX-сефароза FF) при pH 5,2. Элюат концентрируют посредством ультрафильтрации (кассеты BioMax 50KDa, Millipore) и подвергают диафильтрации с

противотоком WFI с применением той же системы. Очищенный раствор IgG регулируют до pH 4,25, 0,2 М глицина и 100 мг/мл белка. Общий объем IVIG подвергают стерилизующей фильтрации и применяют для заполнения флаконов объемом 10, 50, 100 или 200 мл. Конечный продукт инкубируют в течение 21 дня при 23-27°C для инактивации вируса перед хранением при 2-8°C.

Для подтверждения обогащения IVIG применяют электрофорез на ацетатцеллюлозе. Для клинического применения типичной является 95% чистота, и ее ожидают получить в результате данной процедуры очистки.

Пример 22. Составление полностью человеческих поликлональных антител для лечения субъектов, представляющих собой людей

В данном примере очищенные антитела составляют при нейтральном значении pH (pH 7,2) и разбавляют в ионогенном растворе, содержащем хлорид натрия. Применяют раствор для инфузий, 0,9% раствор хлорида натрия, фармацевтической чистоты согласно Фармакопее Соединенных Штатов Америки (USP). Клинический состав может быть основан на нескольких композициях раствора, которые включают:

1. Трегалозу, цитрат натрия, лимонную кислоту, полисорбат 80.
2. Сукцинат натрия, сахарозу, полисорбат 20.
3. Хлорид натрия, трометамин, полисорбат 80.
4. Сахарозу, хлорид натрия, фосфат натрия, декстран 40.

Пример 23. Лечение субъектов, представляющих собой людей, инфицированных SARS-CoV-2

В данном примере описано введение полностью человеческих поликлональных антител к SARS-CoV-2 субъектам, представляющим собой людей с SARS-CoV-2.

В данном примере субъектам, представляющим собой взрослых людей с COVID-19, вводят однократную дозу (400 мг/кг) составленных поликлональных антител путем внутривенной инфузии. Инфузию начинают при скорости 1,0 мг/кг/мин, повышающейся до 1,5-2,5 мг/кг/мин через 20 минут. Также можно использовать другие подходящие скорости инфузии, известные из уровня техники.

Эффект поликлональных антител в отношении COVID-19 анализируют посредством оценки маркеров COVID-19, таких как вирусная нагрузка, титр антител в сыворотке крови, изменения температуры тела, количество баллов по Шкале динамической оценки органной недостаточности (SOFA) (диапазон 0-24, где большее количество баллов указывает на более тяжелую степень заболевания), PaO₂/FiO₂, стандартный биохимический индекс крови, ARDS и использование систем обеспечения искусственной вентиляции легких и

экстракорпоральной мембранной оксигенации (ECMO), у субъектов, представляющих собой людей до и после инфузии.

Пример 24. Пассивная иммунизация субъектов, представляющих собой здоровых людей, против инфекции, вызванной SARS-CoV-2

5 В данном примере описана пассивная иммунизация субъекта, представляющего собой человека, против инфекции, вызванной SARS-CoV-2, с помощью полностью человеческих поликлональных антител к SARS-CoV-2, полученных у млекопитающих, отличных от человека, с гуманизированной иммунной системой.

10 В данном примере здоровым субъектам, представляющим собой людей, вводят однократную дозу (400 мг/кг) составленных поликлональных антител или плацебо (контроля в виде физиологического раствора) путем внутривенной инфузии. Инфузию начинают при скорости 1,0 мг/кг/мин, повышающейся до 1,5-2,5 мг/кг/мин через 20 минут. Можно использовать другие подходящие скорости инфузий, известные из уровня техники. Через 3 дня у субъектов, получавших лечение, собирают кровь, и плазму крови тестируют
15 в отношении нейтрализующей способности антител с применением реакции нейтрализации бляшкообразования, как описано в **примере 11**.

В данном примере серологические тесты проводят у субъектов, представляющих собой людей, через 14 дней после введения составленных поликлональных антител. Серологические тесты для SARS-CoV-2 известны из уровня техники, включая, например,
20 Gonzalez JM et al. *medRxiv*, (doi: doi.org/10.1101/2020.04.10.20061150 (2020)).

Пример 25. Профилактическое лечение субъектов, представляющих собой здоровых людей

В данном примере описано профилактическое лечение субъекта, представляющего собой человека от инфекции, вызванной SARS-CoV-2, с помощью полностью человеческих
25 поликлональных антител к SARS-CoV-2, полученных у млекопитающих, отличных от человека, с гуманизированной иммунной системой.

Для данного примера очищенные человеческие поликлональные антитела к SARS-CoV-CoV-2 получают, как описано в **примере 21**. Очищенные поликлональные антитела составляют, как описано в **примере 22**, и последовательно вводят субъектам,
30 представляющим собой здоровых людей, как описано в **примере 24**.

Через 3 дня кровь собирают у здоровых субъектов, представляющих собой людей, которым вводили составленные поликлональные антитела или плацебо (контроль в виде физиологического раствора), и плазму крови тестируют в отношении нейтрализующей

способности антител с применением реакции нейтрализации бляшкообразования, как описано в **примере 11**.

Пример 26. Профилактическое лечение приматов, отличных от человека

5 В данном примере описано профилактическое лечение примата, отличного от человека, от инфекции, вызванной SARS-CoV-2, с помощью полностью человеческих поликлональных антител к SARS-CoV-2, полученных у млекопитающих, отличных от человека, с гуманизированной иммунной системой.

10 В данном примере очищенные человеческие поликлональные антитела к SARS-CoV-CoV-2 получают, как описано в **примере 21**. Очищенные поликлональные антитела составляют, как описано в **примере 22**, и последовательно вводят взрослым макакам-резусам. Вкратце, состав на основе поликлональных антител вводят макакам-резусам внутривенно в дозе 10 мг/кг. В качестве контроля применяют поликлональные антитела от трансхромосомного представителя крупного рогатого скота, получавшего инъекцию только среды-носителя (без кольцевой РНК).

15 Затем макаков-резусов интратрахеально заражают с помощью SARS-CoV-2 при дозах заражения 50% культуры ткани (TCID₅₀), составляющих 1×10^6 , и определение показателей веса тела, температуры тела, рентгенологическое исследование, сбор образцов сыворотки крови, мазков из носа/горла и всех основных тканей проводят по графику, как описано в работе Bao L et al. (*bioRxiv*, doi: doi.org/10.1101/2020.03.13.990226 (2020)).
20 Образцы собирают вплоть до 30 дней после заражения и оценивают в отношении вирусной нагрузки.

Пример 27. Введение РНК, кодирующей антигена SARS-CoV-2, субъекту, представляющему собой человека

25 В данном примере описано введение кольцевой РНК, кодирующей антиген SARS-CoV-2, субъекту, представляющему собой человека.

В данном примере кольцевую РНК или мРНК, кодирующую антигена SARS-CoV-2, разрабатывали, получали и очищали посредством способов, описанных в данном документе.

30 В данном примере в одном подходе РНК составлена, как описано в **примере 7** (например, составлена с липидным носителем (например, TransIT), составлена с катионным полимером (например, протамином), составлена с липидной наночастицей или является несоставленной), с получением первого набора препаратов на основе кольцевой РНК или первого набора препаратов на основе линейной РНК. Во втором подходе адъювант Addavax™ (Invivogen), адъювант MF59® или полный адъювант Фрейнда составлены со

смесью РНК-липидный носитель или несоставленным препаратом на основе РНК (например, препаратом на основе кольцевой РНК или препаратом на основе линейной РНК), как описано в работе Beigel JH et al. (*Lancet Infect. Dis.*, 18: 410-418 (2018)), с получением второго набора препаратов на основе кольцевой РНК или второго набора 5 препаратов на основе линейной РНК. Кольцевую РНК или линейную РНК составляют с получением препаратов на основе кольцевой РНК или препаратов на основе линейной РНК незадолго до осуществления инъекции субъекту, представляющему собой человека.

В данном примере субъекта, представляющего собой человека, иммунизируют с помощью препаратов на основе кольцевой РНК (т. е. первого препарата на основе 10 кольцевой РНК или второго препарата на основе кольцевой РНК), препаратов на основе линейной РНК (т. е. первого препарата на основе кольцевой РНК или второго препарата на основе кольцевой РНК) путем внутримышечной или внутрикожной инъекции. Препараты на основе кольцевой РНК или препараты на основе линейной РНК вводят субъекту, представляющему собой человека, по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, 15 по меньшей мере 3 раза или больше для вызова иммуногенного ответа у субъекта, представляющего собой человека.

Пример 28. Экспрессия нескольких антигенов из кольцевых РНК в клетках млекопитающего

В данном примере продемонстрирована экспрессия нескольких антигенов из 20 кольцевых РНК в клетках млекопитающего. Иллюстративное схематическое изображение данных конструкций показано на **фиг. 12**.

Эксперимент 1

Первую кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 56; аминокислотная 25 последовательность под SEQ ID NO: 55), разрабатывали, получали и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Вторую кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 54; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 53), разрабатывали, получали и подвергали очистке 30 посредством способов, описанных в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали с получением смеси. Смесь (1 пикомоль каждой из кольцевых РНК) трансфицировали в клетки HeLa (100000 клеток на лунку в 24-луночной планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015). В качестве

контролей первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности трансфицировали в клетки HeLa с применением MessengerMax.

Экспрессию антигена, представляющего собой RBD, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Экспрессию антигена, представляющего собой шиповидный белок, измеряли через 24 часа посредством проточной цитометрии.

После трансфекции с помощью смеси антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, был выявлен в надосадочной жидкости клеток HeLa и антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, был выявлен на клеточной поверхности клеток HeLa. После трансфекции с помощью первой кольцевой РНК антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, был выявлен, а антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, не был выявлен. После трансфекции с помощью второй кольцевой РНК антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, был выявлен, а антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, не был выявлен. Это демонстрирует, что как антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, так и антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, экспрессировались в клетках млекопитающего из комбинированной смеси кольцевых РНК.

Эксперимент 2

Первую кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 56; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 55), разрабатывали, и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Вторую кольцевую РНК разрабатывали с IRES и ORF, кодирующей полипептид люциферазы Gaussia (GLuc) (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 58; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 57) в качестве модели антигена, и получали, и подвергали очистке, как описано, посредством способов, описанных в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК по отдельности связывали в комплекс с Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015) и затем смешивали с получением смеси. Смесь (0,1 пикомоль каждой из кольцевых РНК) трансфицировали в клетки HeLa (20000 клеток на лунку в 96-луночном планшете). В качестве контролей первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности трансфицировали в клетки HeLa с применением MessengerMax.

Экспрессию антигена, представляющего собой RBD, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении антигена, представляющего собой

RBD SARS-CoV-2. Активность GLuc измеряли через 24 часа с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce).

После трансфекции с помощью смеси антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и активность GLuc были выявлены в надосадочной жидкости клеток HeLa через 24 ч. После трансфекции с помощью первой кольцевой РНК антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, был выявлен, однако активность GLuc не была выявлена. После трансфекции с помощью второй кольцевой РНК активность GLuc была выявлена, однако антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, не был выявлен. Это демонстрирует, что как антиген, представляющий собой RBD SAR-CoV-2, так и антиген, представляющий собой GLuc экспрессировались в клетках млекопитающего из комбинированной смеси кольцевых РНК.

Эксперимент 3

Первую кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 56; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 55), разрабатывали, получали и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Вторую кольцевую РНК разрабатывали таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая антиген, представляющий собой гемагглютинин (НА) из вируса гриппа А H1N1, A/California/07/2009 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 60; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 59), и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали с получением смеси. Смесь (1 пикомоль каждой кольцевой РНК) трансфицировали в клетки HeLa (100000 клеток на лунку в 24-луночной планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015). В качестве контролей первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности трансфицировали в клетки HeLa с применением MessengerMax.

Экспрессию антигена, представляющего собой RBD, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Экспрессию антигена, представляющего собой НА, измеряли через 24 часа с применением иммуноблота. Вкратце, в случае иммуноблота через 24 часа после трансфекции клетки подвергали лизису и выполняли вестерн-блот для выявления антигена, представляющего собой НА, с применением моноклонального антитела (MA5-29920 (Thermo Fisher)) к НА вируса гриппа А H1N1 (A/California/07/2009) в качестве первичного антитела и антитела козы к IgG мыши H&L (HRP) в качестве вторичного антитела (Abscam,

ab 97023). Для контроля загрузки применяли альфа-тубулин с антителом мыши к альфа-тубулину (DM1A) в качестве первичного антитела (Cell Signaling Technology, CST № 3873) и антителом козы к IgG мыши H&L (HRP) в качестве вторичного антитела (Abcam, ab 97023).

5 После трансфекции с помощью смеси был выявлен как антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, так и антиген, представляющий собой HA вируса гриппа. После трансфекции с помощью первой кольцевой РНК RBD SARS-CoV-2 был выявлен, а антиген, представляющий собой HA вируса гриппа, не был выявлен. После трансфекции с помощью второй кольцевой РНК антиген, представляющий собой HA вируса гриппа, был выявлен, а
10 антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, не был выявлен. Это демонстрирует, что как антиген, представляющий собой RBD SAR-CoV-2, так и антиген, представляющий собой HA вируса гриппа, экспрессировались в клетках млекопитающего из комбинированной смеси кольцевых РНК.

Эксперимент 4

15 Первую кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 45; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 53), разрабатывали, получали и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Вторую
20 кольцевую РНК разрабатывали таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая HA из вируса гриппа A H1N1, A/California/07/2009 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 60; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 59), и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали с получением смеси. Смесь (1 пикомоль каждой из кольцевых РНК)
25 трансфицировали в клетки HeLa (100000 клеток на лунку в 24-луночной планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015). В качестве контролей первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности трансфицировали в клетки HeLa с применением MessengerMax.

Экспрессию антигена, представляющего собой шиповидный белок, измеряли через
30 24 часа посредством проточной цитометрии. Экспрессию антигена, представляющего собой HA, измеряли через 24 часа посредством иммуноблота, как описано выше в эксперименте 3.

После трансфекции с помощью смеси был выявлен как антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, так и антиген, представляющий собой HA вируса

гриппа. После трансфекции с помощью первой кольцевой РНК антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, был выявлен, а антиген, представляющий собой НА вируса гриппа, не был выявлен. После трансфекции с помощью второй кольцевой РНК антиген, представляющий собой НА вируса гриппа, был выявлен, а антиген, представляющий собой шиповидный белок, SARS-CoV-2, не был выявлен. Это демонстрирует, что как антиген, представляющий собой шиповидный белок SAR-CoV-2, так и антиген, представляющий собой НА вируса гриппа, экспрессировались в клетках млекопитающего из комбинированной смеси кольцевых РНК.

В данном примере показано, что несколько антигенов экспрессировались в клетках млекопитающего из препаратов на основе кольцевой РНК, содержащих разные комбинации кольцевых РНК.

Пример 29. Экспрессия нескольких антигенов из кольцевой РНК

В данном примере продемонстрирована экспрессия нескольких антигенов из кольцевой РНК в клетках млекопитающего. Иллюстративные схематические изображения данных конструкций показаны на **фиг. 10** и **11**.

Эксперимент 1

В данном примере кольцевую РНК разрабатывали таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая полипептид GLuc, стоп-кодон, спейсер, IRES, ORF, кодирующая антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и стоп-кодон. Кольцевую РНК получали и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. В качестве контролей следующие кольцевые РНК получали, как описано выше: (i) кольцевую РНК с IRES и ORF, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2; (ii) кольцевую РНК с IRES и ORF, кодирующей полипептид GLuc.

Кольцевые РНК (0,1 пикомоль) трансфицировали в клетки HeLa (10000 клеток на лунку в 96-луночном планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015).

Экспрессию антигена, представляющего собой RBD, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Активность GLuc измеряли через 24 часа с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce).

Экспрессия антигена, представляющего собой RBD, была выявлена из кольцевых РНК, кодирующих антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и полипептид GLuc (фиг. 13A). Активность GLuc был выявлена из кольцевых РНК, кодирующих полипептид

GLuc (фиг. 13B). Это демонстрирует, что как антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, так и антиген, представляющий собой GLuc, экспрессировались в клетках млекопитающего из кольцевой РНК, кодирующей как антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, так и антиген, представляющий собой GLuc.

5 *Эксперимент 2*

В данном примере кольцевую РНК разработана таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, стоп-кодон, спейсер, IRES, ORF, кодирующая антиген, представляющий собой RBD коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS), и стоп-кодон.

10 Кольцевую РНК получают и подвергают очистке посредством способов, описанных в данном документе.

Кольцевые РНК трансфицируют при различных концентрациях в клетки HeLa (10000 клеток на лунку в 96-луночной планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015).

15 Экспрессию антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, измеряют через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Экспрессию антигена, представляющего собой RBD MERS, измеряют через 24 часа с применением поддающегося выявлению антитела, специфического в отношении антигена, представляющего собой RBD MERS.

20 **Пример 30. Иммуногенность нескольких антигенов из кольцевых РНК в мышинной модели**

В данном примере описана экспрессия нескольких антигенов у субъекта при введении нескольких молекул кольцевой РНК.

Эксперимент 1

25 Иммуногенность препарата на основе кольцевой РНК, содержащего (а) кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и (б) кольцевую РНК, кодирующую полипептид GLuc в качестве модели антигена, составленные в липидные наночастицы, оценивали в мышинной модели. Выработку антител к антигену, представляющему собой RBD SARS-CoV-2, и активность GLuc также оценивали в

30 мышинной модели.

Первую кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 56; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 55), разрабатывали, и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Вторую кольцевую РНК

разрабатывали с IRES и ORF, кодирующей полипептид GLuc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 58; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 57), и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали с получением смеси. Затем данную смесь составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 7**, с получением первого препарата на основе кольцевой РНК. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 7**, и затем смешивали с получением второго препарата на основе кольцевой РНК.

10 Трех мышей внутримышечно вакцинировали с помощью первого препарата на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг RBD + 10 мкг GLuc) в день 0 и с помощью второго препарата на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг RBD + 10 мкг GLuc) в день 12. Дополнительных мышей (3 или 4 на группу) также внутримышечно вакцинировали в день 0 и день 12 с помощью (i) 15 первой кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; (ii) второй кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; или (iii) PBS.

Сбор крови у каждой мыши осуществляли посредством забора крови из поднижнечелюстной области. Кровь собирали в сухие пробирки без антикоагулянта через 2 и 17 дней после примирования с помощью первого препарата на основе кольцевой РНК. 20 Сыворотку крови отделяли от цельной крови посредством центрифугирования при 1200 g в течение 30 минут при 4⁰C. Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия RBD-специфического IgG посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96-луночные, Nunc) покрывали с помощью RBD SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40592-V08B; 25 100 нг) в 100 мкл 1X покрывающего буфера (Biolegend, 421701). Затем планшеты блокировали на 1 час с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% BSA и 0,05% Tween 20). Затем разбавления сыворотки крови (1:500, 1:1500, 1:4500 и 1:13500) добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-солевого буфера с 30 детергентом Tween® (TBS-T) планшеты инкубировали с антителом выявления к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Abcam, ab97023), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, после чего добавляли тетраметилбензол (Biolegend, 421101). В планшете для ELISA обеспечивали протекания реакции в течение 10-20 мин и

затем гасили с помощью 0,2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (O.D.) определяли при 450 нм.

Значение оптической плотности для каждого образца сыворотки крови делили на таковое для фона (планшетов, покрытых с помощью RBD, инкубированных только со вторичным антителом). Для каждого образца кратность изменения показателей по сравнению с фоном наносили на график.

Активность GLuc тестировали с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). 50 мкл 1х субстрата GLuc добавляли к 10 мкл сыворотки крови для осуществления анализа активности люциферазы GLuc. Планшеты прочитывали непосредственно после смешивания на люминометрическом приборе (Promega).

Результаты показывали, что антитела к RBD получали через 17 дней после примирования (т. е. через 17 дней после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК) (фиг. 14А), и активность GLuc была выявлена через 2 дня после примирования (т. е. через 2 дня после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК) (фиг. 14В).

Данные результаты показывают, что препараты на основе кольцевой РНК, содержащие две кольцевых РНК, кодирующих разные антигены, индуцировали антигенспецифические ответы у мышей.

Эксперимент 2

Иммуногенность препарата на основе кольцевой РНК, содержащего (а) кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и (б) кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой гемагглютинин (НА) вируса гриппа, составленные в липидных наночастицах, оценивали в мышинной модели. Выработку антител к антигенам, представляющим собой RBD SARS-CoV-2 и НА вируса гриппа, также оценивали в мышинной модели.

Первую кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 56; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 55), разрабатывали, и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Вторую кольцевую РНК разрабатывали таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая гемагглютинин (НА) из вируса гриппа А H1N1, A/California/07/2009 (нуклеиновая кислота под SEQ ID NO: 60; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 59), и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали с получением смеси. Затем данную смесь составляли с липидными наночастицами, как описано в

примере 7, с получением первого препарата на основе кольцевой РНК. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 7**, и затем смешивали с получением второго препарата на основе кольцевой РНК.

5 Трех мышей внутримышечно вакцинировали с помощью первого препарата на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг RBD + 10 мкг HA) в день 0 и с помощью второго препарата на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг RBD + 10 мкг HA) в день 12. Дополнительных мышей (3 или 4 на группу) также внутримышечно вакцинировали в день 0 и день 12 с помощью (i) первой
10 кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; (ii) второй кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; или (iii) PBS.

Сбор крови осуществляли, как описано в эксперименте 1. Наличие RBD-специфического IgG определяли посредством ELISA, как описано в эксперименте 1.

Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия HA-специфического IgG посредством ELISA. Планшеты для ELISA покрывали на ночь при 4°C
15 с помощью рекомбинантного белка HA (Sino Biological, 11085-V08B; 100 нг), и планшеты обрабатывали, как описано в эксперименте 1. Значение оптической плотности для каждого образца сыворотки крови делили на таковое для фона (планшетов, покрытых с помощью
20 HA, инкубированных только со вторичным антителом). Для каждого образца кратность изменения показателей по сравнению с фоном наносили на график.

Результаты показывали, что антитела к RBD и антитела к HA получали через 17 дней после примирования (т. е. через 17 дней после инъекции первого препарата на основе
кольцевой РНК (**фиг. 16A и 16B**)).

Результаты также показывали, что препараты на основе кольцевой РНК,
25 содержащие две кольцевые РНК, кодирующие разные антигены, индуцировали антигенспецифический иммунный ответ у мышей.

Эксперимент 3

Иммуногенность препарата на основе кольцевой РНК, содержащего (a) кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, и (b)
30 кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой гемагглютинин (HA) вируса гриппа, составленные в липидных наночастицах, оценивали в модели на мышах. Выработку антител к антигенам, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2 и HA вируса гриппа, также оценивали в мышинной модели.

