

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391493 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.05(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)  
A61K 39/215 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)  
A61P 31/14 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2021.12.21

## (54) РНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ ВАРИАНТОВ SARS-CoV-2

(31) 63/129,395; PCT/EP2021/052455; PCT/  
EP2021/069626; PCT/EP2021/069632(72) Изобретатель:  
Рот Николе, Морено Диего Чавес,  
Гроссе Ханс Вольфганг, Фаренхорст  
Доминик, Раух Сузанне (DE)(32) 2020.12.22; 2021.02.03; 2021.07.14;  
2021.07.14

(33) US; EP; EP; EP

(74) Представитель:

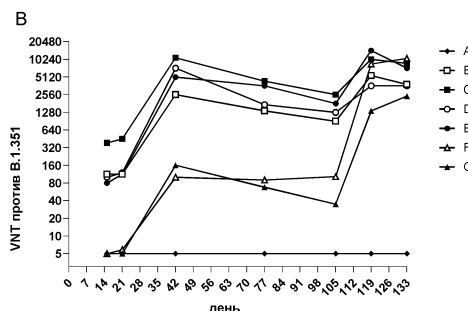
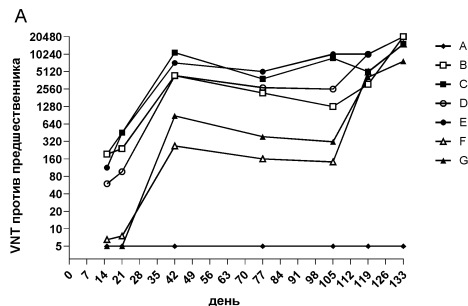
(86) PCT/IB2021/062127

(87) WO 2022/137133 2022.06.30

(71) Заявитель:

КБЮРВАК СЕ (DE);  
ГЛАКСОСМИТКЛАЙН  
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)(88) Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.  
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, подходящей для применения для лечения или профилактики инфекции коронавируса, предпочтительно коронавируса SARS-CoV-2, или расстройства, связанного с такой инфекцией, предпочтительно COVID-19. Настоящее изобретение также относится к композициям, полипептидам и вакцинам. Указанные композиции и вакцины предпочтительно содержат по меньшей мере одну из указанных последовательностей нуклеиновых кислот, предпочтительно последовательности нуклеиновых кислот в ассоциации с липидной наночастицей (LNP). Настоящее изобретение также относится к первому и второму медицинскому применению нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида, комбинации, вакцины и набора, а также к способам лечения или предупреждения коронавирусной инфекции, предпочтительно инфекции Coronavirius.



A1

202391493

202391493

A1

PCT/IB2021/062127

МПК: *A61K 39/12* (2006.01) *A61P 11/00*

(2006.01)

*A61K 39/215* (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)**РНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ ВАРИАНТОВ SARS-CoV-2**

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки США № 63/129395, поданной 22 декабря 2020 г.; заявки PCT № PCT/EP2021/052455, поданной 3 февраля 2021 г.; заявки PCT № PCT/EP2021/069626, поданной 14 июля 2021 г., и заявки PCT № PCT/EP2021/069632, поданной 14 июля 2021 г. Каждая из указанных выше заявок включена в настоящий документ посредством ссылки.

**Уровень техники**

Настоящее изобретение, среди прочего, относится к РНК, подходящей для применения для лечения или профилактики инфекции вариантами SARS-CoV-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия), или заболевания, связанного с такими инфекциями. Настоящее изобретение также относится к композициям, полипептидам и вакцинам. Указанные композиции и вакцины предпочтительно содержат по меньшей мере одну из указанных последовательностей РНК, предпочтительно РНК в ассоциации с липидными наночастицами (LNP).

Настоящее изобретение также относится к первому и второму медицинскому применению РНК, композиции, вакцины и набора, а также к способам лечения или предупреждения инфекции SARS-CoV-2, вызванной вариантами SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5),

С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

Коронавирусы представляют собой высококонтагиозные оболочечные зоонозные вирусы семейства *Coronaviridae* с положительной цепью одноцепочечной РНК.