Первую кольцевую РНК, кодирующую антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 54; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 53), разрабатывали, и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе.

5 Вторую кольцевую РНК разрабатывали таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая гемагглютинин (HA) из вируса гриппа A H1N1, A/California/07/2009 (нуклеиновая кислота под SEQ ID NO: 60; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 59), и получали, и подвергали очистке посредством способов, описанных в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали с получением смеси. Затем данную смесь составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 7**, с получением первого препарата на основе кольцевой РНК. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 7**, и затем смешивали с получением второго препарата на основе кольцевой РНК.

15 Трех мышей внутримышечно вакцинировали с помощью первого препарата на основе кольцевой РНК в день 0 (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг шиповидного белка + 10 мкг HA) и с помощью второго препарата на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг шиповидного белка + 10 мкг HA) в день 12. Дополнительных мышей (3 или 4 на группу) также внутримышечно вакцинировали в день 0 и день 12 с помощью (i) первой кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; (ii) второй кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; или (iii) PBS.

Сбор крови осуществляли, как описано в эксперименте 1. Сыворотку крови отделяли от цельной крови посредством центрифугирования при 1200 g в течение 30 минут при 40C. Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия специфического в отношении RBD (т. е. RBD из шиповидного белка) IgG посредством ELISA, как описано в эксперименте 1.

Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия HA-специфического IgG посредством ELISA. Планшеты для ELISA покрывали на ночь при 4°C с помощью рекомбинантного белка HA (Sino Biological, 11085-V08B; 100 нг), и планшеты обрабатывали, как описано в эксперименте 1. Значение оптической плотности для каждого образца сыворотки крови делили на таковое для фона (планшетов, покрытых с помощью HA, инкубированных только со вторичным антителом). Для каждого образца кратность изменения показателей по сравнению с фоном наносили на график.

Результаты показывали, что антитела к RBD и антитела к HA получали через 17 дней после примирования (т. е. через 17 дней после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК (**фиг. 15А** и **15В**)).

5 Результаты также показывали, что препараты на основе кольцевой РНК, содержащие две кольцевые РНК, кодирующие разные антигены, индуцировали антигенспецифические иммунные ответы у мышей.

Пример 31. Иммуногенность кольцевой РНК, предусматривающей несколько антигенов, в мышинной модели

10 В данном примере описана иммуногенность кольцевой РНК, предусматривающей несколько антигенов. В данном примере также описано получение антител в мышинной модели к нескольким антигенам, кодируемым одной кольцевой РНК.

Эксперимент 1

15 В данном примере кольцевую РНК разрабатывают таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая полипептид GLuc (в качестве модели антигена), стоп-кодон, спейсер, IRES, ORF, кодирующая антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и стоп-кодон, получают и подвергают очистке, как описано в **примере 29**. В качестве контролей следующие кольцевые РНК получают, как описано выше: (i) кольцевую РНК с IRES и ORF, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2; (ii) кольцевую РНК с IRES и ORF, кодирующей полипептид GLuc.

20 Кольцевые РНК составляют с липидными наночастицами, как описано в **примере 7**, с получением препарата на основе кольцевой РНК.

Три мыши в каждой группе внутримышечно вакцинируют с помощью препарата на основе кольцевой РНК в общей дозе 10 мкг или 20 мкг в день 0 и в день 12.

25 Сбор крови осуществляют, как описано в **примере 30**. Наличие RBD-специфического IgG определяют посредством ELISA, как описано в **примере 30**. Активность GLuc измеряют, как описано в **примере 30**.

Эксперимент 2

30 Иммуногенность препарата на основе кольцевой РНК, содержащего кольцевую РНК, разработанную таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, стоп-кодон, спейсер, IRES, ORF, кодирующая антиген, представляющий собой RBD MERS, и стоп-кодон, составленную в липидных наночастицах, оценивают в мышинной модели. Выработку антител к антигенам, представляющим собой RBD SARS-CoV-2 и RBD MERS, также оценивают в мышинной модели.

Затем данную кольцевую РНК составляют с липидными наночастицами, как описано в **примере 7**, с получением препарата на основе кольцевой РНК.

Мышей вакцинируют внутримышечно или внутрикожно с помощью препарата на основе кольцевой РНК в количестве 5 мкг, 10 мкг, 20 мкг или 50 мкг в день 0 и снова через 5 по меньшей мере один день после исходного введения.

Сбор крови осуществляют, как описано в эксперименте 1. Наличие IgG, специфического в отношении RBD SARS-CoV-2, определяют посредством ELISA, как описано в эксперименте 1. Наличие IgG, специфического в отношении RBD MERS, также определяют посредством ELISA.

10 Отдельные образцы сыворотки крови оценивают в отношении наличия связывающих антител к RBD SARS-CoV-2, связывающих антител к RBD MERS, нейтрализующих антител к антигену, представляющему собой RBD SARS-CoV-2, нейтрализующих антител к антигену, представляющему собой RBD MERS, клеточного
15 ответа на антиген SARS-CoV-2 и клеточного ответа на антиген, представляющий собой RBD MERS.

Пример 32. Оценка Т-клеточных ответов

Анализ ELISpot применяют для выявления наличия Т-клеток, специфических в отношении шиповидного белка или RBD SARS-CoV-2, или Т-клеток, специфических в отношении HA вируса гриппа. Данный анализ выполняют на следующих группах мышей
20 из **примера 30**:

1. RBD
2. GLuc
3. HA
4. Шиповидный белок
- 25 5. RBD+HA
6. Шиповидный белок+HA
7. PBS

Селезенки мышей собирают в день 30 после буста (т. е. через 30 дней после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК) и обрабатывают с получением
30 суспензии отдельных клеток. Спленциты высевают при 0,5 М клеток на лунку в планшеты ELISpot IFN-g или IL-4 (ImmunoSpot). Спленциты либо оставляют без стимуляции, либо стимулируют с помощью объединенных пептидов SARS CoV-2 и HA (JPT, PM-WCPV-SRB и PM-IFNA_HACal). Планшеты ELISPOT обрабатывают в соответствии с протоколом производителя.

Пример 33. Оценка ответа в виде выработки антител у мышей, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую несколько антигенов

В данном примере продемонстрирован ответ в виде выработки антител, полученный в результате введения кольцевой РНК, кодирующей экспрессию нескольких антигенов.

5 Анализ ингибирования гемагглютинации (HAI) применяли для измерения уровня антител к HA вируса гриппа, которые предупреждают гемагглютинацию в сыворотке крови, полученной от мышей. Мышам вводили препарат на основе кольцевых РНК, каждую из которых разрабатывали и получали посредством способов, описанных в данном документе, и которые кодируют экспрессию антигена, представляющего собой RBD SARS-
10 CoV-2, антигена, представляющего собой шиповидный белок SARS-CoV-2, антигена, представляющего собой HA вируса гриппа, антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, и антигена, представляющего собой HA вируса гриппа, антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, и полипептида GLuc или антигена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, и антигена, представляющего собой шиповидный белок SARS-CoV-2. Сбор
15 крови осуществляли, как описано в **примере 30** в эксперименте 1, и его выполняли в день 2 и день 17 после инъекции.

Получали двукратные серийные разбавления собранного у мышей образца в день 2 и день 17. Фиксированное количество вируса гриппа с известным титром гемагглютинина (HA) добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета до получения концентрации,
20 эквивалентной 4 единицам гемагглютинина, за исключением контрольных лунок с сывороткой крови, в которые вирус не добавляли. Планшет оставляли стоять при комнатной температуре в течение 60 минут, после чего добавляли образцы эритроцитов и оставляли для инкубации при 4°C в течение 30 минут. Наиболее высокое разбавление сыворотки крови, которое предупреждало гемагглютинацию, определяли как титр HAI
25 сыворотки крови. Образец, собранный в день 17, демонстрировал титр HAI в образцах, где вводили препараты на основе кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой HA вируса гриппа, при их введении отдельно или при введении в комбинации с антигенами SARS-CoV-2, например RBD или шиповидным белком (**фиг. 17**). Титры HAI в день 17 не наблюдались в образцах, где не был введен антиген, представляющий собой HA,
30 например в образцах, где был введен отдельно антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, или отдельно антиген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2.

Поскольку в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве

5 примера. Многочисленные вариации, изменения и замены теперь будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что при практическом осуществлении настоящего изобретения могут использоваться различные альтернативы вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и структуры, находящиеся в пределах объема данной формулы изобретения и ее эквивалентов, охватываются ею.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:	Примечание	Последовательность
11	QHD4241 6.1	atgtttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtggttaatctfacaaccagaactcaattacccctgcatacactaattctttcacacgtgggtgttattaccctgacaaagt tttcagatcctcagtttacattcaactcaggactgttcttacctttctttccaatgttacttgggtccatgctatacatgtctctgggaccaatggactaagagggttgataacctgtcctac attaatgatgggtgtttattttgctccactgagaagtcaacataataagaggctggatttttggactacttttagattcgaagaccagtcctacttattgtaataacgctactaatgtgt tattaagtctgtgaattcaatttgaatgatccattttgggtgttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataatgcactttg aatagtctctcagcctttcttatggacctgaaggaaaacagggttaattcaaaaatcttagggaatttgggttaagaatattgatgggtattttaaaatattctaagcacacgcctatt aatttagtgcgtgatctccctcagggttttgggtttagaaccattggtagattgc caatagggtattaacatcactaggttcaaacttacttgctttacatagaagttattgactcctgg gattctcttcagggtggacagctgggtgctgcagcttattatgtgggttatcttcaacctaggactttctattaaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcactg accctctcagaacaaagtgtacgttgaatcctcactgtagaaaaggaatctatacaacttcaactttagagtccaaccaacagaatctattgtagattcctaattacaaact tgtgcccttttgggaagttttaacgccaccagatttgcactgtttatgcttggacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatctttccact ttaagtgttatggagtgtctcactactaaattaaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaattagagggtgatgaagtgcagacaaatcgtccaaggcaactggaaag attgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattcaacaatcttgattctaagggtgggtgtaattataattacctgtatagattgttggaaagtca atctcaaaccctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatgggtgtgaaagtttaattgttactttcctttacaatcatatggtttccaaccactaat ggtgttggttaccaaccatacagagtagtagtactttctttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaatttgggttaaaaacaatgtgtcaatttcaact tcaatgggttaacaggcacagggtgttcttactgagtcaacaaaagtttctgcctttcaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttga gattcttgacattacacatgttcttttgggtgtcagtggtataacaccaggaaacaaacttctaaccagggtgctgttctttatcaggatgttaactgcacagaagtccctgttctatt catgcagatcaacttactcctacttggcgtgttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctgttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtgacatacc cattggtgcaggtatatgcgctagtattcagactcagactaattctcctcggcgggcagtagttagctagctaatccatcattgcctacactatgtcattgggtgcagaaaattcagtt gcttactctaataactctattgccatacccacaaatttactattagtggtaccacagaaattctaccaagtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattcaa

		<p>ctgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgctttaactggaatagctgttgaacaagacaaaaacaccaagaagttttgcacaagtcaaca aatttacaaaacaccaccaattaaagatttgggtggttttaattttcacaaatattaccagatccatcaaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctactttcaacaagtgacactt gcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttggatattgctgctagagacctcatttgcacaaaagftaacggccttactgtttgccacctttgctcacagatgaaat gattgctcaatacacttctgcactgtagcgggtacaatcacttctgggtggaccttgggtgcaggtgctgcattacaataaccatttgcataatggcttataggttaatggattgg agttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatftaatgtctattggcaaaattcaagactcactttctccacagcaagtgacttggaaaacttcaagat gtggtaacccaaaatgcacaagctttaaacacgcttgttaacaacttagctccaatfttgggtcaattcaagtgttttaaatgatcctttcacgtcttgacaaaagtgaggctgaagt caaattgataggttgatcacaggcagacttcaaagttgcagacatatgtgactcaacaattaattagagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctactaaaatgacagagt gtgtacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaaagggtatcatcttctcctccctcagtcagcacctcatgggtgtagtcttcttgcattgacttatgcctgcacaagaaa agaactcacaactgctctgccatttgcattgatggaaaagcacacttctcctggaaggtgctttgtttcaaatggcacacactggtttgaacacaaaggaatfttatgaaccacaa atcattactacagacaacacatttgtctgtgtaactgtgatgttataataggaattgtcaacaacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcattcaaggaggagftagataa atattttaagaatcatacatcaccagatggtgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaftgaccgcctcaatgaggttccaagaatftaatg aatctctcatc gatctccaagaacttggaaagtatgagcagtatataaaatggccatggtacatttggctaggtttatagctggcttgattgccatagtaatggtgacaattatgctttgct gtatgaccagttgctgtagttgtctcaagggctgtgttcttgtggatcctgctgcaaatftgatgaagacgactctgagccagtctcaaggagtc aaattacattacacataa</p>
12	p1	<p>AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAAACGCAATACGCTGGCTA TCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAACGATCCGCCATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCA CGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAA ACGGCCATTTTCCACCATAATGTTTCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTCCACCACCAGATCTTCGCCATCCGG CATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCTGA TCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAG GTCGCCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGA TGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCAGCAGCAGCCAATCACGGCCCGCTTCGGTCACCACA</p>

	<p>TCCAGCACCGCCGCACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCG TTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTACAAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCC GCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTA CCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTG TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCAT TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT GGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTGCGCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCT CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAA GGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGGAAGCCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTTCGTG TGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAACAAAA AAAAAACCAAAAAACAAAACACAacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgtatttccaccatattgccgtctttg gcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggagcagttcctc ggaagcttctgaagacaacaactgtctgtagcgaccttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctgcccgaagaccagctgtataagatacacctgc aaaggcggcacaacccagtgccacgttgtagtgatggatagttgtggaagaatgcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccccat tgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaacgtctaggcccccgaaccacggggacgtggtttcctttgaaaaacacgatga taataGCCACCatgtttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtggttaactcttacaaccagaactcaattaccctgcafacactaattcttcacagtggtgttatta ccctgacaaagtttcagatcctcagttttacattcaactcaggactgttcttacctttcttccaatgttacttggtccatgctatacatgtctctgggaccaatggtactaagaggttga taacctgtcctaccattaatgatggtgtttattttgcttccactgagaagttaacataataagaggctggatttttggtactacttttagattcgaagaccagtcctacttattgtaata</p>
--	---

	<p>acgctactaatgttgattataaagtctgtgaattcaatgtgtaatgatccattttgggtgttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagatttctagtgcg aataattgcacttttgaatatgtctctcagccttttctatggacctggaaggaacacagggttaattcaaaaatcttagggaattgtgttaagaatattgaggtattttaaaatatattcta agcacacgcctattaatttagtgcgtgatctccctcagggttttcggctttagaacattggtagatttgccaataggtattaacatcactaggtttcaacttactgctttacatagaag ttattgactcctgggtattcttctcaggtggacagctggctgctgagcttattatgtgggtatcttcaacctaggactttctattaaaataatgaaaatggaaccattacagatgctg tagactgtgcacttgaccctctcagaaaacaaagtgtacgttgaaatcctcactgtagaaaaggaatctatcaaacttctaactttagagtccaaccaacagaatctattgttagatt cctaataattacaactgtgcccttttggtagaagttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggaaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataatc cgcatcattttccacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaatgatctctgctttactaatgtctatgacagattcattgttaatagaggtgatgaagtcagacaaatcgctccag ggcaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattctaacaatcttgattctaagggtgggtgtaattataattacctgatag attgtttaggaagtctaactcaaaccttttgagagagatatttcaactgaaatctatcaggccggtgacacacctgtaatggtgtggaaggttttaattgttactttctttacaatcatatg gttccaaccactaatgggtgtggttaccacacacagagtagtagtactttcttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaatttggtaaaaaaca aatgtgtcaattcaactcaatgggttaacaggcacagggttcttactgagttaacaaaaaagtcttgcctttcaacaattggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgt gatccacagacacttgagattctgacattacaccatgttctttgggtgtcagtggtataacaccaggaacaaatacttctaaccagggtgctgttctttatcaggatgtaactgcaca gaagtcctgtgttattcatgcagatcaacttactcacttggcgtgtttattctacaggttctaattttcaaacacgtgcaggctgttaataggggctgaacatgtcaacaactcat atgagtgtgacatacccattgggtgcaggatatacgctagttatcagactcagactaattctcctggcagcgcagcaggtgtagctagtcaatccatcattgcctacactatgtcacttg gtgcagaaaattcagttgcttacttaataaacttattgccatacccacaaatttactattagtgttaccacagaaattctaccagtgcttatgaccaagacatcagtagattgtacaatgt acatttgggtgattcaactgaatgcagcaatcttttggcaaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgctttaaactggaatagctgtgaaacaagacaaaaacaccaagaagt ttgcacaagtcaaacaaatttcaaacaccaccaattaaagattttgggtggttttaattttcacaatattaccagatcatcaaaccaagcaagaggtcattttgaagatctacttt tcaacaaagtgacacttgacagatgctggcttcatcaacaataatggtgattgccttgggtatattgctgctagggacctcattgtgcacaaaagttaacggccttactgtttgccacct ttgctcacagatgaaatgattgctcaatacacttctgactgttagcgggtacaatcacttctggttggaccttgggtgcaggtgctgcattacaaataccattgctatgcaaatggcttat aggtttaattggtattggagttacagaatgttctctatgagaacaaaattgattccaaccaatttaatagtgctattggcaaaattcaagactcattttccacagcaagtgcact tggaaaactcaagatgtggtcaacaaaatgcacaagctttaaacacgctttaaacaacttagctccaattttgggtgcaatttcaaggttttaaatgatatctttcacgcttggacc tcccagggtgaagtgcaaatgataggtgatcacaggcagacttcaagtttgacacatatgtgactcaacaattaaatagagctgcagaaatcagagcttctgctaattctgctg</p>
--	---

	<p>ctactaaaatgtcagagtgtgacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaaaggctatcatcttatgtccttcctcagtcagcacctcatggtgtagtcttctgcatgtgactt atgtccctgcacaagaaagaacttcacaactgctcctgccatttgcacatgatggaaaagcacacttctcgtgaagggtgctttgttcaaaggcacacactggttgtaacacaaa ggaattttatgaaccacaaatcattactacagacaacacatttgtgctggttaactgtgatggtgtaataggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcatt caaggaggagtagataaatatttaagaatcatacatcaccagatgttgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgag gttgccaagaatttaaatgaatctctcatgatctccaagaacttggaaagtatgagcagGGGTATATCCCTGAAGCCCCCAGGGACGGCCAGGC TTACGTCAGAAAGGATGGAGAGTGGGTGCTCTTGAGCACCTTCCTGTAAAAAAACAAAAACAAAACGGC TATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGAT GCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAGCTGGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACTGCCC GCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGC TCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAA AGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA CGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGT TTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTC CCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCA AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTG GTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGA TCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG</p>
--	---

13	ORF1	atgtttgtttctgtttattgccactagtctctagtcagtggttaatcttacaaccagaactcaaffacccctgcatacactaattctttcacacgtgggtgttattaccctgacaaagt cagatcctcagtttacattcaactcaggacttgcttacccttctttccaatgttacttgggtccatgctatacatgctctctgggaccaatgggtactaagaggttgataaccctgtcctac atataatgatgggtgtttattttgcttccactgagaagtctaacataataagaggctggatttttggtactacttagattcgaagaccagtcctacttattgtaataacgctactaatggtg tattaaagtctgtgaattcaattttgtaatgatccattttgggtgttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataattgcactttg aatatgtctctcagcctttcttatggacctgaaggaaaacagggtaattcaaaaatcttaggaattgtgttaagaatattgatggtattttaaaatattctaagcacacgcctatt aattagtgcgtgatctccctcagggttttggcctttagaaccattggttagattgc caataggattaacatcactaggttcaaacttactgtcttacaagaattttgactcctgg gattcttctcaggttgacagctggctgctgagcttattatgtgggttatcttcaacctaggactttctattaaatataatgaaaat ggaaccattacagatgctgtagactgtgcactg accctctcagaacaaagtgtacgtgaaatcctcactgtagaaaaggaatctatacaacttcaactttagagtccaaccaacagaatctattgttagattcctaattacaaact tgtgccctttgggtgaagttttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatctttccact ttaagtgttatggagtgtctcactactaaattaaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaattagaggatgaagtgcagacaaatcgctccagggcaactggaaag attgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattcaacaatcttgattctaagggtgggtgtaattataattacctgtatagattgttggaaagtcta atctcaaacctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatgggtgtgaaagtttaattgttacttcttacaatcatatggtttcaaccactaat gggtgtggttaccacatacagagtagtagtactttttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaatttggttaaaaacaatgtgtcaattcaact tcaatggtttaaaccaggcacaggtgttcttactgagtcaacaaaagtttctgccttccaacaattggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacactga gattcttgacattacaccatgttctttgggtgtcagtggtataacaccaggaaacaatacttctaaccaggtgctgttctttatcaggatgtaactgcacagaagtccctgttctatt catgcagatcaacttactcctacttggcgtgttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctgttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtagacatacc cattgggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagactaattctcctggcagcgcagcagctgtagctagtagcaatccatcattgcctacactatgtcacttgggtgcagaaaattcagtt gcttactctaataactctattgccatacccacaaattttactattaggttaccacagaaattctacca gtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattcaa ctgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgcttactggaatagctgttgaaacaagacaaaaacaccaagaagttttgcacaagtcaaca aatttacaaaacaccaccaattaaagatttgggtgggttttaattttcacaatattaccagatccatcaaaaccaagcaagaggtcattttatgaagatctactttcaacaagtgcactt gcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttgggtgatattgctgctagggacctcatttgcacaaaagttaacggccttactgtttgccaccttctcagatgaaat gattgctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcactctggttggaccttgggtcaggtgctgcattacaaataccatttgcataatggcttataggttaattggtattgg
----	------	---

		<p>agttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaccaathtaagtgctattggcaaaattcaagactcactttctccacagcaagtgcaacttgaaaactcaagat gtgtcaacaaaaatgcacaagctttaaacacgctgttaaacacttagctccaatttgggtgcaattcaagtgtttaaatgatatccttcacgtcttgaccctcccaggctgaagt gcaaatgataggtgatcacaggcagacttcaaagttgcaacatatgtgactcaacaattaatagagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctgactaaaaatgcaga gtgtgacttgacaatcaaaaagagtgatttttggaaaaggctatcatctatgtccttcctcagtcagcacctcatgggtgtagtcttctgcatgtgacttatgtcctgcacaaga aaagaactcacaactgctcctgccatttgcgatggaagagcacacttctcgtgaaggtgctttgttcaaatggcacacactggttgtaacacaaaaggaattttatgaaccac aaatcattactacagacaacacattgtgtctgtaactgtgatggtgtaataggaattgcaacaacagtttatgatccttgcaacctgaattagactcattcaaggaggagttgat aaatatttaagaatcatacatcaccagatgttgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgaggttgccaagaattaat gaatctctcatcgatcccaagaactggaaagtatgagcagGGGTATATCCCTGAAGCCCCAGGGACGGCCAGGCTTACGTCAGAA AGGATGGAGAGTGGGTGCTCTTGAGCACCTTCCTGTAA</p>
14	p3	<p>AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAAACGCAATACGCTGGCTA TCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACAGAAAACGATCCGCCATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCA CGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAA ACGGCCATTTTCCACCATAATGTTCCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTCACCACCAGATCTTCGCCATCCGG CATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCTGA TCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAG GTCGCCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGA TGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCCAGCAGCAGCCAATCACGGCCCGCTTCGGTCACCACA TCCAGCACCGCCGCACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCG TTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTACAAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCC GCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTA CCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTG</p>