Коронавирусы обладают высокой генетической изменчивостью, и отдельные виды вирусов потенциально могут инфицировать несколько видов-хозяев, преодолевая видовой барьер. В конце 2019 года в городе Ухань, провинция Хубэй, Китай, была зарегистрирована вспышка респираторного заболевания, вызванного новым штаммом коронавируса. Новый коронавирус был назван «коронавирусом 2 тяжелого острого респираторного синдрома» (SARS-CoV-2). Типичные симптомы вирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, также называемой заболеванием COVID-19, включают лихорадку, кашель, одышку и пневмонию с высокими показателями смертности среди населения старшего возраста. В марте 2020 года ВОЗ объявила вспышку SARS-CoV-2 пандемией. Кроме того, некоторые лица страдают от проявлений инфекции COVID-19 в течение недель или месяцев после инфицирования. Эту популяцию называют имеющими «постковидный синдром». Общие признаки и симптомы, которые сохраняются в течение некоторого времени, включают: слабость, одышку или затруднение дыхания, кашель, боль в суставах, боль в грудной клетке, нарушения памяти, концентрации внимания или сна, боль в мышцах или головную боль, учащенное или усиленное сердцебиение, снижение обоняния или вкусовой чувствительности, депрессию или чувство тревоги, лихорадку, головокружение при вставании, ухудшение симптомов после физической или умственной деятельности.

Во время пандемии появлялись новые вариантные штаммы SARS-CoV-2, которые часто являлись более контагиозными или более патогенными, чем исходный штамм SARS-CoV-2. Такие появляющиеся новые штаммы SARS-CoV-2 потенциально могут привести к снижению эффективности вакцин первого поколения, которые были разработаны против исходного штамма SARS-CoV-2. Кроме того, неясно, приведет ли

бустерная иммунизация вакциной, специально разработанной против появляющихся новых штаммов SARS-CoV-2, к защитным иммунным ответам против появляющихся новых штаммов SARS-CoV-2 у субъектов, которые были вакцинированы против исходного штамма SARS-CoV-2.

### **Краткое изложение сущности изобретения**

Таким образом, одной из целей представленного ниже изобретения является обеспечение вакцины на основе РНК против инфекций SARS-CoV-2, в частности, инфекций SARS-CoV-2, вызванных появляющимися новыми вариантными штаммами SARS-CoV-2. Такие появляющиеся новые штаммы включают, но не ограничиваются ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия). Вакцинация средствами на основе РНК представляет собой один из наиболее перспективных подходов к получению новых вакцин против появляющихся новых вирусов SARS-CoV-2. РНК может быть генетически сконструирована и адаптирована к появляющимся новым штаммам SARS-CoV-2 и введена субъекту-человеку, при этом трансфицированные клетки непосредственно продуцируют кодируемый антиген, обеспечиваемый РНК, что приводит к иммунологическим ответам.

Как дополнительно определено в формуле изобретения и приведенном ниже описании, эти цели достигаются, среди прочего, путем обеспечения РНК, содержащей по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из SARS-CoV-2, например, содержащий по меньшей мере одну мутацию, имеющую происхождение от штамма SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4

(Индия), АУ.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), Р.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), Р.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), Р.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения РНК и вакцина на основе РНК содержат РНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид, полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, например, включающий шиповидный белок, полученный из штамма SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, АУ.1 (Индия), АУ.2 (Индия), АУ.4 (Индия), АУ.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), Р.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), Р.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), Р.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