	<p>TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCAT TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT GGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCT CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAA GGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGGAAGCCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTTCGTG TGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAACAAAAAAACAAAA AAAAAACCAAAAAACAAAACACAacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcttctatattttccaccatattgccgtctttg gcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttctgtacgagcattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctc ggaagcttctgaagacaacaacgtctgtagcgacctttgcagggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctgcccgaagccagctgtataagatacacctgc aaaggcggcacaacccagtgccacgttgagttggatagttgtgaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccccat tgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaacgtctaggccccgaaccacggggacgtggtttccttgaaaaacacgatga taataGCCACCatgtttgtttctgtttattgccactagtctctagtcagtgtttaatcttacaaccagaactcaattaccctgcatacactaattcttcacacgtggtgttatta ccctgacaaagtttcagatcctcagttttacattcaactcaggactgttcttacctttttccaatgttacttggttcacgtctatacatgtctctgggaccaatggtactaagaggttga taacctgtcctaccattaatgatggtgtttattttgcttccactgagaagttaacataataagaggctggatttttggtactacttttagattcgaagaccagtcctactattgttaata acgctactaatgtgttattaaagtctgtgaattcaattttgtaatgatccattttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagattattctagtgcg aataattgcactttgaaatgtctctcagcctttcttatggacctgaaggaaaacagggtaatttcaaaaatcttagggaattttgttttaagaatattgatggttattttaaataatctta agcacagcctattaatttagtgcgtgatctccctcagggttttcgctttagaacattggtagattgccaataggattacaatcactaggtttcaactttactgtttacatagaag ttattgactcctggtgattcttctcaggttggacagctggtgctgcagcttattatgtgggtatcttcaacctaggactttctattaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctg</p>
--	---

	<p>tagactgtgcacttgaccctctcagaaacaagtgtacgttgaaatcctcactgtagaaaaggaatctatcaaacttctaacttagagtccaa ccaa cagaatctattgttagatt cctaataattacaactgtgcccttttggtagaagtttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattc cgcatcatttccactttaagtgtatggagtgtctcactaaattaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcattgttaagaggatgaagtcagacaaatcgctccag ggcaactggaaagattgctgattataattataaattacagatgatttacaggctgcgttatagcttgaattctaacaacttgattctaagggtgggtaattataattacctgtatag attgtttaggaaagtctaactcaaaccttttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatgggttgaaggtttaattgttactttccttacaatcatatg gtttcaaccactaatgggtgtggttaccacacacagagtagtagtactttcttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaattgttataaaaca aatgtgtcaattcaactcaatgggttaacaggcacagggtgttctactgagttaacaaaagtttctgccttccaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgt gatccacagacacttgagattctgacattacaccatgttctttgggtgtcagtgttataacaccaggaacaaatacttctaaccagggtgctgttcttatcaggatgtaactgcaca gaagtcctgtgtctatcatcgatcaacttactcctactggcgtgttattctacaggttctaatttttaaacacgtgcaggctgttataaggggctgaacatgtcaacaactcat atgagtgtgacataccattgggtgcaggatatacgctagttatcagactcagactaattctcctggcagcgccagcagtgtagctagcaatccatcattgcttactatgctacttg gtgcagaaaattcagttgcttacttaataactctattgccataccacaaatttactattagtgttaccacagaaattctaccagtgcttatgaccaagacatcagtagattgacaatgt acatttgggtgattcaactgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgcttactggaatagctgttgaacaagacaaaaacaccaagaagt tttgacaagtcaaacaaatttcaaacaccaccaattaaagatttgggtggttttaattttcacaatattaccagatcatcaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctacttt tcaacaaagtgcacttgacatgctggcttcaaaacaatattggtgattgccttgggtatattgctgtagggacctcattgtgcacaaaagttaacggccttactgtttgccacct ttgctcacagatgaaatgattgctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcacttctggttggaccttgggtgcaggtgctgcattacaataccattgctatgcaaatggcttat aggtttaattggtattggagttacacagaatgttctctatgagaaccaaattgattgccaaccaatttaattagtgctattggcaaaattcaagactcatttctccacagcaagtgcact tgaaaactcaagatgtggtcaaccaaattgcacaagctttaaaccgctttaaacaacttagctccaatttgggtgcaattcaagtgttttaattgatactttcacgcttgacct tcccagggtgaagtgcaaattgataggtgatcacaggcagactcaaaagttgcagacatatgtgactcaacaattaattagagctgcagaaatcagagcttctgtaattctgctg ctactaaaatgtcagagtggtacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaaagggtatcatcttatgcttccctcagtcagcacctcatgggtgtagtcttctgcatgtgactt atgtccctgcacaagaaaacttcaactgctcctgccatttgcattgatggaaaagcacacttctcgtgaagggtgctttgtttcaaatggcacacactggttgaacacaaa ggaattttatgaaccacaaatcattactacagacaacacattgtgtctgtaactgtgatgttataaggaattgtcaacaacacagttatgatccttgaacctgaattagactcatt caaggaggagtagataaatatttaagaatcatacatcaccagatgtgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgaacattcaaaaagaaattgaccgctcaatgag</p>
--	--

		<p>gttgccaagaatttaaataaatctctcatcgatctccaagaactggaaagtatgagcagtatataaaaatggccatggtaacatttggctaggtttatagctggcttgattgccatagtaat ggtgacaattatgcttctgtatgaccagttgctgtagttgtctcaagggctgttcttctgtggatcctgtgcaaattgatgaagacgactctgagccagtgctcaaggagtaaa ttacattacacaTAAAAAAAAACAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAA TTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACA AGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCT AGCTGGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCCTGCCCCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAC ATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTT CGGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG AAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGAC CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGT AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGAC CGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCA GCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGT TGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTAC GCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG</p>
15	ORF3	<p>atgttggtttctgtttattgccactagtcttagtcagtggttaactcttacaaccagaactcaattacccctgcatacactaattcttccacagtggtgttattaccctgacaaagttt cagatcctcagtttacattcaactcaggactgttcttacctttcttccaatgtaacttggtccatgctatacatgtctctggaccaatggtaactaagaggttgataaccctgtcctacc atthaatgatggtgtttatttcttccactgagaagttaacataataagaggctggatttttgactacttttagattcgaagaccagtcctactattgttaataacgctactaattgtt tattaaagtctgtaattcaatttgaatgatccattttgggtgttattaccacaaaaaacaacaaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataattgcactttg</p>

	<p>aatatgtctctcagccttttctatggacctgaaggaaaacagggttaattcaaaaatcttagggaattgtgtttaagaatattgatggttattttaaaatattctaagcacacgcctatt aatftagtcgtgatctccctcagggttttcggctttagaaccattggtagattgccaataggtattaacatcactaggttcaaactttacttgctttacatagaagftattgactcctggg gattctcttcaggttgacagctggctgctgcagcttattatgtgggtatcttcaacctaggactttctattaaaatataatgaaaatggaaccatta cagatgctgtagactgtgcacttg accctctcagaacaaagtgtacgttgaaatccttactgtagaaaaggaatctatcaaacttctaactttagagtccaaccaacagaatctattgttagattcctaataatcaaaact tgtgcccttttggtgaagttttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatcattttccact ttaagtgttatggagtgtctcactactaaattaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaattagaggtgatgaagtcagacaaatcgtccagggcaactggaaag attgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaftctaacaatcttgattctaagggtgggtaattataattacctgtatagattgttaggaagctta atctcaaaccttttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacaccttgaatgggtgtgaaggtttaattgtactttcctttacaatcatatggtttccaaccactaat gggtgtggttaccaaccatacagagtagtagtactttttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaatttggttaaaaacaaatgtgtcaatttcaact tcaatggtttaacaggcacaggtgttcttactgagtcaacaaaagtttctgcctttcaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttga gattcttgacattacacatgttcttttgggtgtgtcagtggtataacaccaggaacaaacttctaaccaggttctgttctttatcaggatgtaactgcacagaagtcctgttctatt catgcagatcaacttactcctacttggcgtgttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctgttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtggtgacatacc cattgggtcaggtatatgcgctagtatcagactcagactaattctcctggcagcggcagcagtgtagctagtaatccatcattgcctacactatgtcacttgggtcagaaaattcagtt gcttactctaataactctattgccatacccacaaatttactattagtggtaccacagaaattctaccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgacaatgtacatttgggtgattcaa ctgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgta cacaattaaaccgtgcttactggaatagctgttgaacaagacaaaaacccaagaagttttgcacaagtcaaca aatttcaaaaacaccaccaattaaagatttgggtgggttttaattttcacaatattaccagatccatcaaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctactttcaacaaagtgacactt gcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttgggtgatattgctgctaggacctcatttgtcacaaaagtttaacggccttactgtttgccacctttgctcagatgaaat gattgctcaatacacttctgactgttagcgggtacaatcacttctggttggacctttgggtcaggtgctgcattacaaataccatttgcataatggcttataggttaattggtattgg agttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatttaatagtgctattggcaaaattcaagactcacttctccacagcaagtcacttggaaaacttcaagat gtggccaacaaaatgcacaagctttaaacacgcttgttaacaacttagctccaattttgggtgcaatttcaagtgttttaaatgatatcctttcacgtcttgaccctcccagaggtgaagt gcaaatgataggtgatcacaggcagacttcaagttgca gacatatgtgactcaacaattaagagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctgactaaaatgtcaga gtgtgacttggacaatcaaaaagagttgatttttggaaa gggctatcatcttatgtccttccctcagtcagcacctcatgggtagcttcttgcagtgacttatgtccctgcacaa ga</p>
--	--

		aaagaacttcacaactgctcctgccatttgcgatgatggaaaagcacacttctcctggaagggtctttgtttcaaatggcacacactggtttgaacacaaaggaattttatgaaccac aaatcattactacagacaacacatttgtgtctggtaactgtgatgttgaataggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcattcaaggaggagttgat aaatattttaagaatcatacatcaccagatgttgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaaccattcaaaaagaattgaccgcctcaatgaggttgccaagaatttaaat gaatctctcatc gatctccaagaactggaaagtatgagcagtatataaaatggccatggtacatttggctaggtttatagctggcttgattgccatagtaatggtgacaattatgctttg ctgtatgaccagttgctgtagttgtctcaagggctggtgtcttggatcctgctgcaaatgatgaagacgactctgagccagtgctcaaaggagtaaattacattacacaTAA
16	p5	AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAACGCAATACGCTGGCTA TCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACAGAAAACGATCCGCCATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCA CGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAA ACGGCCATTTTCCACCATAATGTTCCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTCACCACCAGATCTTCGCCATCCGG CATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCTGA TCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAG GTCGCCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGA TGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCCAGCAGCAGCCAATCACGGCCCGCTTCGGTCACCACA TCCAGCACCGCCGCACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCG TTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTTACAAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCC GCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTA CCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTG TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCAT TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT GGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTTCCGGTGCGGGCCT

	<p>CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAA GGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGGAAGCCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTTCGTG TGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAACAAAAAAACAAAA AAAAAACCAAAAAACAAAACACAacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgttgtctatatgttatttccaccatattgccgtctttg gcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtctcttgacgagcattcctaggggtcttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctct ggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgaccttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcggccaaaagccacgtgataagatacacctgc aaaggcggcacaacccagtgccacgttgtagttggatagttgtgaaagagcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccat tgtatgggatctgatctgggacctcgggtcacatgctttacatgttttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccgaaccacggggacgtggtttccttgaaaaacacgatga taataGCCACCatgttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtgttaacttacaaccagaactcaattaccctgcatacactaattcttcacacgtggtgttatta ccctgacaaagtttcagatcctcagtttacattcaactcaggactgttctacctttctttccaatgttacttgggtccatgctatacatgtctctggaccaatggtactaagaggttga taacctgtcctaccattaatgatggtgtttatttgcctcactgagaagttaacataataagaggctggatttttggactacttttagattcgaagaccacgtcctactattgttaata acgctactaatgtgttattaaagtctgtgaattcaattttgtaatgatccattttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaagttggatggaaagtgagttcagatgttattctagtgcg aataattgcactttgaaatgtctctcagcctttcttatggaccttgaaggaaaacagggtaatttcaaaaatcttagggaatttgtgttaagaatattgatggtattttaaataatattc agcacacgcctattaatttagtgcgtgatctccctcagggttttcggctttagaacattggtagattgccaataggatattacatcactaggtttcaacttacttgccttacatagaag ttattgactcctggtgattcttctcaggttggacagctggtgctgcagcttattatgtgggtatcttcaacctaggactttctattaaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctg tagactgtgcacttgacctctcagaacaaggtgtacgttgaatcctcactgtagaaaaggaatctatcaaacttcaacttagagtccaaccaacagaatctattgttagatt cctaataattacaactgtgcccttttggtagaagtttaacgccaccagatttgcactgtttatgcttggaaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataatc cgcatcatttccacttttaagtgttatggagtgtcctactaaattaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcattgttaagaggtgatgaagtcagacaaatcgctccag ggcaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttgaattctaacaatctgattctaagggttggtaattataaattaccctgatag</p>
--	---

	<p>attgttaggaagtctaactcaaacctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccgtagcacacctgtaatggtgtgaaggtttaattgttactttccttacaatcatatg gtttccaaccactaatggtgttggttaccatacagagtagtagtactttctttgaaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaatttggttaaaaaca aatgtgtcaattcaactcaatggftaacaggcacaggtgttctactgagtcaaaaaagtttctgccttccaacaattggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgt gatccacagacacttgagattctgacattacaccatgttctttgggtgtcaggttataacaccaggaacaatacttctaaccagggtgctgttctttatcaggatgtaactgcaca gaagtcctgttgcattcatgcagatcaactfactcctacttggcgtgttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctgttfaataggggctgaacatgtcaacaactcat atgagtgtagacataccattgggtgcaggatatgcgctagtatcagactcagactaattctcctggcagcgcagcaggtgtagctatgcaatccatcattgctacactatgtcacttg gtgcagaaaattcagttgcttacttaataactctattgccataccacaaattttactattagtgttaccacagaaattctaccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgt acatttgggtgattcaactgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgctttaactggaatagctgttgaaacaagacaaaacaccaagaagt ttgcacaagtcaaacaaatttcaaaaaccaccaattaaagatttgggtggttttaattttcacaatattaccagatc caaaaaccaagcaagaggtcattttgaagatctacttt tcaacaagtgacacttgcatgctggcttcatcaaaaatattggtgattgccttgggtgatattgctgctaggacacctattgtgcacaaaagtttaacggccttactgtttgccacct ttgctcacagatgaaatgattgctcaatacacttctgactgttagcgggtacaatcacttctggttggaccttgggtgcaggtgctgcattacaaataccattgctatgcaaatggcttat aggttfaatggtattggagttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatttaatagtgctattggcaaaattcaagactcactttctccacagcaagtgcact tggaaaactcaagatgtggtcaacaaaatgcacaaagctttaaaccgctttaaacaacttagctccaattttgggtgcaatttcaagtgtttfaatgatactttcacgttggacc tcccagggtgaagtgcaaattgataggttgatcacaggcagacttcaaagtttgcagacatatgtgactcaacaattaattagagctgcagaaatcagagcttctgctaatcttgctg ctactaaaatgtcagagtggtacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaaagggtatcatcttatgctctccctcagtcagcacctcatgggtgtagtcttctgcatgtgactt atgtccctgcacaagaaaagaacttcaactgctcctgccatttgcattgatggaaaagcacacttctcgtgaaggtgtctttgtttcaaatggcacacactggttgtaacacaaa ggaattttatgaaccacaatcattactacagacaacacatttgtgctggttaactgtgatgttgaataggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcatt caaggaggagttagataaatattttaaagaatcatacatcaccagatgttatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacttcaaaaagaattgaccgctcaatgag gttccaagaatttaaatgaatctctcatgactccaagaactggaaagtatgagcagtatataaatggccatggtagcatttggctaggtttatagctggcttgattgccatagtaat gggtgacaattatgctttgctgtTAAAAAAAAACAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTT AAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGC</p>
--	---

		ATATCTAGCTGGGCCTCATGGGCCTTCCCTTTCCTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGC ATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC GGTCGTTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG CCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGA GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTG TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTC ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCA GCCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACT GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAA AAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGC AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGA ACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG
17	ORF5	atgtttgttttctgtttattgccactagtcttagtcagtgtgtaactttacaaccagaactcaattacccctgcatacactaattctttcacacgtggtgtttattaccctgacaaagt cagatcctcagtttacattcaactcaggactgttcttacctttctttccaatgttacttgggtccatgctatacatgtctctgggaccaatggfactaagaggttgataaccctgtcctacc atthaatgatggtgtttatgttccactgagaagttaacataataagaggctggatttttggtactacttagattcgaagaccagtcctactattgttaataacgctactaattgtgt tattaaagtctgtgaattcaattttgtaatgatccattttgggtgttattaccacaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataattgcactttg aatatgtctcagcctttcttatggacctgaaggaaaacagggttaattcaaaaatcttaggaattgtgttaagaatattgatggtattttaaaatataattctaagcacacgcctatt aatttagtgcgtgatctccctcagggttttcggctttagaaccattggttagattgccaataggattataacatcactaggttcaactttacttgccttacatagaagttattgactcctggt gattcttctcaggttgacagctggtgctgcagcttattatgtgggtatcttcaacctaggactttctattaaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcactg accctctctcagaacaaagtgtacgttgaaatcttactgtagaaaaggaatctatacaacttcaactttagagttcaaccaacagaatctattgttagatttctaataatacaact tgtgccctttggtgaagttttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggaaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatcattttccact

	<p>ttaagtgttatggagtgtcctactaaattaaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaattagaggatgaagtcagacaaatcgctccagggcaactggaaag attgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattctaacaatcttgattctaaggtgggtgtaattataattacctgatagattgttaggaa atctcaaaccctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatgggtgtgaaaggtttaaattgttacttctttacaatcatatggtttccaaccactaat gggtgtggtaccaaccatacagagtagtagtactttttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagctactaattgggttaaaaacaatgtgtcaatttcaact tcaatggtttaacaggcacagggtgttcttactgagtctaaacaaaagtttctgcctttcaacaattggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttga gattcttgacattacacatgttctttgggtgtcagtgtataacaccaggaacaaatacttctaaccagggtgctgttctttatcaggatgtaactgcacagaagtccctgttgcatt catgcagatcaacttactcctacttggcgtgtttattctacaggttctaattgttttcaaacacgtgcaggctgttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtgacatacc cattgggtgcaggtatatgctgtagttatcagactcagactaattctcctggcagcgcagcagctgtagctagtcaatccatcattgcctacactatgtcacttgggtgcagaaaattcagtt gcttactctaataacttattgccatacccacaaatttactattagtggtaccacagaaattctaccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattcaa ctgaatgcagcaatctttgtgcaatattggcagttttgtacacaattaaaccgtgcttactggaatagctgttgaacaagacaaaaaccccaagaagttttgcacaagtcaaca aatttacaacaccaccaattaaagatttgggtggttttaattttcacaatattaccagatccatcaaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctactttcaacaagtgacactt gcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttgggtgatattgctgctagggacctcatttgcacaaaagttaacggccttactgtttgcacacttctcacagatgaaat gattgctcaatacacttctgactgttagcgggtacaatcattctggttggaccttgggtgcaggtgctgcattacaaataaccatttgcataatggcttataggtttaatggattgg agttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatttaagtctattggcaaaattcaagactcacttctccacagcaagtcacttggaaaacttcaagat gtggtcaacaaaatgcacaagctttaaacacgctgttaacaacttagctccaatttgggtgcaatttcaagtgttttaaatgatatccttccacgtcttgacctcccagggtgaaat gcaattgataggtgatcacaggcagacttcaaagttgcaagacatattgactcaacaattaaffagagctgcagaaatcagagcttctgtaacttctgctactaaaatgtcaga gtgtgacttggacaatcaaaaagagttgatttttggaaaagggtatcatcttctgcttccctcagtcagcacctcatgggtgtagtcttctgcatgtgacttatgtccctgcacaaga aaagaactcacaactgctcctgcatgtgatggaaaagcacacttctcctgtaaggtgtctttgttcaaatggcacacactggttgaacacaaaaggaattttatgaaccac aatcattactacagacaacacattgtgtctgtaactgtgatgttgaataggaattgtcaacaacacagttatgatccttgcacactgaattagactcattcaaggaggagttagat aaatatttaagaatcatacatcaccagatgtgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaattgaccgcctcaatgaggttgccaagaatttaaa gaatctctcatcgcacagaacttggaaagtatgagcagatataaaatggccatggtacatttggctaagttttatagctggcttattgcatagtaattgtgacaattatgcttgg ctgtTAA</p>
--	--

18	P7	<p>AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAAACGCAATACGCTGGCTA TCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAACGATCCGCCATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCA CGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAA ACGGCCATTTTCCACCATAATGTTTCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTCAACCACCAGATCTTCGCCATCCGG CATGCTCGCTTTCAGACGCGAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCTGA TCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAG GTCGCCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGA TGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCAGCAGCAGCCAATCACGGCCCGCTTCGGTACCACA TCCAGCACCGCCGCACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCG TTCAGCGCACCGCTCAGATCGTTTTTCACAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCC GCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTA CCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTG TTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCAT TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT GGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCT CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAA GGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGGAAGCCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTTCGTG</p>
----	----	---

	<p>TGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAACAAAAAAACAAAA AAAAAACCAAAAAACAAAAACACAacgttactggccgaagccgcttgaataagccggtgtgcgtttgtctatatttccaccatattgccgtctttg gcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtctcttgacgagcattcctaggggtcttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggagcagttcctct ggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgc aaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccccat tgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggtttccttgaaaaacacgatga taataGCCACCatgtttgttttctgtttattgccactagtctctagtgcagtggttaactcttacaaccagaactcaattacccctgcatacactaattcttcacacgtggtgttatta ccctgacaaagtttcagatcctcagtttacattcaactcaggattgttcttacctttctttccaatgttacttggttccatgctatacatgtctctgggaccaatggtactaagaggttgat aacctgtcctaccattaatgatggtgttttttcttccactgagaagctaacataataagaggctggatctttggactactttagattcgaagaccagtcctactattgttaataa cgctactaatgtgttattaaagctgtgaattcaatttgaatgatccattttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaagttggatggaaagtgaagtcaagtttattctagtgcga ataattgcactttgaatatgtctctcagcctttcttatggaccttgaaggaaaacaggtaatttcaaaaacttagggaatttggtttaagaatattgatggttattttaaataatattctaa gcacacgcctattaatftagtgcgtgatcctcctcagggttttcggctttagaaccattggtagatttccaataggatatacatcactaggttcaaacttacttgccttacaagaatt atftgactcctggtgattcttctcaggttggacagctggtgctgcaacttattatgtgggttacttcaacctaggactttctattaaaataatgaaaatggaaccattacagatgctgt agactgtgcacttgaccctctctcagaaacaaagtgtacgttgaatccttactgtagaaaaaggaatctatcaaaacttcaactttagagtccaaccaacagaatctattgttagatttc ctaatafacaaacttgccttttgggaagttttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggaacagggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgcctatataattcc gcatcatttccacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaatfagaggtgatgaagtcagacaaatcgtccagg gcaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatattttacaggctgcgttatagcttggaaattcaacaatcttatttaagggttggtaattataattactgtatagat tgtttaaggagtctaactcaaacctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccgtagcacacttgaatggtgttgaaggtttaattgttacttctttacaatcatatggt ttccaaccactaatggtgttggttaccaaccatacagagtagtagtacttttgaacttctacatgcaccagcaactgttggacctaaaaagtctactaatttggttaaaaacaaa tgtgtcaattcaactcaatggtttaacaggcagaggtgttcttactgagtcaacaaaaagtttgcctttcaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgat ccacagacacttgagattcttgacattacacatgttcttttgggtgtcaggttataaccagggaacaaatacttcaaccagggtgctgttcttatcaggatgttaactgcacagaa gtccctgttctattcatgcagatcaacttactcctcttggcgtgtttattctacagggttcaatgttttcaaacacgtgcaggctgttfaatagggctgaacatgtcaaacactcatatg</p>
--	---

	<p>agtgtgacatacccattggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagactaattctcctggcagcgcagcagtgtagctagtcfaatccatcattgcctacactatgtcacttggtg cagaaaattcagttgcttactctaataactctattgccatacccacaaatcttactattagtgttaccacagaaattctaccagtgctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacat ttgtggtgattcaactgaatgcagcaatctttgttgcaatatggcagttttgtacacaattaaccgtgcttfaactgggatagctggtgaacaagacaaaaacaccaagaagttttg cacaagtcaacaaatftacaaaacaccaccaattaagattttggtggtttaattttcacaatattaccagatccatcaaaaccaagcaagaggcattattgaagatctactttca acaagtgcacttgcagatgctggctcatcaacaatatggtgattgccttgggtgatattgctgctagggacctcatttgtgcacaaaagttaacggccttactgtttgccaccttg ctcacagatgaaatgattgctcaatacacttctgcactgtagcgggtacaatcacttctggttgacctttgggtgcaggtgctgcattacaataaccattgctatgcaaatggcttatg gttaatggtattggagttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatftaatagtgccattggcaaaattcaagactcactttctccacagcaagtgacttg gaaaactcaagatgtggtcaacaaaaatgcacaagcttfaaacacgcttgtaaacacttagctccaatttgggtgcaattcaagtgtttaaatgatacctttcacgtcttgaccctc ccgaggtgaagtgcaaatgataggtgatcacaggcagactcaagtttgcagacatatgtgactcaacaattaattagagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctgct actaaaatgtcagagtgtgacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaagggtatcatcttatgtccttccctcagtcagcacctcatggtgtagtcttcttcatgtgacttat gtcctgcacaagaaaagaactcacaactgctcctgccatttgcctgatggaagagcacttctcctggaaggtgctttgttcaaatggcacacactggtttgtaacacaaagg aattttatgaaccacaaatcattactacagacaacacatttgtgctggttaactgtgatggttaataaggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcattca aggaggagtagataaatfttaagaatcatacatcaccagatggtgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgctcaatgaggtt gccaagaatttaaatgaatctctcatcgcactccaagaactggaaagtatgagcagGGGTATATCCCTGAAGCCCCCAGGGACGGCCAGGCTT ACGTCAGAAAGGATGGAGAGTGGGTGCTCTTGAGCACCTTCCTGTAAAAAACAACAAAACAAAACGGCTA TTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGC TCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAGCTGGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCCTGCGTATTGGGCGCTCT TTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGCTCT CCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAAGG CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA GCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTC</p>
--	---

		CCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCT TCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGC TGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA CCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCG CTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTA GCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG
19	ORF7	atgtttgttttctgtttattgccactagtcttagtcagtgtgtaactttacaaccagaactcaattacccctgcatacactaattcttcacacgtggtgttattaccctgacaaa gtttt cagatcctcagtttacattcaactcaggattgttcttaccttttccaatgttacttggtccatgctatacatgtctctgggaccaatggtactaagaggtttgataaccctgtcctacc attaatgatggtgtttattttgctccactgagaagttaacataataagaggctggatctttggfatacttttagattcgaagaccagtcctactattgttaataacgctactaatgttgt tattaaagtctgtgaattcaattttgtaatgatccattttgggtgttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataattgcactttg aatatgtctctcagccttttctatggacctgaaggaaaacagggtaatttcaaaaacttagggaattgtgttaagaatattgatggttattttaaaatattctaaagcacacgcctatt aatftagtcgtgatctccctcagggttttcggctttagaaccattggtagattgccaataggatattaacatcactaggttcaaactttacttgctttacatagaagttattgactcctggt gattcttctcaggtggacagctggtgctgcagcttattatgtgggtatcttcaacctaggactttctattaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcacttg accctctcagaaacaaagtgtacgttgaaatcttactgtagaaaaggaaatctatacaacttctaacttagagtccaaccaacagaatctattgttagatttctaataattacaact tgtgcccttttggtgaagttttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctataataatccgcacatctttccact tttaagtgttatggagtgtctcactactaaattaatgatctctgctttactaatgtctatgcagattcatttgaattagaggtgatgaagtca gacaaatcgctccagggcaaacggaaag attgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttata gcttggaaftctaacaatcttgattctaagggtggtgtaattataattacctgtatagattgttaggaagtc ta atctcaaaccttttgagagagatatttcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatggtgttgaaggtttaattgttactttccttacaatcatatggtttccaaccactaat gggtgttggtaccaaccatacagagtagtagtactttttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaatttggttaaaaacaatgtgtcaatttcaact tcaatggtttaacaggcacaggtgttcttactgagtctaaacaaaagtttctgcctttccaacaattggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttga

		<p>gattcttgacattacccatgttcttttgggtgtcagtggtataacaccaggaacaaacttctaaccaggtgctgttctttatcaggatgtaactgcacagaagtccctgttgctatt catgcagatcaacttactcctacttggcgtgtttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctgttaataaggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtgacatacc cattgggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagactaattctcctggcagcggcagcagtgtagctagtcfaatccatcattgcctacactatgtcacttggcagaaaattcagtt gcttactctaataactctattgccatacccacaaatttactattagtggtaccacagaaattctaccagtgctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattcaa ctgaatgcagcaatcttttggcaaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgctttaaactgggtagctgttgaacaagacaaaacacccaagaagttttgcacaagtcaaaaa aatttacaaaacaccaccaattaagatttgggtgggttttaattttcacaaatattaccagatccataaaaccaagcaagaggtcattttgaagatctactttcaacaaagtgacactt gcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttggatattgctgctagggacctcatttgtcacaaaagttaacggccttactgtttgccaccttctcacagatgaaat gattgctcaatacacttctgactgttagcgggtacaatcattctggtggaccttggcaggtgctgcattacaataccatttctatgcaaatggcttataggttaatggattgg agttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatftaatagtgccattggcaaaattcaagactcactttctccacagcaagtgcacttggaaaacttcaagat gtggcaacaaaatgcacaagcttfaaacacgctgttaaacacttagctccaatfttgggtcaatttcaagtggttttaaatgatatcctttcacgtcttgacctcccgaggctgaagt gcaattgataggtgatcacaggcagacttcaagttgacagacatattgactcaacaattaatagagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctgactaaaatgtcaga gtgtgacttggacaatcaaaaagagtgatttttggaaaaggctatcatctatgccttccctcagtcagcacctcatgggtagcttcttgcagtgacttatgtcctgcacaaga aaagaactcacaactgctcctgcatgtgatggaaaagcacacttctcctggaaggtgctttgtttcaaatggcacacactggttgaacacaaaggaattttatgaaccac aatcattactacagacaacacttgtgtctgtaactgtgatgttgaataggaattgcaacaacacagttatgatccttggcaacctgaattagactcattcaaggaggagttagat aaatatttaagaatcatacatcaccagatgtgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgaggttgccaagaatttaaat gaatctctcatcgatctccaagaactggaaagtatgagcagGGGTATATCCCTGAAGCCCCAGGGACGGCCAGGCTTACGTCAGAA AGGATGGAGAGTGGGTGCTCTTGAGCACCTTCCTGTAA</p>
20	P9	<p>AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAAACGCAATACGCTGGCTA TCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAACGATCCGCCATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCA CGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAA ACGGCCATTTTCCACCATAATGTTCCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTCACCACCAGATCTTCGCCATCCGG</p>

	<p>CATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCTGA TCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAG GTCGCCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGA TGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCAGCAGCAGCCAATCACGGCCCCTTCGGTCACCACA TCCAGCACCGCCGCACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCG TTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTACAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCC GCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTA CCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTG TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCAT TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT GGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCT CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAA GGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGGAAGCCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTG TGGGTTCAAGTCCCTCCACCCACGCCGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAACAAAA AAAAAACCAAAAAACAAAACACAacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgttgtctatatgtattttccaccatattgccgtctttg gcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggagcagttcctct ggaagcttctgaagacaacaacctgttagcgacctttgaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcgggccaaaagccacctgtataagatacacctgc aaaggcggcacaacccccagtgccacggtgtgagttggatagttgtgaaagatgcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccccat</p>
--	---

	<p>tgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggftaaaaaacgtctaggccccgaaccacggggacgtggtttcccttgaaaaacacgatga taataGCCACCatgtttgttttctgtttattgccactagctctagtcagtggttaatttacaaccagaactcaattacccctgcatacactaattcttcacacgtgggtgttatta ccctgacaaagtttcagatcctcagttttacattcaactcaggattgttcttacctttctttccaatgttacttggttccatgctatacatgtctctgggaccaatggfactaagaggttgat aacctgtcctaccatttaatgatgggtgttattttgcttccactgagaa gctaacataataagaggctggatcttggfactactttagattcgaagaccagtcctacttattgttaataa cgctactaatgtgttattaaagctgtgaattcaatttgaatgatccattttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaagttggatggaaagtgagttcagagtttattctagtgcga ataattgcactttgaaatgtctctcagcctttctatggaccttgaaggaaaacagggaatttcaaaaatcttaggggaatttggtttaagaatattgatgtttttaaatataattctaa gcacacgcctattaatttagtgcgtgatctccctcagggttttcggctttagaaccattgtagatttccaataggattataacatcactaggttcaaaacttacttgccttacaagaagt atgtgactcctgggtgattcttctcagggtggacagctgggtgctgcagcttattatgtgggtatcttcaacctaggactttctattaaaataatgaaaatggaaccattacagatgctgt agactgtgcacttgacctctcagaaacaaagtgacgttgaatccttactgtgaaaaaggaatctatcaaaacttaactttagagccaaccaacagaatctattgttagatttc ctaataatacaaaactgtgcccttttgggaagttttaacgccaccagattgcactgtttatgcttggaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctataatcc gcatctttccactttaagtgttatggagtgtctcactaaattaaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaatagaggatgaagtcagacaaatcgtccagg gcaaaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattcaacaatcttgattctaagggtgggtgtaattataattacctgtatagat tgttta ggaagtctaactcaaacctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacaccttgtaatgggtgtgaaagtttaattgttactttcctttacaatcatatgg ttccaaccactaatgggtgttggttaccaaccatacagagtagtagtacttttgaacttctacatgcaccagcaactgttggacctaataaagtctactaatttggttaaaaacaaa tgtgtcaattcaactcaatggtttaacaggcacagggtgttcttactgagcttaacaaaaagtttctgcctttcaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgat ccacagacacttgagattcttgacattacaccatgtcttttgggtgggtcaggttataacaccaggaacaaataacttcaaccagggtgctgttcttatcaggatgttaactgcacagaa gtcctgttgctattcatgcagatcaactactcctacttggcgtgtttattctacagggttcaatgttttcaaacacgtgcaggctgtttaatagggctgaacatgtcaacaactcatatg agtgtgacataccattgggtcaggtatatgcgtagtatacagactcagactaattctcctggcagcggcagcagtgtagctagcaatccatcattgcctacactatgtcacttgggtg cagaaaattcagttgcttacttaataactctattgccataccacaaatttactattagtgtaccacagaaattctaccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacat ttgtgggtgattcaactgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgcttfaactgggatagctgttgaacaagacaaaaacccaagaagttttg cacaagtcaacaaaattcaaaaacaccaccaattaaagattttgtgtgttttaattttcacaataattaccagatccatcaaaaaccaagcaagaggctatttattgaagatctactttca acaaagtgacacttgacagatgctggctcatcaacaatatgggtgattgccttgggtgatattgctgctagggacctatttgcacaaaagtttaacggccttactgtttgccaccttg</p>
--	---

	<p>ctcacagatgaaatgattgctcaatacacttctgactgtagcgggtacaatcacttctggttgaccttgggtgcaggtgctgcattacaaataccatttgctatgcaaatggcttatag gtftaatggtattggagttacagaatgttctctatgaaacaaaaattgattgccaccaatftaatagtgccattggcaaaatcaagactcactttctccacagcaagtgcacttg gaaaactcaagatgtggtcaacaaaaatgcacaagctttaaacacgcttgttaacaacttagctccaatttgggtcaattcaaggttttaaatgatacctttcacgtcttgaccctc ccgaggctgaagtgcaaatgataggtgatcacaggcagactcaagttgcagacatatgtgactcaacaattaatagagctgcagaaatcagagcttctgctaatcttgctgct actaaaatgcagagtgtgacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaagggtatcatcttatgctctccctcagtcagcacctcatggtgtagcttcttgcatgtgacttat gtcctgcacaagaaaagaactcacaactgctctgccatttgcctgatggaagacacacttctcgtgaaggtgctttgttcaaatggcacacactgggttgaacacaaaagg aattttatgaaccacaaatcattactacagacaacacatttgtgctggaactgtgatgttgaataggaaatgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcattca aggaggagtagataaatatttaagaatcatacatcaccagatgtgatftaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaatgaccgcctcaatgaggtt gccaagaatttaaatgaatctctcatgactccaagaactggaaagatgagcagtatataaatggccatggtacatttggctaggttttatagctggcttattgccatagtaattgt gacaattatgcttctgtatgaccagttgctgtagtctcaagggtgtgtcttgatgctcgtgcaaatgtgaagacgactctgagccagtctcaaggagtcattac attacacaTAAAAAAACAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAATT GAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAG GCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAG CTGGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCCTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACAT GGTCATAGCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCG GGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCT GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA CCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTG CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGT ATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCCTG GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC</p>
--	---

		GGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGT AGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGC AGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCA CGTTAAGGGATTTTGGTCATG
21	ORF9	atgttggtttctgtttattgccactagtcttagtcagtggttaattctacaaccagaactcaattacccccctgcatacactaattcttcacacgtgggtgttattaccctgacaaagt cagatcctcagtttacattcaactcaggattgttcttaccttttccaatgttacttgggtccatgctatacatgtctctgggaccaatgggtactaagaggttgataaccctgtcctacc attaatgatgggtgtttatttcttccactgagaagtcaacataataagaggctggatctttggtactacttta gattcgaagaccagtcctacttattgtaataacgctactaatgtgt tattaaagtctgtgaattcaatttgaatgatccatttgggtgttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataatgcactttg aatatgtctctcagcctttcttatggacctgaaggaaaacagggtaattcaaaaatcttagggaatttgggttaagaatattgatgggtattttaaaatattctaagcacacgcctatt aatttagtgcgtgatctccctcagggttttggcctttagaacattggttagattgc caataggtattaacatcactaggttcaaacttactgctttacatagaagttattgactcctgg gattcttctcaggtggacagctgggtgctgcagcttattatgtgggttatcttcaacctaggactttctattaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcactg accctctcagaacaaagtgtacgttgaatcctcactgtagaaaaggaatctataaacttacttagagtccaaccaacagaatctattgtagattcctaattacaact tgtgccctttgggtgaagttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatcattttccact ttaagtgttatggagtgtctcactactaaattaaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaattagaggatgaagtgcagacaaatcgtccaaggcaactggaaag attgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattcaacaatcttgattctaagggtgggtgtaattataattacctgtatagattgttggaaagtcta atctcaaaccctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatgggtgtgaaagtttaattgttacttcccttacaatcatatggttccaaccactaat gggtgtggttaccacatacagagtagtagtacttttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaatttgggttaaaaacaatgtgtcaatttcaact tcaatgggttaacaggcacaggtgttcttactgagtcaacaaaagtttctgccttccaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacactga gattcttgacattacacatgttctttgggtgtcagtggtataacaccaggaacaaacttctaaccaggtgctgttctttatcaggatgttaactgcacagaagtccctgttctatt catgcagatcaacttactcctacttggcgtgttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctgttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtgacatacc cattggtgcaggtatatgcgctagtattcagactcagactaattctcctggcagcgcagcagtgtagctagtcaatccatcattgcctacactatgtcacttgggtgcagaaaattcagtt gcttactctaataactctattgccatacccacaaatttactattaggttaccacagaaattctaccaagtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattcaa

		<p>ctgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgctttaactgggatagctgttgaacaagacaaaaacaccaagaagttttgcacaagtcaaca aatttcaaaaacaccaccaattaaagatttgggtggtttaattttcacaatattaccagatccatcaaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctactttcaacaagtgacactt gcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttggatattgctgctagggacctcatttgcacaaaagttaacggccttactgtttgccaccttctcacagatgaaat gattgctcaatacacttctgcactgtagcgggtacaatcactctgggtggaccttgggtgcaggtgctgcattacaataaccatttgcataatggcttataggttaatggattgg agttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatttaagtgcattggcaaaattcaagactcacttctccacagcaagtgcacttgaaaacttcaagat gtgtcaacaaaatgcacaagctttaaacacgctgttaacaacttagctccaatttgggtcaatttcaagtgttttaaatgatcctttcacgtcttgaccctcccagggtgaagt gcaaatgataggtgatcacaggcagacttcaaagttgcaacatattgactcaacaattaatagagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctactaaaatgtcaga gtgtgacttggacaatcaaaaagagtgattttgtggaaagggtatcatctatgctctccctcagtcagcacctcatgggtgtagtcttctgcatgtgacttatgctcctgcacaaga aaagaactcacaactgctcctgctcatttgcataatgaaagcacaacttctcctggaaggtgctttgtttcaaatggcacacactggttgaacacaaaggaattttatgaaccac aatcattactacagacaacacatttgtgctgtaactgtgatgttgaataggaattgcaacaacacagttatgatccttgcacactgaattagactcattcaaggaggagttgat aaatatttaagaatcatacatcaccagatgtgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaattgaccgctcaatgaggttccaagaatttaaat gaatctctcatcgatctccaagaactggaaagatgagcagtatataaatggccatggtacatttggctagggtttatagctggcttgattgcatagtaattggtgacaattatgctttg ctgtatgaccagttgctgtagttgtctcaagggtgtgttcttgggatcctgctgcaatttggatgaagacgactctgagccagtgctcaaaggagcaaatcattacacataTAA</p>
22	P11	<p>AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAAACGCAATACGCTGGCTA TCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAACGATCCGCCATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCA CGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAA ACGGCCATTTTCCACCATAATGTTTCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTCACCACCAGATCTTCGCCATCCGG CATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCTGA TCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAG GTCGCCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGA TGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCAGCAGCAGCCAATCACGGCCCGCTTCGGTCACCACA</p>

	<p>TCCAGCACCGCCGCACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCG TTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTACAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCC GCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTA CCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTG TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCAT TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT GGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCT CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAA GGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGGAAGCCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTTCGTG TGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAACAAAA AAAAAACCAAAAAACAAAACACAacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgtatttccaccatattgccgtctttg gcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggagcagttcctc ggaagcttctgaagacaacaactgtctgtagcgaccttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgc aaaggcggcacaacccagtgccacgttgtagtggatagttgtgaaaga gcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccccat tgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaacgtctaggcccccgaaccacggggacgtggtttcctttgaaaaacacgatga taataGCCACCatgtttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtgtgtaactcttacaaccagaactcaattaccctgcatacactaattctttcacacgtggtgttatta ccctgacaaagtttcagatcctcagttttacattcaactcaggattgttcttaccttttccaatgttacttggttccatgctatacatgtctctgggaccaatggtaactaagaggttgat aacctgtcctaccatthaatgatggtgtttattttgcttccactgagaagttaacataataagaggtggatctttggtactactttagattcgaagaccagtcctacttattgttaataa</p>
--	--

	<p>cgctactaatgttggtattaaagtctgtgaattcaatttgaatgatccattttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcga ataattgcactttgaatatgtctctcagcctttcttagaccttgaaggaaaacagggaatttcaaaaaacttagggaatttggtttaagaatattgatggatttttaaaatattctaa gcacacgcctattaatttagtgcgtgatctccctcagggttttcggctttagaacattgtagatttccaataggattataacatcactaggttcaaaccttacttgccttacaagaagt attgactcctgggtattcttctcaggttgacagctgggtgctgcagcttattatgtgggtatctcaacctaggactttctataaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctgt agactgtgcacttgacctctctcagaaacaaagtgtacgttgaatccttactgtagaaaaaggaatctatcaaaccttaactttagagccaaccaacagaatctattgtagatttc ctaataatacaaaccttgccttttggagaagttttaacgccaccagattgcatctgtttatgcttggaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattcc gcatcattttcacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaatagaggtgatgaagtcagacaaatcgtccagg gcaaacggaaagattgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttgaattctaacaatcttgattctaagggtgggtgtaattataattacctgatagat tgtttaggaagtctaactcaaacctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccgtagcacacctgtaattggtgtgaaaggttttaattgttactttccttacaatcatatggt ttccaaccactaatggtgttggttaccaaccatacagagtagtagtacttttgaacttctacatgcaccagcaactgttgggacctaaaaagtctactaatttggftaaaaacaa tgtgtcaattcaactcaatggtttaacaggcacaggtgttcttactgagttaacaaaaagtttctgcctttcaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgat ccacagacacttgagattctgacattacacatgtcttttgggtggtgtcaggttataacaccaggaaacaatacttcaaccagggtgctgttcttatcaggatgttaactgcacagaa gtcctgttctattcatgcagatcaactactcctactggcgtgtttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctgttataagggctgaacatgtcaaacactcatatg agtgtgacataccattggtgcaggtatatgcgctagtatcagactcagactaattctcctggcagcgcagcagtgtagctaatccatcattgcctacactatgctacttgggtg cagaaaattcagttgcttacttaataactctattgccatacccacaaatttactattagtgttaccacagaaattctaccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacat ttgtggtgattcaactgaatgcagcaatctttgttgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgcttfaactgggatagctgttgaacaagacaaaaacccaagaagttttg cacaagtcaaacaaatftacaaaacaccaccaattaaagattttggtggttttaattttcacaatattaccagatccatcaaaaaccaagcaagaaggtcattattgaagatctactttca acaaagtgcacttgcagatgctggctcatcaacaatatggtgattgccttgggtgatattgctgctagggacctcatttgcacaaaagttaacggccttactgtttgccaccttg ctcacagatgaaatgattgctcaatacacttctgcactgtagcgggtacaatcacttctggttggaccttgggtgcaggtgctgcattacaataaccatttgcctatgcaaatggcttatag gttfaatggtattggagttacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaacttaataatgaccattggcaaaaatcaagactcactttctccacagcaagtcacttg gaaaactcaagatgtggtcaacaaaaatgcaacagctttaaacacgctttaaacaacttagctccaatttgggtcaattcaagtgtttaaatgatatcctttcagcttgcacctc ccgaggctgaagtcaaatgataggtgatcacaggcagactcaagtttgcagacatatgtgactcaacaattaaatgagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctgct</p>
--	--

	<p>actaaaatgtcagagtgtgacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaaaggctatcatcttatgtccttccctcagtcagcacctcatggtagtcttcttcatgtgacttat gtccctgcacaagaaaagaactcacaactgctctgccatttgcgatgatggaaagcacacttctcctgtgaagggtctttgttcaaatggcacacactggttgtaacacaaagg aattttatgaaccacaaatcattactacagacaacacatttgtgtctggaactgtgatgttgaataggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcattca aggaggagtagataaatatttaagaatcatacatcaccagatgtgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgaggtt gccaagaatttaaatgaatctctcatcgatctccaagaactggaaagatgagcagtatataaaaatggccatggfacatttggctaggtttatagctggcttgattgccatagtaatgg gacaattatgctttgctgtTAAAAAAAACAAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAA ATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCAT ATCTAGCTGGGCCCTCATGGGCCCTTCTTTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAT TAACATGGTCATAGCTGTTTCTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG TCGTTCCGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCG CGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTT CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACG CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCC GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAG AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGAT TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG</p>
--	---

23	ORF11	atgtttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtggttaattctacaaccagaactcaattacccccctgcatacactaattctttcacacgtgggtgttattacctga caaagttt cagatcctcagtttacattcaactcaggattgttcttacctttttccaatgttacttgggtccatgctatacatgtctctgggaccaatggtaactaagaggttgataacctgtcctacc attaatgatgggtgtttattttgcttccactgagaagttaacataataagaggctggatctttggtaactcttagattcgaagaccagtcctacttattgttaataacgctactaatgttgt tattaaagtctgtgaattcaattttgtaatgatccattttgggtgttattaccacaaaaacaacaaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataattgacttttg aatatgtctctcagccttttctatggacctggaaggaaaacagggttaattcaaaaatcttagggaatttggtttaagaatattgatggttattttaaaatattctaagcacacgcctatt aatttagtgcgtgatctccctcagggttttcggctttagaaccattggtagattgccaataggattaacatcactaggttcaaaacttactgtttacatagaagttattgactcctggg gattctcttcaggttgacagctggctgctgagcttattatgtgggttatcttcaacctaggacttttctattaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcacttg acctctctcagaacaaagtgtacgttgaatccttactgtagaaaaggaatctatacaacttctaactttagagtccaaccaacagaatctattgtagattcctaattatacaaaact tgtgcccttttggagaagttttaacgccaccagatttgcactgtttatgcttggacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatcattttccact ttaagtgttatggagtgtctcactactaaattaaatgatctctgttactaatgtctatgagattcatttgaattagaggatgaagtgcagacaaatcgtccagggcaactggaaaag attgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaftctaacaactttagattctaagggtgggtgtaattataattacctgtatagattgttaggaagctta atctcaaaccttttgagagagataattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatgggtgtgaaagtttaattgttacttcccttacaatcatatggtttccaaccactaat gggtgtggttaccacatacagagtagtagtactttttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaagtctactaatttggftaaaaacaatgtgcaatttcaact tcaatggtttaaaccaggcacaggtgttcttactgagttaacaaaagtttctgcctttccaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacactga gattcttgacattacaccatgttcttttgggtgtgtcagtggtataacaccagggaacaaacttctaaccaggtgctgttctttatcaggatgtaactgcacagaagtccctgttctatt catgcagatcaacttactcctacttggcgtgtttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctgttfaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtagacatacc cattggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagactaattctcctggcagcggcagcagtgtagctagtagcaatccatcattgcctacactatgtcattgggtgcagaaaattcagtt gcttactctaataactctattgccatacccacaaattttactattagtgtaaccacagaaattctaccagtgtctatgaccaa gacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattcaa ctgaatgcagcaatcttttgtgcaatattggcagttttgtacacaattaaaccgtgctttaaactgggatagctgttgaacaagacaaaacaccaagaagttttgcacaagtcaaacaa aatttcaaaaacaccaccaattaaagatttgggtgggttttaattttcacaatattaccagatccatcaaaaagcaagaggtcatttattgaagatctactttcaacaaagtgcactt gcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttgggtgatattgctgctagggacctcatttgcacaaaagtttaacggccttactgtttgccaccttctcagatgaaat gattgctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcactctggttggaccttgggtcaggtgctgcattacaaataccatttctatgcaaatggcttataggtttaattggtattgg
----	-------	---

		<p>agttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaccaatftaatagtgccattggcaaaattcaagactcactttctccacagcaagtgcacttggaactcaagat gtgtcaacaaaatgcacaagctttaaacacgctgttaacaacttagctccaatttgggtcaattcaagtgtttaaatgatatccttcacgcttgaccctccgaggctgaagt gcaattgataggtgatcacaggcagacttcaaagttgcaacatatgtgactcaacaattaatagagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctgactaaaatgtcaga gtgtgacttgacaatcaaaaagagtgatgttggaaaaggctatcatctatgtccttcctcagtcagcacctcatggtgtagtcttctgcatgtgacttatgtcctgcacaaga aaagaactcacaactgctcctgcccatttgcgatggaagagcacacttctcctggaaggtgctttgttcaaatggcacacactggttgtaacacaaaaggaattttatgaaccac aaatcattactacagacaacacattgtgtctgtaactgtgatgttgaataggaattgtcaacaacagttatgatccttgaacctgaattagactcattcaaggaggagttagat aaatatttaagaatcatacatcaccagatgttgattaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgctcaatgaggttgccaagaattaat gaatctctcatcgatctccaagaactggaaagatgagcagatataaaatggccatggtacattggctaggtttatagctggcttgattgccatagtaattggtgacaattatgcttg ctgtTAA</p>
24	P13	<p>AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAACGCAATACGCTGGCTA TCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAACGATCCGCCATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCA CGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAA ACGGCCATTTTCCACCATAATGTTCCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTCACCACCAGATCTTCGCCATCCGG CATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCTGA TCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAG GTCGCCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGA TGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCCAGCAGCAGCCAATCACGGCCCGCTTCGGTCACCACA TCCAGCACCGCCGCACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCG TTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTACAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCC GCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTA CCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTG</p>

	<p>TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCAT TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT GGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCT CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAA GGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGGAAGCCCTCGACCGTCGATTGTCCACTGGTCAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTTCGTG TGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCACGCCGAAACGCAATAGCCGAAAAACAAAAACAAAAAAACAAAA AAAAAACAAAAAAACAAAACACAacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcttctatgtttttccaccatattgccgtctttg gcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttctgacgagcattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggagcagttcctct ggaagcttctgaagacaacaacgtctgtagcgacctttgcagggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctgcccgaagaccacgtgtataagatacacctgc aaaggcggcacaacccagtgccacgttgagttggatagttgtggaaagagcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtacccc tgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaacgtctaggcccccgaaccacggggacgtggtttcctttgaaaaacacgatga taataGCCACCatgtttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtgtagagtgcaaccaacagaatctattgttagatttcctaattacaaactgtgccttttgggaagt tttaacgccaccagatttgcatctgtttatgcttgaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatcattttccacttttaagtgttatggagtg ctcctactaaattaaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaattagaggtgatgaagtgcagacaaatcgtccagggcaactggaaagattgctgattataattata aattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttgaattctaacaatcttgattctaaggtggtggtaattataattacctgtatagattgttaggaagtctaactcaaacctttgag agagatatttcaactgaaatctatcaggccgtagcacaccttgaatggtgtgaaagtttaattgttactttcctttacaatcatatggtttccaaccactaatggtgttgtaaccaac catacagagtagtagtactttctttgaacttctacatgcaccagcaactgtttggtgacctaaaagtctactaatttggttaaaaacaatgtgtcaatttcTAAAAAAACA AAAAACAAAACGGCTATTATGCGTTACCGGCGAGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAA</p>
--	--

		<p>ATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAG CCGAAGTAGTAATTAGTAAGACCAGTGGACAATCGACGGATAACAGCATATCTAGCTGGGCCTCATGGGCC TTCCTTTCAGTGCCTGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCC TTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGGTAAAGCCTGGGGT GCCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAG GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTAT AAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATA CCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG TAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGT AACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAG AACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATC TCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTT GGTCATG</p>
25	ORF13	<p>atgttggtttctgtttattgccactagtctctagtcagtgtagagccaaccaacagaatctattgtagattcctaataatacaactgtgccctttggtgaagtttaacgccacca gattgcatctgtttatgcttggaaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatctttccactttaagtggtatggagtgctcctactaaattaa atgatctctgcttactaatgtctatgagattcatttgaattagaggtgatgaagtcagacaaatcgtccagggcaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatgatt ttacaggctgcgttatagcttgaattctaacaatctgattctaaggttggtgtaattataattacctgtatagattggttaggaagctaatctcaaacctttgagagatattcaact gaaatctatcagggcggtagcacacctgtaatggtgtgaaggtttaattgttactttcctttacaatcatatggttccaaccactaatggtgtggttaccacatacagagtagta gtactttctttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggttaaaaacaaatgtgtcaatttTAA</p>

26	ORF33	atgtttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtgtagagtgccaaccaacagaatctattgtagattcctaataattacaactgtgcccttttggtgaagtttaacgccacca gatttgcacccgtgatgcttggaacaggaagagaatcagcaactgtgttctgattattctgtctatataattccgcatctttccacttttaagtgtatggagtgctcctactaaatta aatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaattaagggtgatgaagtcagacaaatcgctccaggcgcaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatga tttacaggctgcgttatagcttggaaattcaacaatcttgattctaagggtgggtaattataattacctgtatagattgttaggaagtctaactcaaacctttgagagagatattcaac tgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatggtgtgaaaggttttaattgtactttcctttacaatcatatggtttccaaccactaatggtgttgggttaccatacagagtagta gtactttctttgaaacttcatatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggttaaaaacaaatgtgtcaatttCAA
27	ORF35	atgtttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtggttaactttacaaccagaactcaattacccccctgcatacactaattctttcacacgtggtgttattaccctgacaaagt cagatcctcagtttacattcaactcaggactgttcttacctttctttccaatgttacttgggtccatgctatacatgtctctgggaccatggtactaagaggttgataacctgtcctac atthaatgatggtgtttatgttcttccactgagaagttaacataataagaggctggatttttggtactacttttagattcgaagaccagtcctacttattgtaataacgctactaatgtgt tattaaagtctgtgaatttcaattttgtaatgatccattttgggtgttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataatgcactttg aatatgtctctcagcctttctatggacctgaaggaaaacagggttaattcaaaaatcttagggaattgtgttaagaatattgatggtattttaaaatataattctaagcacagcctatt aatttagtgcgtgatctccctcagggttttcggctttagaaccattggtagattgc caataggatattaacatcactaggttcaaacttacttgccttacaagaagtattgactcctggt gattcttctcagggtggacagctggtgctgcagcttattatgtgggttatcttcaacctaggactttctattaaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcactg acctctctcagaaacaaagtgtacgttgaatccttactgtagaaaaggaatctatcaaaacttcaactttagagtccaaccaacagaatctattgtagattcctaattacaaact tgtgcccttttggtgaagttttaacgccaccagatttgcacccgtgatgcttggaacaggaagagaatcagcaactgtgttctgattattctgtctatataattccgcatctttccac tttaagtgtatggagtgctcctactaaattaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcatttgaattagagggtgatgaagtcagacaaatcgctccaggcgcaactggaaa gattgctgattataattataaattaccagatgatttacaggctgcgttatagcttggaaattcaacaatcttgattctaagggtgggtaattataattacctgtatagattgttaggaagtc taatctcaaacctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatggtgtgaaaggttttaattgtactttcctttacaatcatatggtttccaaccacta atggtgttgggttaccatacagagtagtagtactttctttgaaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggttaaaaacaaatgtgtcaatttcaa cttcaatggttaacaggcacaggtgttcttactgagcttaacaaaaagtttctgcctttccaacaattggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacactt gagattctgacattacacatgttcttttggtggtgtcagtggttaaacaccaggaacaaatacttcaaccagggtgctgttctttatcaggatgttaactgcacagaagtccctgttgc attcatgcagatcaacttactcctacttggcgtgttattctacaggttctaatgttttcaaacacgtgcaggctgttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtgacata

		<p>cccattggtgcaggtatatgcgctagtatcagactcagactaattctcctggcagcgcagcagtgtagctagtcaatccatcattgcctacactatgtcacttggcagaaaattca gftgcttactctaataactctattgccataccacaaaatttactattagtgtaccacagaaattctaccagtgctatgaccagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattc aactgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgcttfaactggaatagctgttgaacaagacaaaaacaccaagaagttttgcacaagtcaaa caaatttcaaaaaccaccaattaaagatttgggtggttttaattttcacaatattaccagatccatcaaaaccaagcaagaggtcattattgaagatctactttcaaaaagtgaca cttgcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttgggtgatattgctgctagggacctcatttgcacaaaagttaacggccttactgtttgccacctttgctcacagatga aatgattgctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcactctggttggaccttgggtgcaaggctgctgattacaaataccatttgcattgcaaatggcttataggttaatggatt ggagttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatttaatagtctattggcaaaattcaagactcactttctccacagcaagtgacttggaaaacttcaag atgtggtcaacaaaaatgcacaagctttaaacacgctttaaacaacttagctccaatttgggtgcaatttcaagtggtttaaatagatcctttcacgtcttgacctcccagggtgaa gtgcaaatgatagggtgatcacaggcagactcaagttgacagacatagtactcaacaattaatagagctgcagaaatcagagcttctgctaacttctgctactaaaaatgtca gagtggtacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaaagggtatcatcttatgtccttcctcagtcagcacctcatggtgtagtcttctgcattgacttatgtccctgcaca gaaaagaactcacaactgctcctgccatttgcattgatggaaaacacacttctcgtgaagggtgctttgtttcaaatggcacacactggttgaacacaaaggaattttatgaac cacaatcattactacagacaacacatttgtgtctggttaactgtgatgtgtaataaggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcattcaaggaggagta gataaatatttaagaatcatacatcaccagatgttgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgctcaatgaggttccaagaatt aatgaatctctcatcagatctcaagaactggaaagtatgagcagtatataaaatggccatggtacatttggctagggtttatagctggcttattgccatagtaattggtgacaattatgc tttgcattgaccagttgctgtagttgtcctcaagggtgtgttcttggatcctgctgcaaatgatgaagacgactctgagccagtgctcaaggagtcaattacattacacaT AA</p>
28	ORF36	<p>atgttgttttctgtttattgccactagtctctagtcagtggttaattacaaccagaactcaattacccctgcatacactaattcttcacacgtgggtttattaccctgacaaagttt cagatcctcagtttaccattcaactcaggatttcttacccttctttccaatgttacttgggtccatgctatacatgtctctgggaccaatggtactaagaggtttgataacctgtcctacc atthaatgatgggtttattttgcttccactgagaagttaacataataagaggctggatccttgggtactacttagattcgaagaccagtcctacttattgtaataacgctactaatgtgt tattaagtctgtaatttcaattttgtaatgatccattttgggtgttattaccacaaaaacaacaaagtggatggaaagtgagttcagagttattctagtgcgaataattgcactttg aatatgtctctcagcctttcttatggacctgaaaggaaaacagggttaattcaaaaatcttagggaatttgtttaaagaatattgatggttattttaaaatattctaaagcacagcctatt aatttagtcgtgatctccctcagggttttggctttagaaccattggtagattgc caatagggtattaacatcactaggttcaaacttacttgccttacaatagaagttattgactcctggt</p>

	<p>gattctctcaggttgacagctggctgctgcaacttattatgtgggtatctcaacctaggactttctattaaaataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcactg acctctctcagaacaaagtgtacgttgaatcctcactgtagaaaaggaatctatcaaacttctaacttttagagccaaccaacagaatctattgtagatttctaataatacaact tgtgccctttgggtgaagttttaacgccaccagattgcatccgtgtatgcttggaaacaggaagagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatataattccgcatcatttccac tttaagtgttatggagtgtctcctactaaataatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcattgtaattagaggtgatgaagtcagacaaatcgctccagggcaactggaaa gattgctgattataattataaattaccagatgattttagaggtgctgttatagcttgaattctaacaatcttgattctaagggtgggtgaattataattaactgtatagattgttaggaagtc taatctcaaactttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccgtagcacacttgaatgggttgaagggtttaaattgtaacttttacaatcatatggttccaaccacta atgggttgggttaccatacagagtagtagtactttcttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagctactaattgggttaaaaacaaatgtgtcaatttcaa ctcaatgggttaacaggcacaggtgttcttactgagctaacaaaaagttctgcctttccaacaattggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacactt gagattcttgacattacacatgttctttgggtgggtcagtggtataaacaccaggaacaaatacttcaaccaggttgcctttatcaggatgttaactgcacagaagtcctgttgc attcatgcagatcaacttactcctacttggcgtgttattctacaggttctaatgttttcaaacacgtgcaggctgttfaatggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtagata cccattgggtcaggtatatgcgctagttatcagactcagactaattctcctggcagcgcagcagtgtagctagtaaatccatcattgcctacactatgtcacttgggtgcagaaaattca gttcttactctaataactctattgccatacccacaaatttactattagtggtaccacagaaattctaccagtgctatgaccaaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattc aactgaatgcagcaatctttgtgcaatatggcagttttgtacacaattaaaccgtgtttaaactgggatagctgttgaaacaagacaaaacaccaagaagttttgcaagtgcaaa caatttcaaaaaccaccaattaaagatttgggtggtttaaattttcacaatattaccagatccatcaaaaaccaagcaagaggtcattattgaagatctactttcaaaaagtga cttgcagatgctggcttcatcaacaatatgggtgattgccttgggtgatattgctgctagggacctcatttgcacaaaagttaaaccggccttactgtttgccaccttctcacagatga aatgattgctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcattctggttggaccttgggtgcaagggtgctgattacaataaccatttgcctatgcaaatggcttatagggttaattgggtatt ggagttacacagaatgttctctatgagaacaaaaattgattgccaaccaatttaatagtgccattggcaaaattcaagactcacttcttccaca gcaagtgcacttggaaaacttcaa gatgtggtcaacaaaatgcacaagctttaaacacgcttgttaaaacttagctcaatttgggtgcaatttcaagtgtttaaataatgatcccttcacgtcttgacctcccagggtga agtgc aaattgataggtgatcacaggcagacttcaaagttgcagacatattgactcaacaattaattagagctgcagaaatcagagcttctgtaacttctgctgta ctaaatgtca gagtggtacttggacaatcaaaaagagttgattttgtggaaagggtctatcatcttctcctcagtcagcacctcatgggtgtagtcttctgcatgtgacttatgtccctgcacaa gaaaagaactcacaactgctcctgcatgtgatggaaaagcacaacttctcgtgaagggtgcttgttcaaatggcacacactggttgaacacaaaggaattttatgaac cacaatcattactacagacaacacatttgtctggttaactgtgatgtgtaataaggaattgtcaacaacacagttatgatccttgaacctgaattagactcattcaaggaggagtta</p>
--	---

		<p>gataaatattttaagaatcatacatcaccagatggtgatttaggtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgaggttgccaagaatt aatgaatctctcatcgcgatctccaagaactggaaagtatgagcagtatataaaatggccatggttacattggctaggtttatagctggcttgattgccatagtaatggtgacaattatgc tttgcgtatgaccagttgctgtagttgtctcaagggctggtgtcttctgtggatcctgctgcaaattgatgaagacgactctgagccagtgctcaaaggagtcaaattacattacacaT AA</p>
29	ORF39	<p>ATGTTTCGTTTTTCTTGTTTTACTGCCCTCGTGTCTTCACAGTGTGTGAACCTCACACTCGCACACAGCTACC TCCCGCGTACACTAATTCATTTACCAGGGGCGTCTATTATCCTGATAAGGTGTTCCGGAGTTCAGTGTTGCAT AGCACTCAAGACCTGTTCTGCCCTTCTTCTCCAATGTCACTTGGTTTCATGCGATACATGTGTCTGGTACCA ACGGAACGAAGAGATTTGATAACCCCGTACTGCCATTC AATGATGGCGTATACTTTGCTTCGACTGAAAAAT CCAACATCATCAGGGGCTGGATTTTTTGGTACAACGCTTGATTCCAAGACCCAGTCCCTCCTTATTGTGAACAA TGCGACCAACGTCGTGATAAAGGTCTGTGAGTTTCAGTTCTGCAATGACCCATTCCTTGGAGTGTATTATCAC AAGAACAACAAATCGTGGATGGAGTCAGAGTTTAGGGTGTACAGCAGCGCTAACA ACTGTACATTTGAGTA TGTGAGTCAGCCGTTTCTGATGGATCTTGAGGGCAAACAGGGCAATTTTAAGAATCTCAGAGAATTTGTGTT CAAGAACATTGATGGTTACTTTAAGATCTATAGCAAACATACGCCAATCAACTTGGTTCGTGATCTGCCACA GGGATTTAGCGCACTGGAACCTCTCGTTGACTTGCCCATAGGTATTAACATCACCAGGTTCCAGACGCTCTTG GCATTACACCGTAGTTATCTGACCCCCGGGGACTCCAGTTCGGATGGACTGCAGGAGCCGCTGCCTACTAT GTGGGTTACCTCCAGCCCAGGACCTTTCTTTTGAAATATAACGAGAACGGCACAATCACTGATGCTGTGGAC TGCGCATTGGATCCTTTGTCAGAGACTAAGTGC ACTCTGAAGTCATTCACAGTCGAGAAAGGCATTTACCAG ACGTCTAACTTCAGGGTTCAGCCTACTGAGTCCATCGTGAGATTCCCAAACATCACAAATCTTTGTCCCTTCG GTGAGGTATTCAATGCGACACGATTTGCCTCAGTGTACGCGTGGAATCGGAAGAGGATCTCCAATTGCGTGG CCGACTACTCCGTCTTATACAACTCAGCTAGCTTTTCAACATTC AAGTGCTATGGCGTGAGCCCTACCAAGCT CAATGACCTGTGCTTCACTAATGTGTATGCCGACTCTTTTGT CATTTCGCGGCGACGAGGTCCGACAAATCGCA CCGGGCCAAACCGGTAAAATTGCCGACTACA ACTACAAGCTGCCTGACGACTTCACCGGCTGCGTAATCGCC</p>

TGGAACAGCAATAACCTGGATAGCAAAGTGGGCGGAAACTACAACCTACCTGTACCGGCTCTTTAGAAAGTC
CAACCTGAAACCATTTCGAGCGCGATATCTCGACCGAAATCTACCAGGCGGGCAGCACCCCCTGTAATGGTGT
AGAAGGGTTCAATTGTTACTTTCCACTCCAGAGTTATGGGTTCCAGCCGACCAATGGCGTTCGGTTATCAACC
ATATCGCGTTGTGGTGTGTCCTTTGAGCTGCTACACGCCCCAGCTACAGTGTGCGGGCCAAAGAAAAGCAC
AAATCTTGTCAAGAACAAATGCGTTAACTTTAATTTAATGGACTCACAGGTACAGGAGTCCTGACCGAATC
TAATAAGAAGTTCCTGCCCTTCAACAGTTCGGACGAGACATTGCCGACACCACCGATGCCGTTCCGGGACCC
ACAGACCTTAGAAATTCTGGATATTACTCCATGTAGTTTTGGGGGAGTGTCTGTCATCACCCCTGGCACTAAT
ACATCTAACCAGGTTGCAGTCCTCTACCAGGATGTGAACTGTACCGAAGTGCCGGTTCGCTATTCACGCAGAC
CAGTCACTCCTACCTGGCGGGTGTACTCCACAGGCTCTAACGTGTTTCAGACACGTGCAGGGTGCCTAATC
GGCGCAGAGCATGTAAATAACTCCTATGAGTGTGATATCCCCATCGGAGCCGGGATCTGCGCTTCTACCAG
ACACAAACGAATAGTCCCGGATCTGCCTCAAGCGTGGCATCTCAATCCATTATAGCATATACGATGTCCCTT
GGAGCTGAAAACAGCGTTGCGTATTCAAACAATAGTATCGCTATTCCAACCAATTTTACAATTAGCGTGACC
ACAGAAATACTCCCTGTGAGCATGACCAAGACCAGTGTAGACTGTACTATGTACATCTGCGGCGACAGTACT
GAGTGTAGCAATCTGCTGCTACAGTATGGGTCCTTCTGTACTCAGCTTAATCGGGCTCTCACCGGAATCGCTG
TAGAGCAAGATAAAAACACACAAGAAGTGTTTGCTCAAGTGAAGCAGATCTATAAGACACCTCCCATCAAG
GATTTCCGGTGGGTTCAACTTTAGCCAGATTCTGCCCGATCCGTCTAAACCGTCCAAGCGAAGTTTCATCGAA
GACCTGCTTTTCAATAAGGTCACGCTGGCAGATGCTGGATTTATCAAACAGTACGGCGACTGTCTGGGCGAT
ATCGCCGCAAGAGACTTGATATGCGCCCAAAGTTAATGGGTTAACCGTCCTTCCACCGCTCCTGACAGAC
GAGATGATCGCCAGTATAACAAGTGCCTTATTAGCTGGGACCATTACTAGTGGATGGACATTTGGCGCCGGG
GCTGCTCTACAGATACCCTTCGCCATGCAGATGGCTTACCCTTCAACGGAATCGGAGTTACCCAGAACGTA
CTGTACGAAAATCAGAACTCATAGCTAATCAATTTAACTCTGCCATCGGGAAGATTCAGGATTCCTGTGCG
TCTACAGCGTCCGCCTTGGGGAAACTGCAAGATGTAGTGAACCAGAACGCCCAGGCCTTAAATACTCTGGTC

		AAGCAGTTATCTTCAAATTTCCGGAGCAATTAGCTCTGTGTTGAACGATATTCTTTCCAGGCTGGACCCTCCAG AAGCCGAAGTGCAAATAGACCGGCTCATCACGGGGCGCTTGCAAAGCCTGCAAACCTATGTCACCCAGCAA CTGATTCGAGCAGCCGAGATCCGGGGCCAGTGCTAATCTGGCCGCCACAAAAATGAGCGAGTGCGTCCTCGG GCAGAGCAAACGCGTAGACTTCTGCGGTAAAGGCTATCACCTGATGAGCTTCCCTCAGAGCGCACCCCACGG GGTGGTCTTCCCTCCACGTTACCTACGTCCCTGCGCAGGAGAAGAAGTTCCTACTACGGCCCCTGCAATTTGCCAC GATGGCAAGGCCCACTTTCCAGGGAGGGGGTCTTCGTTTCCAACGGGACTCATTGGTTCGTGACTCAGAGA AATTTTTATGAACCTCAGATCATTACCACTGATAATACATTCGTGTCTGGCAACTGTGATGTGGTTATTGGGA TAGTTAATAATACGGTATACGACCCACTCCAGCCCGAGCTGGACTCCTTCAAAGAGGAGCTGGACAAGTACT TTAAAAATCACACCTCACCTGATGTGGACCTAGGTGACATATCTGGCATAAATGCTAGCGTGGTTAACATTC AGAAGGAAATCGACAGACTCAACGAGGTGGCCAAAAATCTGAACGAGAGTCTGATCGACCTGCAGGAGTTG GGAAAATATGAACAGTACATCAAATGGCCATGGTACATCTGGCTGGGCTTCATAGCAGGCCTGATCGCCATC GTCATGGTACTATTATGCTGTGCTGCATGACATCCTGTTGTAGCTGTTTGAAGGGGTGTTGCTCCTGCGGCT CATGCTGCAAATTCGACGAGGACGATTCAGAACCTGTGCTGAAGGGAGTGAAGCTGCATTACACATAA
30	ORF41	ATGTTTCGTTTTCTTGTGTTTTACTGCCCTCGTGTCTTACAGTGTAGGGTTCAGCCTACTGAGTCCATCGTGAG ATTCCCAAACATCACAATCTTTGTCCCTTCGGTGAGGTATTCAATGCGACACGATTTGCCTCAGTGTACGCG TGGAATCGGAAGAGGATCTCCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTCTTATACAACCTCAGCTAGCTTTTCAACA TTCAAGTGCTATGGCGTGAGCCCTACCAAGCTCAATGACCTGTGCTTCACTAATGTGTATGCCGACTCTTTTG TCATTCGCGGCGACGAGGTCCGACAAATCGCACCGGGCCAAACCGGTAAAATTGCCGACTACAACCTACAAG CTGCCTGACGACTTCACCGGCTGCGTAATCGCCTGGAACAGCAATAACCTGGATAGCAAAGTGGGCGGAAA CTACAACCTACCTGTACCGGCTCTTTAGAAAGTCCAACCTGAAACCATTCGAGCGCGATATCTCGACCGAAAT CTACCAGGCGGGCAGCACCCCCTGTAATGGTGTAGAAGGGTTCAATTGTTACTTTCCACTCCAGAGTTATGG

		GTTCCAGCCGACCAATGGCGTCGGTTATCAACCATATCGCGTTGTGGTGTGTCCTTTGAGCTGCTACACGCC CCAGCTACAGTGTGCGGGCCAAAGAAAAGCACAATCTTGTCAAGAACAAATGCGTTAACTTTTAA
31	IRES EMCV	ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCC GTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCCT CTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAA ACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAA GCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGA AAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTAT GGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCC CCGAACCACGGGGACGTGGTTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATA
32	5'-UTR гена глобина	ACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACC
33	3'-UTR гена глобина	GCTGGAGCCTCGGTAGCCGTTCCCTCCTGCCCCTGGGCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCACCGGC CCTTCCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCAGCA
45	CVB3	TTAAAACAGCCTGTGGGTGATCCCACCCACAGGCCCAATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTT GTGCGCCTGTTTTATACCCCTCCCCAACTGTAAGTACTAGAAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGG CACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTG AAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTT TCGCTCAGCACTACCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGG CTGCGTTGGCGGCCTGCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTG

		<p>AGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAG GGCAGTGTGTTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCCTA TACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGACTAAT AGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATAACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAACATTACAATTCATTG TTAAGTTGAATACAGCAAA</p>
<p>46</p>	<p>WT EMCV GLuc IS</p>	<p>CGCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAATAGCCGAAAAACAAAAACAAAAAAACAAAAAAAAC CAAAAAAACAAAACACAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTT ATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATT CCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTG GAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAG GTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGT GAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCC AGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTT AAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATAGCCACC ATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGCTGTGGCCGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAA GACTTCAACATCGTGGCCGTGGCCAGCAACTTCGCGACCACGGATCTCGATGCTGACCGCGGGAAGTTGCC GGCAAGAAGCTGCCGCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCGGAAAGCTGGCTGCACCAGGG GCTGTCTGATCTGCCTGTCCACATCAAGTGCACGCCAAGATGAAGAAGTTCATCCAGGACGCTGCCACA CCTACGAAGGCGACAAAGAGTCCGCACAGGGCGGCATAGGCGAGGCGATCGTCGACATTCCTGAGATTCCT GGGTTCAAGGACTTGGAGCCATGGAGCAGTTCATCGCACAGGTTCGATCTGTGTGTGGACTGCACAACCTGGC TGCCCTCAAAGGGCTTGCCAACGTGCAGTGTTCTGACCTGCTCAAGAAGTGGCTGCCGCAACGCTGTGCGACC</p>

		TTTGCCAGCAAGATCCAGGGCCAGGTGGACAAGATCAAGGGGGCCGGTGGTACTAAAAAAACAAAAA CAAAACGGCTATT
47	Шунт	GTTTTTCGGCTATTCCCAATAGCCGTTTTG
48	ORF44	ATGTACCGGATGCAGTTGTTGTCCTGTATAGCTCTTCCCTTGCATTGGTCACTAATTCTagagtccaaccaacagaatcta ttgftagattcctaataattacaaactgtgccctttggtgaagttttaacgccaccagattgcatccgtgatgcttgaacaggaa gagaatcagcaactgtgtgctgattattctgt cctataaattccgcatcattttccactttaagtgttatggagtgtctcactaaataaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcattgta aattagaggtgatgaagtcagaca aatcgctccaggcaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattctaacaatcttgattctaaggtggtggaattataa ttacctgtatagattgtaggaagtctaactcaaacctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatggtggtgaaggtttaattgttactttcctt acaatcatatggtttcaaccactaatggtgtggttaccaaccatacagagtagtagtactttttgaacttctacatgcaccagcaactggttggaccta aaaagtctactaatt ggttaaaacaatgtgtcaattcTAA
49	ORF45	ATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGCTGTGGCCGAGGCCAAGagagtccaaccaacagaatctattgtaga ttcctaataattacaaactgtgccctttggtgaagttttaacgccaccagattgcatccgtgatgcttgaacaggaa gagaatcagcaactgtgtgctgattattctgtcctatata attccgcatcattttccactttaagtgttatggagtgtctcactaaataaatgatctctgcttactaatgtctatgcagattcattgta aattagaggtgatgaagtcagaca aatcgctc caggcaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattctaacaatcttgattctaaggtggtggaattataattacctgta tagattgtaggaagtctaactcaaacctttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatggtggtgaaggtttaattgttactttcctttacaatcat atggtttcaaccactaatggtgtggttaccaaccatacagagtagtagtactttttgaacttctacatgcaccagcaactggttggaccta aaaagtctactaattggttaaa acaatgtgtcaattcTAA
50	Сигнал секреции IL2	ATGTACCGGATGCAGTTGTTGTCCTGTATAGCTCTTCCCTTGCATTGGTCACTAATTCT

51	Сигнал секреции Gluc	ATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGCTGTGGCCGAGGCCAAG
----	----------------------------	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген коронавируса.

2. Иммуногенная композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антиген коронавируса, где антиген коронавируса предусматривает последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью антигена коронавируса, выбранной из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 1-10, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25-30, 48 и 49, или кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью кольцевого полирибонуклеотида, выбранной из последовательностей под SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22 и 24.

3. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая антиген коронавируса.

4. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где антиген коронавируса получен из бета-коронавируса или его фрагмента или из сарбековируса или его фрагмента.

5. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где антиген коронавируса получен из коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) или его фрагмента, из коронавируса 1 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-1) или его фрагмента или из коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) или его фрагмента.

6. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где антиген коронавируса представляет собой мембранный белок или его вариант или фрагмент, белок оболочки вируса или его вариант или фрагмент, шиповидный белок вируса или его вариант или фрагмент, нуклеокапсидный белок вируса или его вариант или фрагмент, вспомогательный белок вируса или его вариант или фрагмент.

7. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где антиген коронавируса представляет собой рецептор-связывающий домен шиповидного белка или его вариант или фрагмент.

8. Иммуногенная композиция по п. 7, где в шиповидном белке отсутствует сайт расщепления.

9. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где вспомогательный белок коронавируса выбран из группы, состоящей из продуктов ORF3a, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF10 или любого их варианта или фрагмента.

10. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где кольцевой полирибонуклеотид содержит совокупность последовательностей, каждая из которых кодирует антиген, и по меньшей мере одна последовательность кодирует антиген коронавируса.

11. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где кольцевой полирибонуклеотид содержит две или больше ORF.

12. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательности, кодирующие антигены из по меньшей мере двух разных микроорганизмов, и по меньшей мере один микроорганизм представляет собой коронавирус.

13. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где антиген коронавируса предусматривает эпитоп.

14. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где антиген коронавируса предусматривает эпитоп, распознаваемый В-клеткой.

15. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй антиген.

16. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий вторую ORF.

17. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая третий, четвертый или пятый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую третий, четвертый или пятый антиген.

18. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где первый антиген, второй антиген, третий антиген, четвертый антиген и пятый антиген являются разными антигенами.

19. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где иммуногенная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

20. Иммуногенная композиция по любому из предыдущих пунктов, где иммуногенная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и не содержит какого-либо носителя.

21. Иммуногенная композиция, содержащая линейный полирибонуклеотид, содержащий последовательность, выбранную из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 13, 15 и 12.

22. Иммуногенная композиция по п. 21, где линейный полирибонуклеотид содержит последовательности, кодирующие два или больше антигенов, и по меньшей мере один антиген представляет собой антиген коронавируса.

23. Иммуногенная композиция по п. 21 или п. 22, где линейный полирибонуклеотид содержит последовательности, кодирующие по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 антигенов, и по меньшей мере один антиген представляет собой антиген коронавируса, кодируемый последовательностью под SEQ ID NO: 13, 15 и 12.

24. Способ доставки иммуногенной композиции субъекту, представляющему собой человека, включающий а) введение иммуногенной композиции по любому из предыдущих пунктов субъекту, представляющему собой человека.

25. Способ индуцирования иммунного ответа в отношении антигена коронавируса у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, включающий а) введение иммуногенной композиции по любому из предыдущих пунктов субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека.

26. Способ доставки иммуногенной композиции субъекту, представляющему собой человека, включающий а) введение иммуногенной композиции по любому из предыдущих пунктов субъекту, представляющему собой человека, и б) осуществление сбора антител к антигену коронавируса у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека.

27. Способ индуцирования иммунного ответа в отношении антигена коронавируса у субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, включающий а) введение иммуногенной композиции по любому из предыдущих пунктов субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека, и б) осуществление сбора антител к антигену коронавируса от субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека.

28. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий введение адъюванта субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека.

29. Способ по п. 28, где адъювант составляют и вводят совместно с иммуногенной композицией или составляют и вводят отдельно от иммуногенной композиции.

30. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий составление иммуногенной композиции с носителем.

31. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий введение кольцевого полирибонуклеотида субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека, или его иммунизацию кольцевым полирибонуклеотидом по меньшей мере двукратно.

32. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий введение вакцины субъекту, представляющему собой животное, отличное от человека, или человека, или его иммунизацию вакциной.

33. Способ по п. 32, где вакцина представляет собой пневмококковую полисахаридную вакцину.

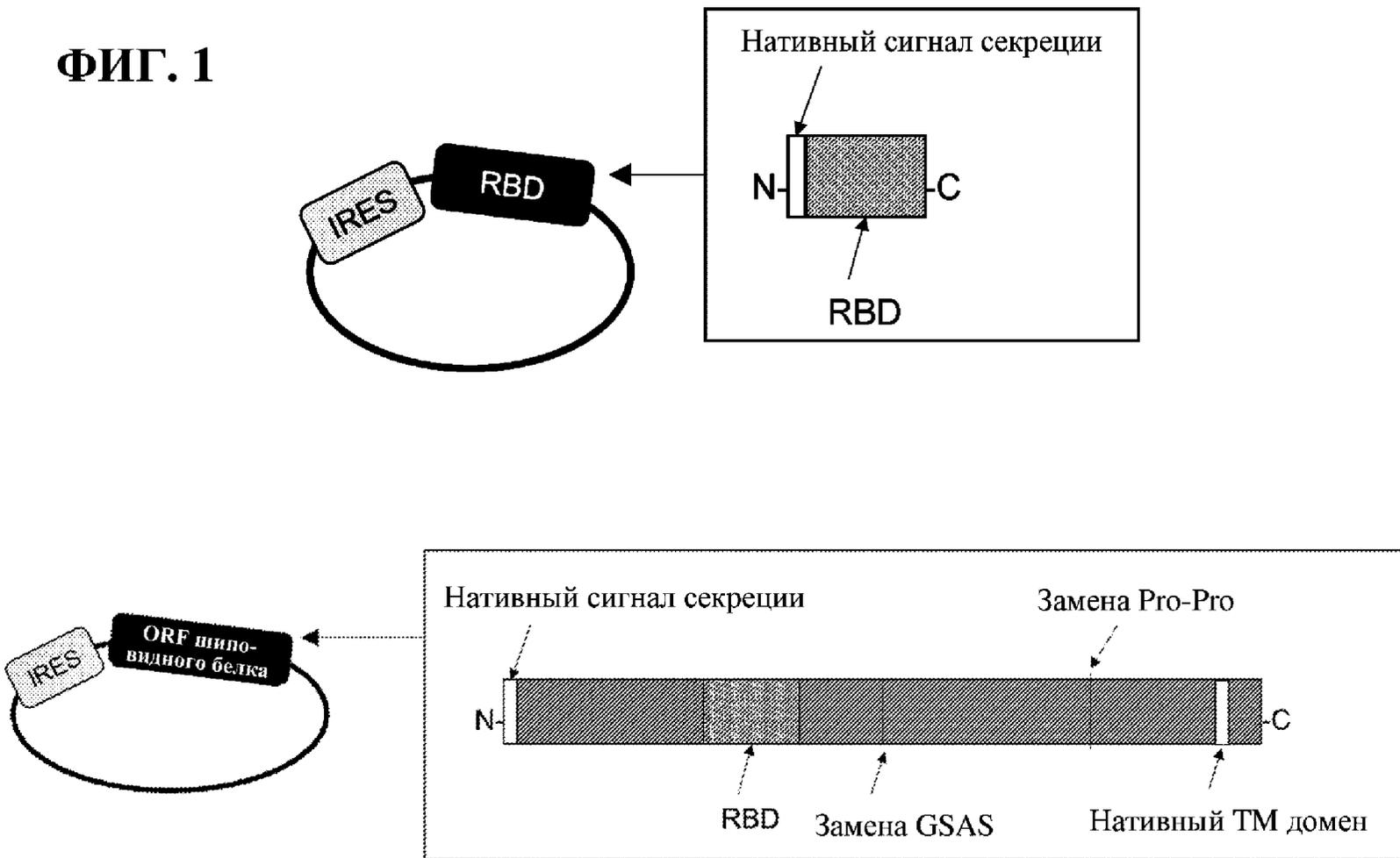
34. Способ по п. 32, где вакцина представляет собой вакцину от бактериальной инфекции.

35. Способ по любому из предыдущих пунктов, где субъекта, представляющего собой животное, отличное от человека, или человека, иммунизируют с помощью кольцевого полирибонуклеотида посредством инъекции.

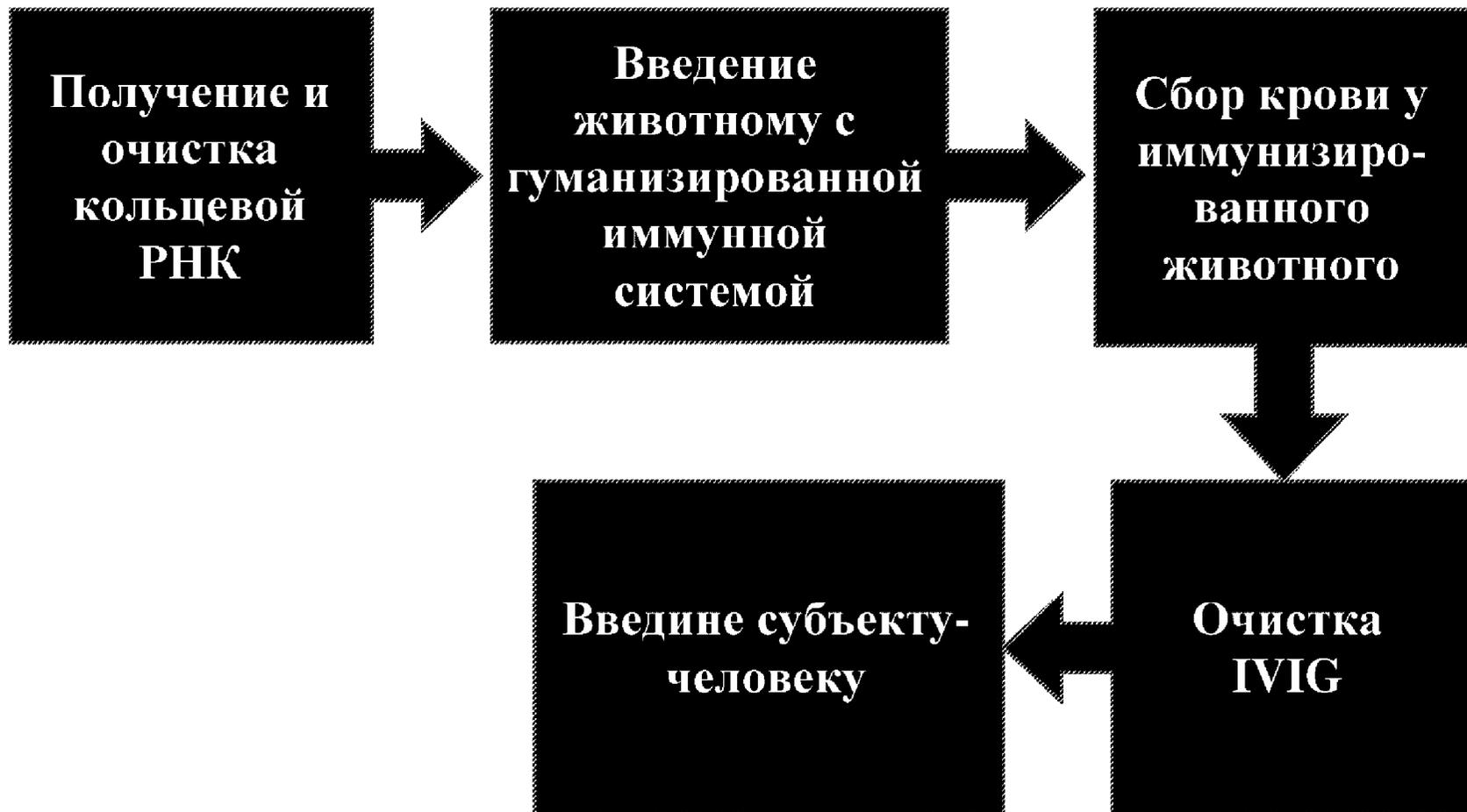
36. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело из поликлональных антител специфически связывается с антигеном коронавируса.

37. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело из поликлональных антител представляет собой гуманизованное антитело или полностью человеческое антитело.

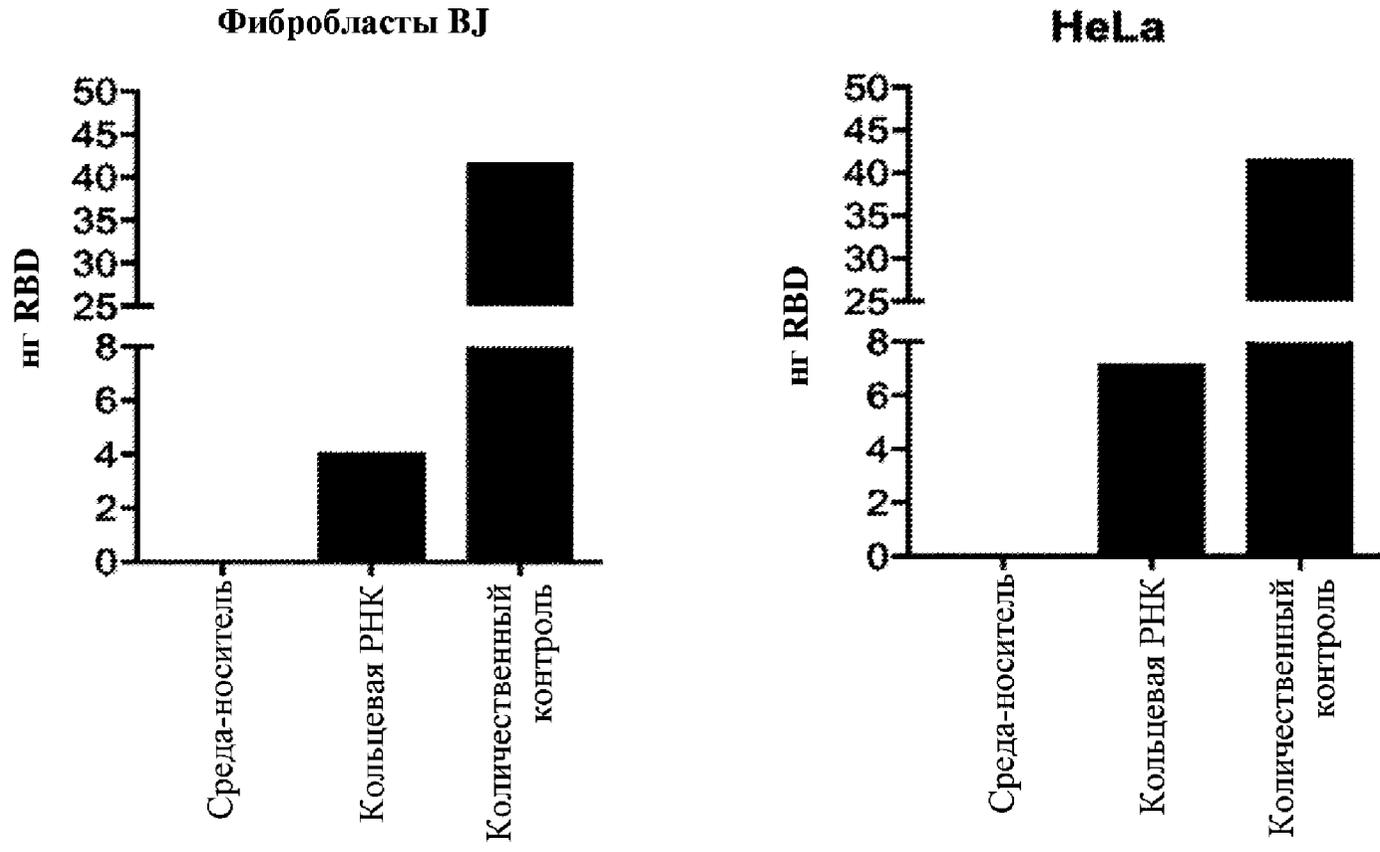
ФИГ. 1



ФИГ. 2

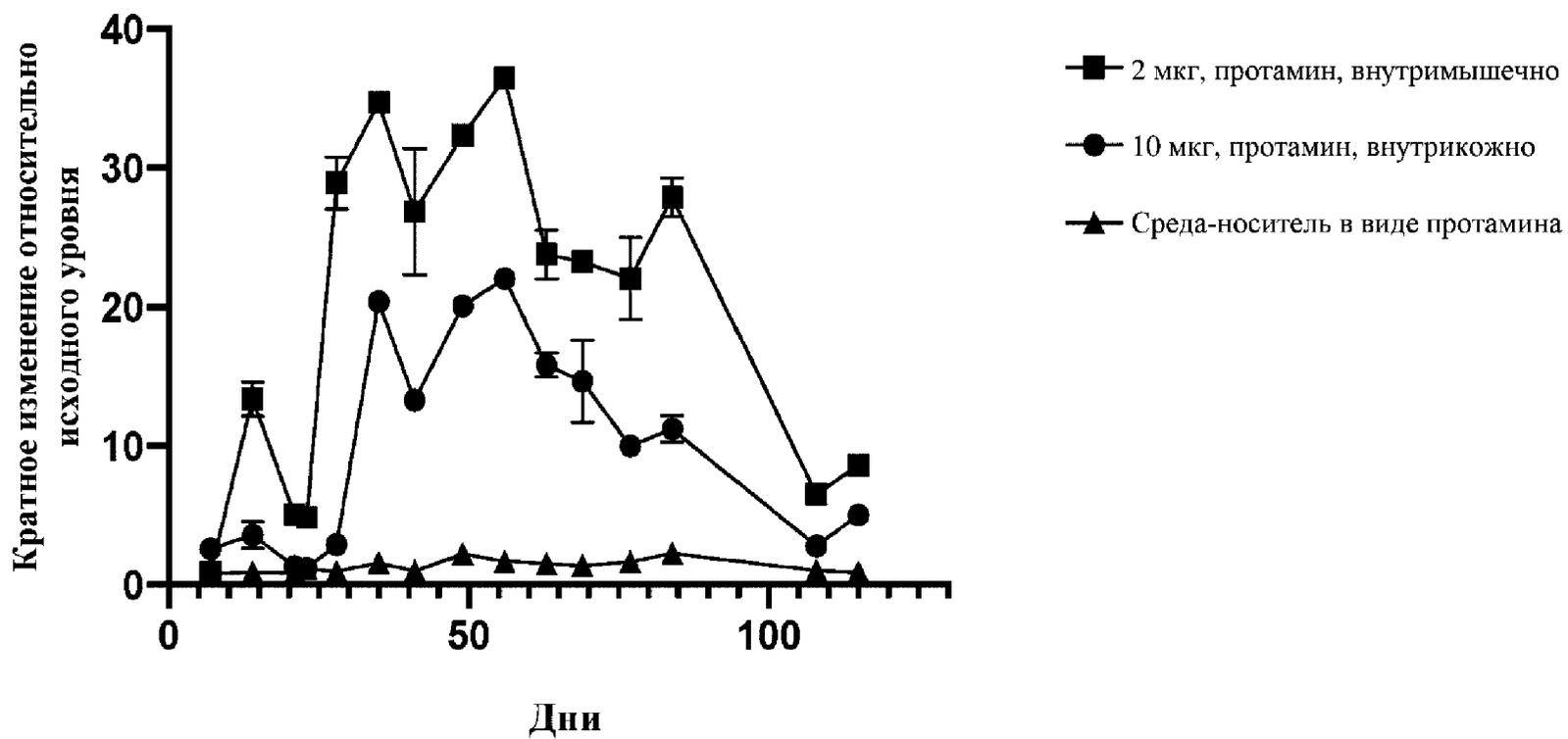


ФИГ. 3



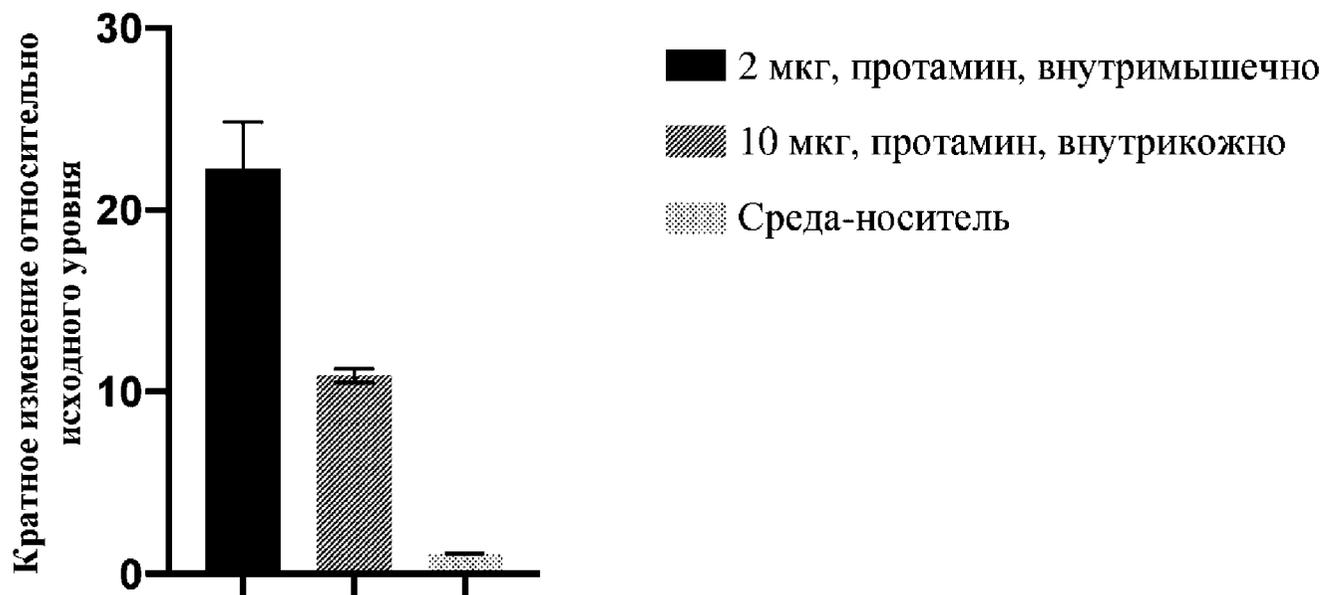
ФИГ. 4

Динамика ответа в виде антител к RBD

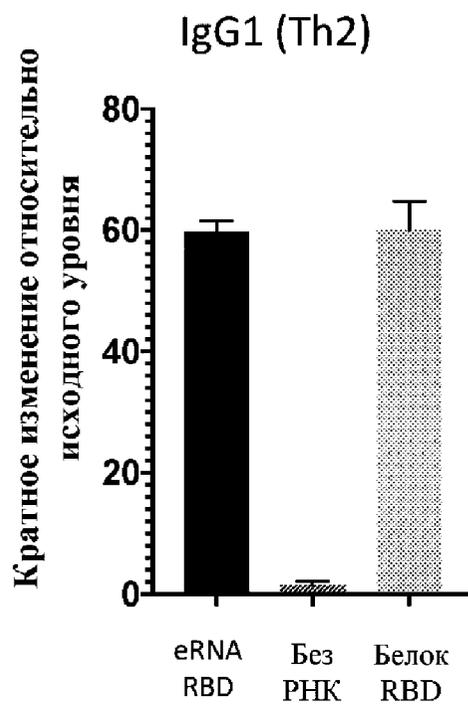
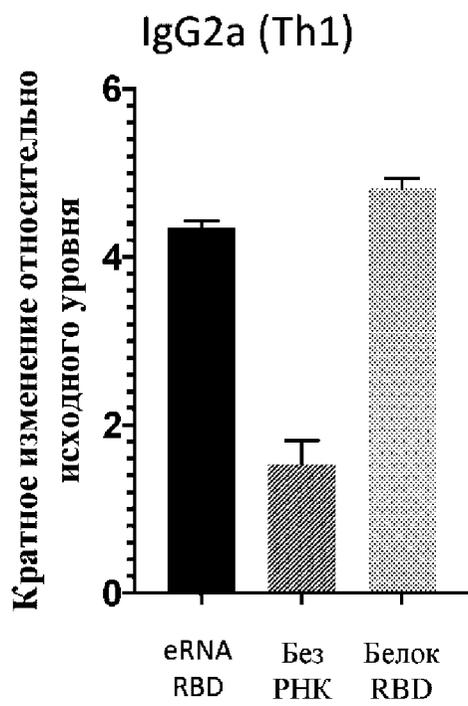


ФИГ. 5

Содержание антител к шиповидному белку при D14В

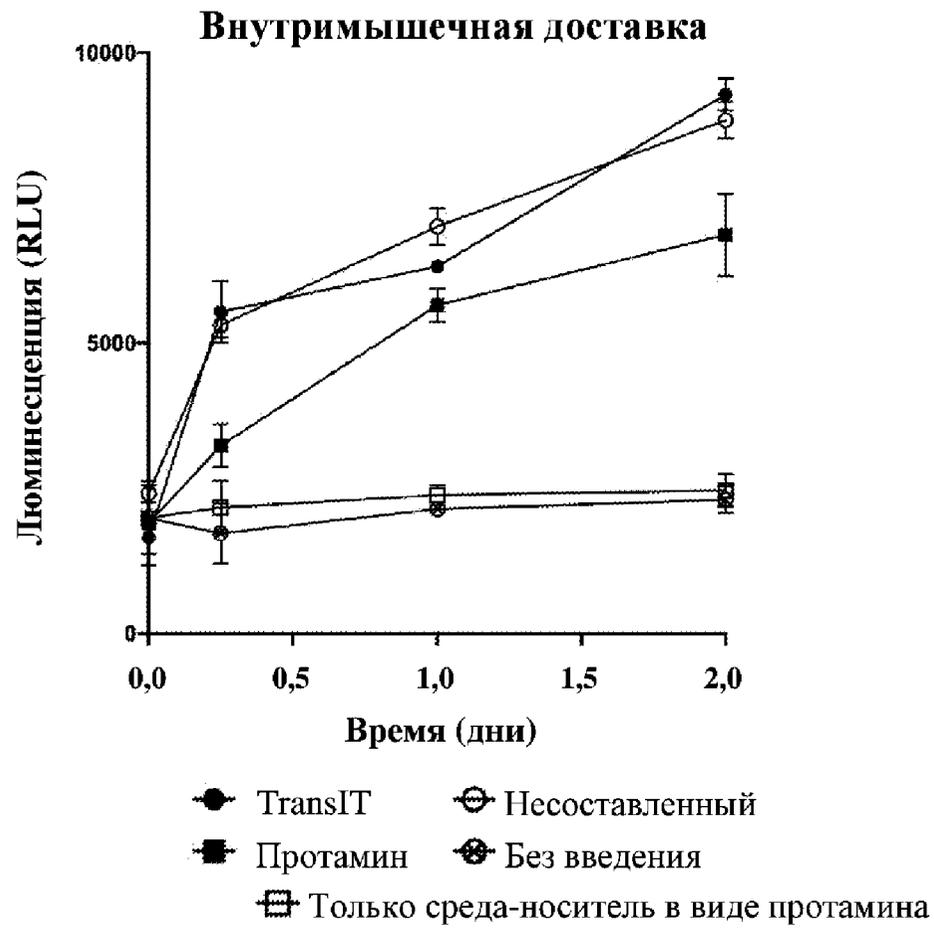


ФИГ. 6



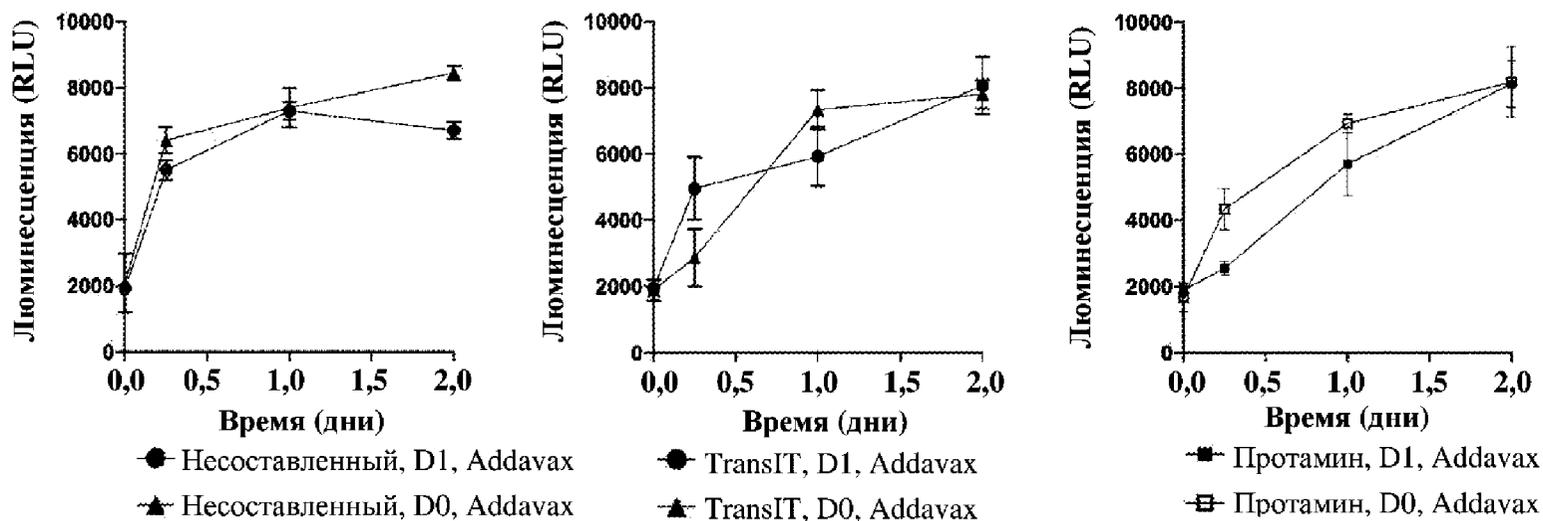
Конструкция	PRNT ₅₀
eRNA RBD	40
Без РНК (отрицательный контроль)	<10
Белок RBD (положительный контроль)	10

ФИГ. 7



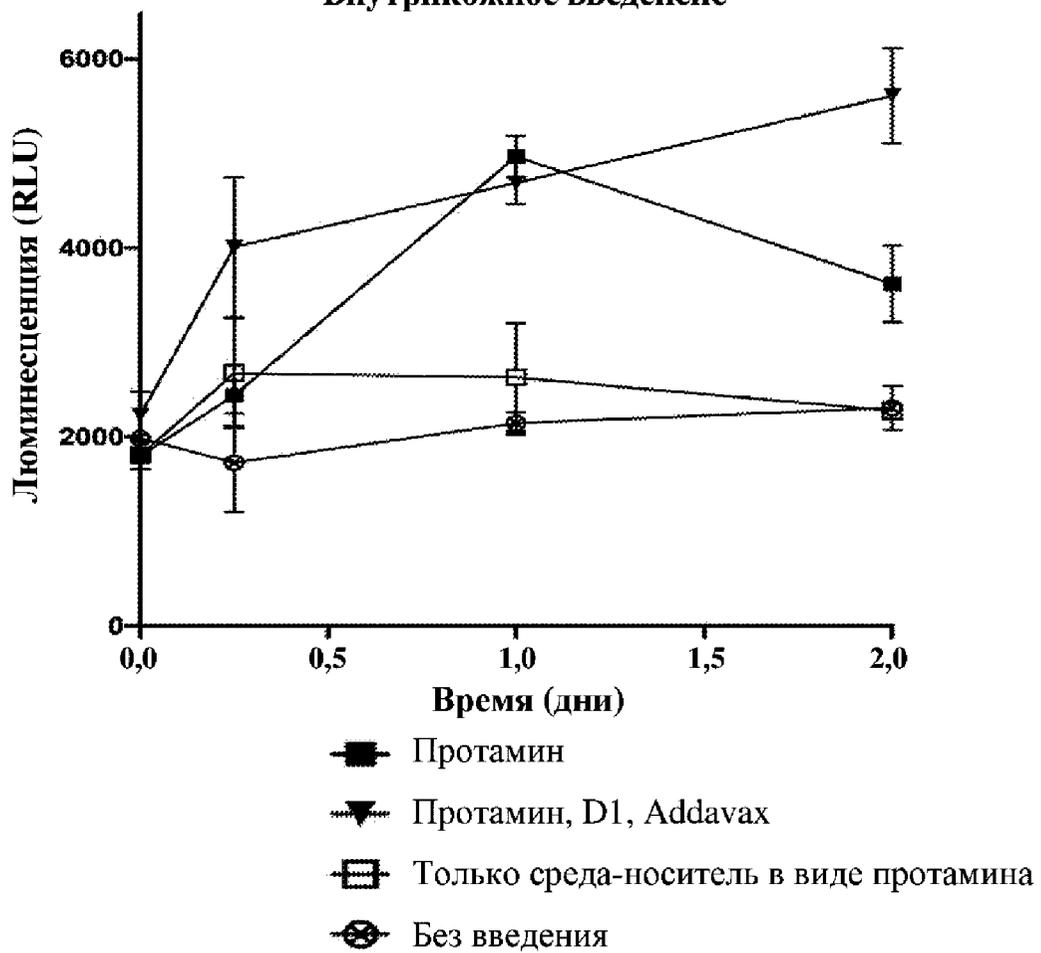
ФИГ. 8

Внутримышечное введение – определение времени введения адьюванта

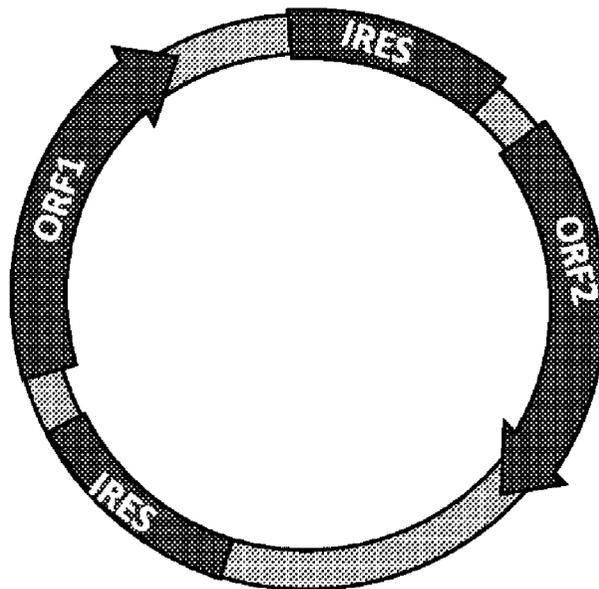


ФИГ. 9

Внутрикожное введение

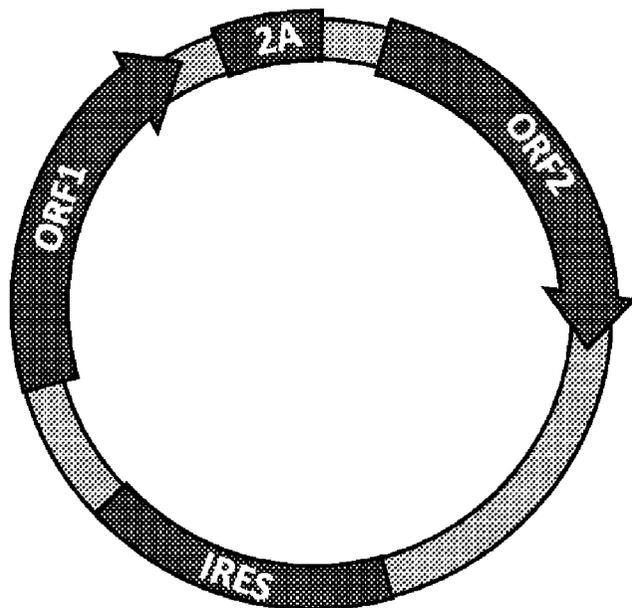


ФИГ. 10



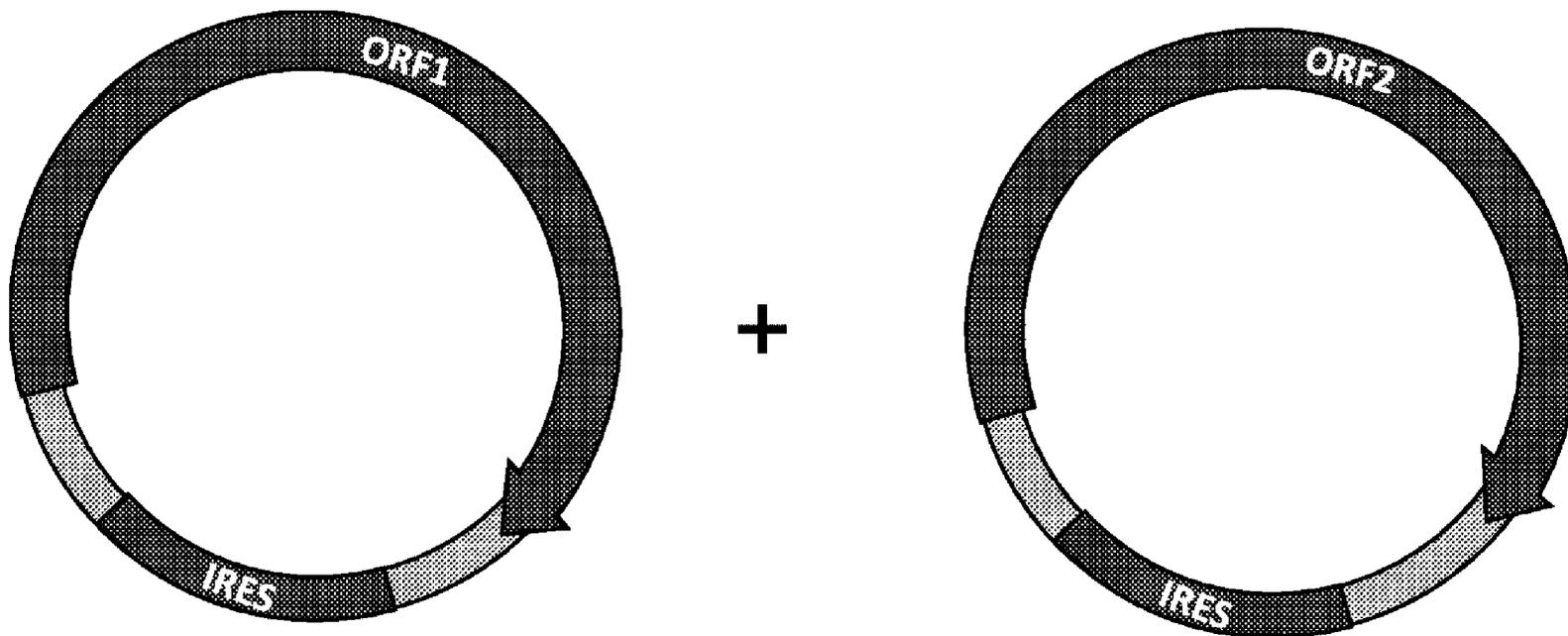
Пример	ORF1	ORF2	Где
A	Антиген 1	Антиген 2	Антиген 1 представляет собой антиген коронавируса, а антиген 2 представляет собой другой антиген, не из коронавируса
B	Антиген 1	Антиген 2	Как антиген 1, так и антиген 2 представляют собой антигены коронавируса

ФИГ. 11



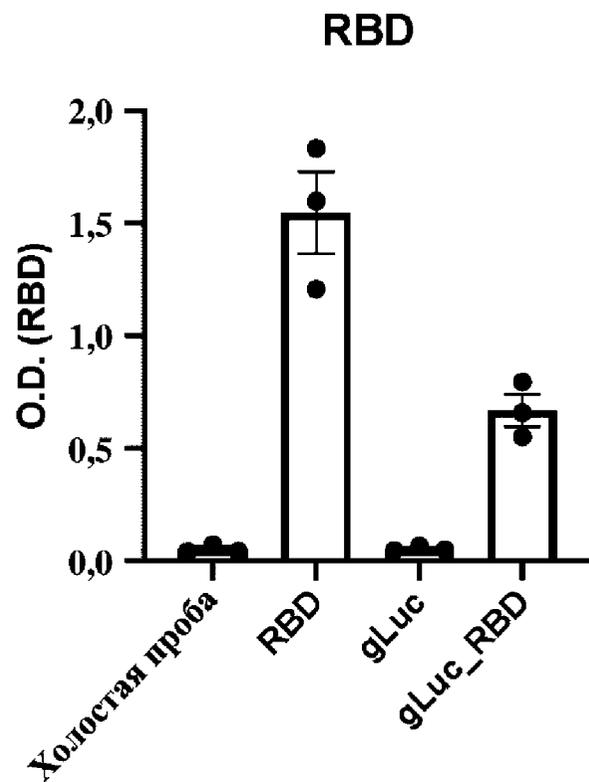
Пример	ORF1	ORF2	Где
A	Антиген 1	Антиген 2	Антиген 1 представляет собой антиген коронавируса, а антиген 2 представляет собой другой антиген, не из коронавируса
B	Антиген 1	Антиген 2	Как антиген 1, так и антиген 2 представляют собой антигены коронавируса

ФИГ. 12

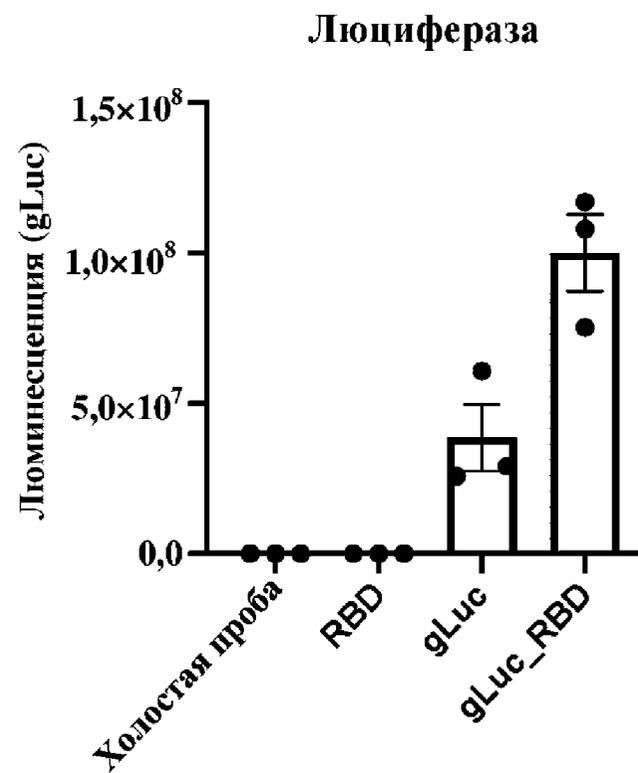


Пример	ORF1	ORF2	Где
А	Антиген 1	Антиген 2	Антиген 1 представляет собой антиген коронавируса, а антиген 2 представляет собой другой антиген, не из коронавируса
В	Антиген 1	Антиген 2	Как антиген 1, так и антиген 2 представляют собой антигены коронавируса

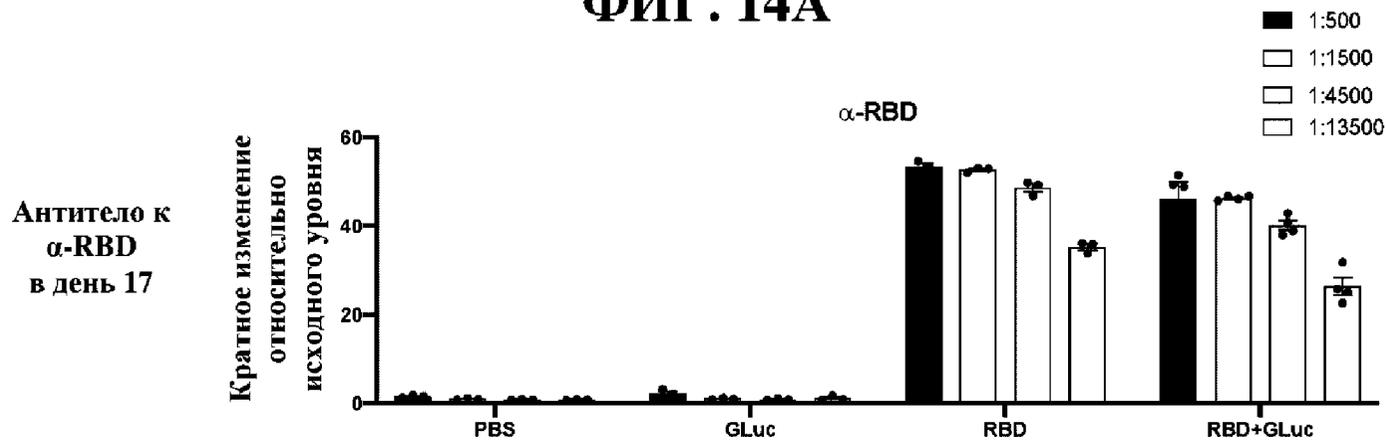
ФИГ. 13А



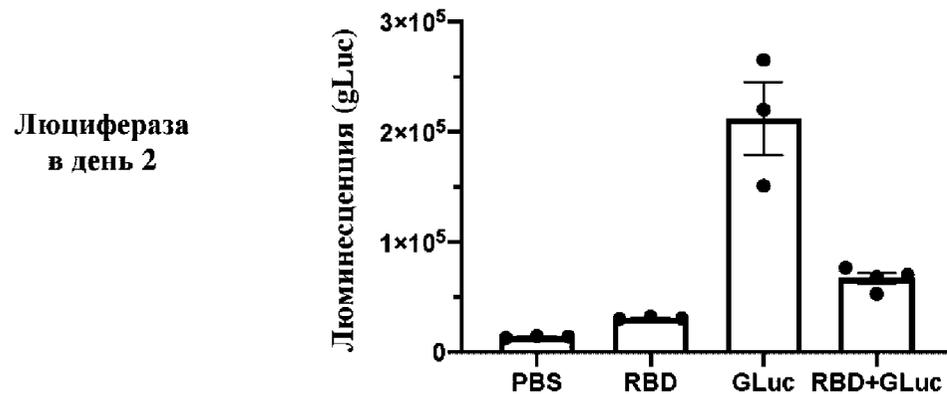
ФИГ. 13В



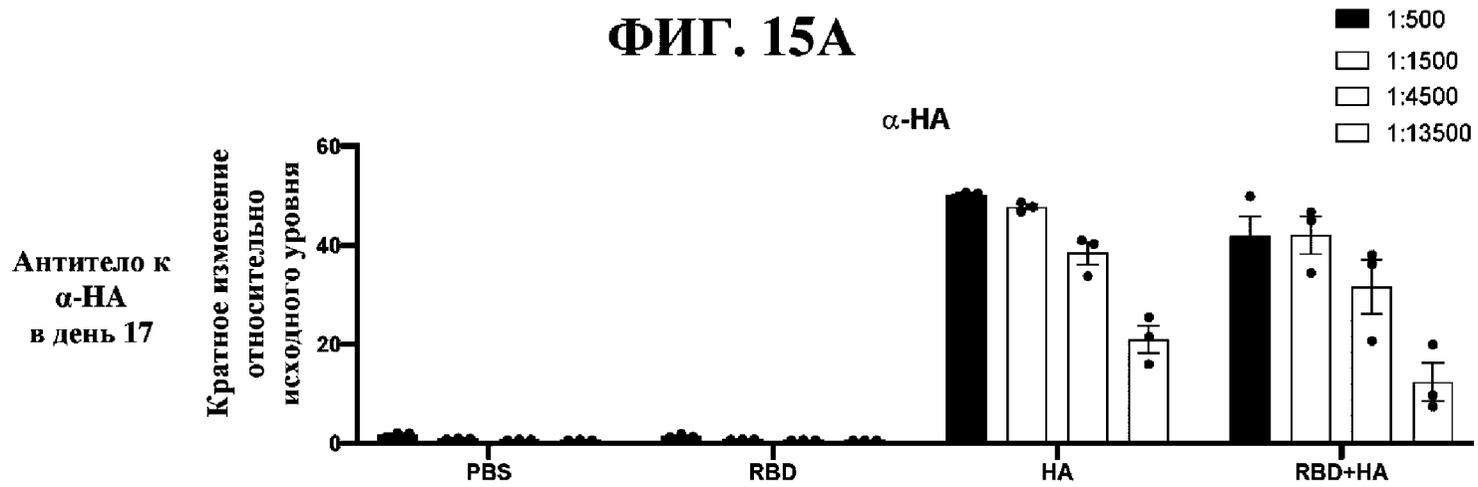
ФИГ. 14А



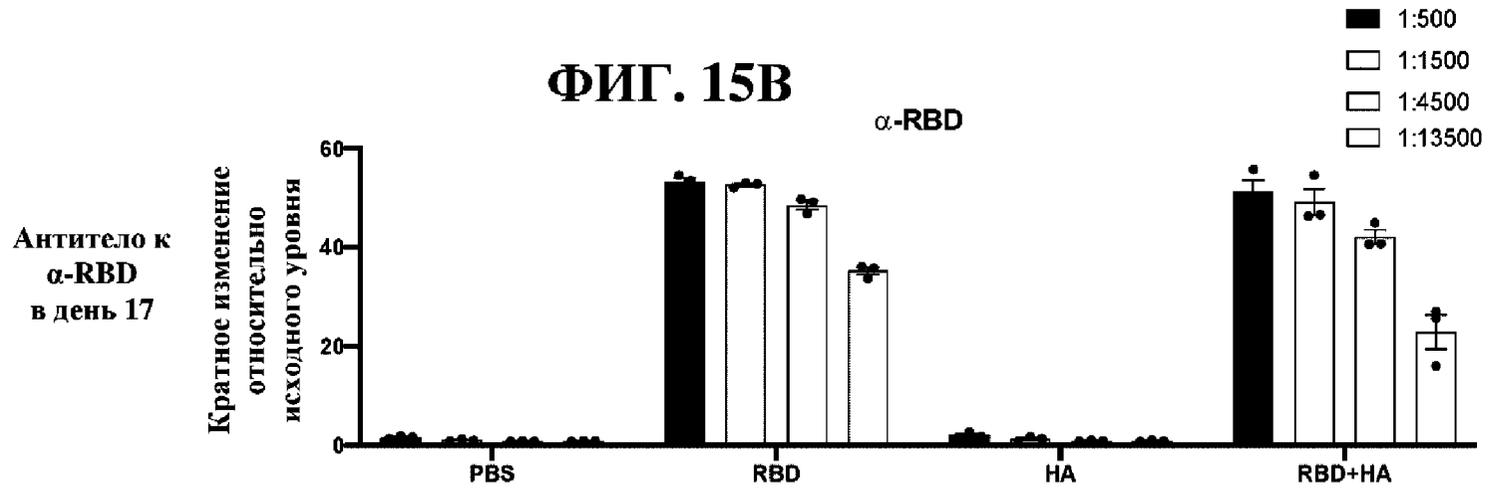
ФИГ. 14В



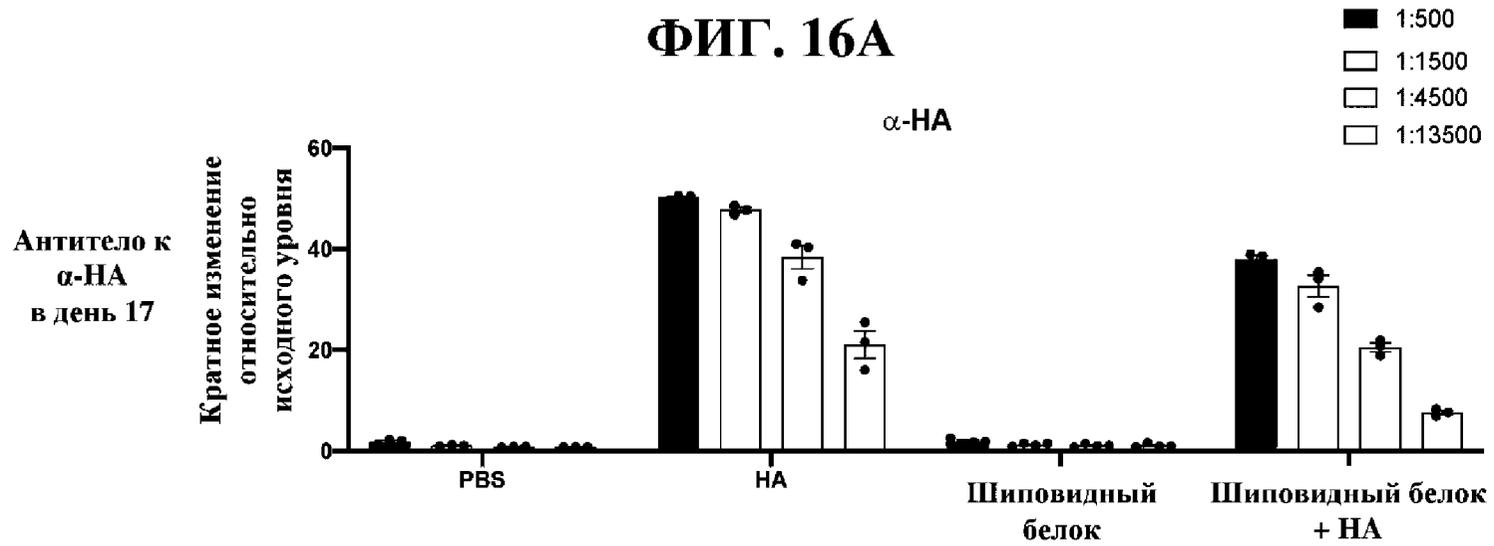
ФИГ. 15А



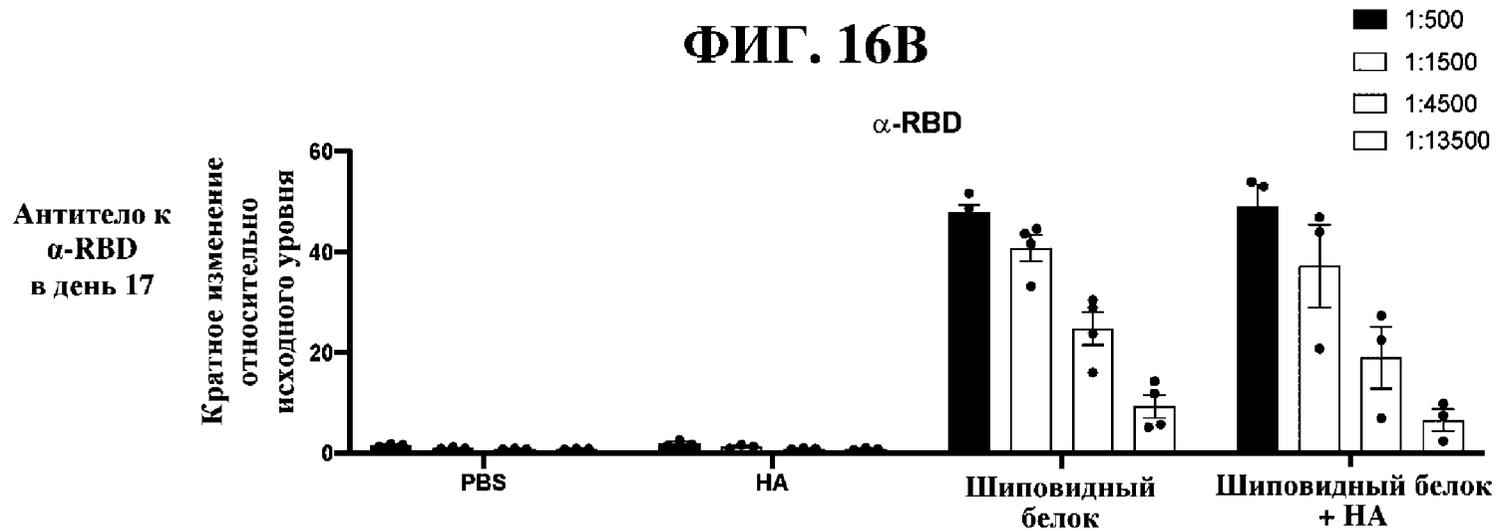
ФИГ. 15В



ФИГ. 16А



ФИГ. 16В



ФИГ. 17