#### **Краткое описание чертежей**

На **ФИГ. 1** представлены значимые ответы в виде выработки связывающих антител IgG1 и IgG2a к рецептор-связывающему домену (RBD) SARS-CoV-2-предшественника и RBD варианта В.1.351 на 14 день (**ФИГ. 1 А-Д**) и на 21 день (**ФИГ. 1 Е-Н**) для группы, вакцинированной мРНК-вакцинами **CV2CoV** и **CV2CoV.351**, обе из которых приготовлены в LNP. На 14 день на **ФИГ. 1 А** представлен сопоставимый ответ IgG1 для всех групп (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника), а на **ФИГ. 1В** представлены сопоставимые титры IgG2a для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD вируса-предшественника). На 14 день на **ФИГ. 1 С** представлен сопоставимый ответ IgG1 для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD варианта В.1.351 K417N, E484K, N501Y), а на **ФИГ. 1 D** представлены сопоставимые титры IgG2a для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD варианта В.1.351 K417N, E484K, N501Y). На 21 день на **ФИГ. 1 Е** представлен сопоставимый ответ IgG1

для всех схем вакцинации (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника), а на **ФИГ. 1 F** представлены сопоставимые титры IgG2a для всех схем вакцинации (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника). На 21 день на **ФИГ. 1 G** представлен сопоставимый ответ IgG1 для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD варианта B.1.351 K417N, E484K, N501Y), а на **ФИГ. 1 H** представлены сопоставимые титры IgG2a для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD варианта B.1.351 K417N, E484K, N501Y).

На **ФИГ. 2** представлена значимая индукция титров вируснейтрализующих антител (VNT), оцененная с помощью анализа цитопатического эффекта (CPE) при использовании SARS-CoV-2-предшественника. На **ФИГ. 2 A** на 14 день и **ФИГ. 2 B** на 21 день представлено повышение VNT для всех групп В-Н. Совместная доставка мРНК-вакцины **CV2CoV** и CV2CoV.351 в одну и ту же конечность (группы F и G) или в разные конечности (группа H) может вызвать ответы против обоих вариантов вакцины на 14 день и 21 день. На **ФИГ. 2 C** на 42 день представлен повышенный уровень VNT для всех групп (группы В-Н). Совместная доставка обоих вариантов вакцины в одну и ту же конечность (группы F и G) или в разные конечности (группа H) может вызвать ответы против обоих вариантов на 42 день.

На **ФИГ. 3** представлена значимая индукция VNT, оцененная с помощью анализа CPE при использовании варианта SARS-CoV-2 B.1.351. На **ФИГ. 3 A** на 14 день и **ФИГ. 3 B** на 21 день представлено повышение VNT для всех групп В-Н. Совместная доставка мРНК-вакцины **CV2CoV** и CV2CoV.351 в одну и ту же конечность (группы F и G) или в разные конечности (группа H) может вызвать ответы против обоих вариантов вакцины на 14 день и 21 день. На **ФИГ. 3 C** на 42 день представлен повышенный уровень VNT для всех групп (группы В-Н). Совместная доставка обоих вариантов вакцины в одну и ту же конечность (группы F и G) или в разные конечности (группа H) может вызвать ответы против обоих вариантов на 42 день.

На **ФИГ. 4** представлена значимая индукция VNT, оцененная с помощью анализа CPE при использовании варианта SARS-CoV-2 B.1.1.7 (**ФИГ. 4 A**) или P.1 (B.1.1.28) (**ФИГ. 4 B**). На **ФИГ. 4 A** на 42 день представлен повышенный уровень VNT при использовании варианта B.1.1.7 для всех групп (группы В-Н).

Совместная доставка обоих вариантов вакцины в одну и ту же конечность (группы F и G) или в разные конечности (группа H) может вызвать ответы против обоих вариантов на 42 день. На ФИГ. 4 В на 42 день представлен повышенный уровень VNT при использовании варианта В.1.1.28 Р.1 для всех групп (группы В-Н). Совместная доставка обоих вариантов вакцины в одну и ту же конечность (группы F и G) или в разные конечности (группа H) может вызвать ответы против обоих вариантов на 42 день.

На ФИГ. 5 представлены значимые ответы в виде выработки связывающих антител IgG1 и IgG2a на 14 день (ФИГ. 5 А-Д) и на 21 день (ФИГ. 5 Е-Н) для групп, вакцинированных CV2CoV и CV2CoV.351. На 14 день на ФИГ. 5 А (титр IgG1) и 5 В (титр IgG2a) представлены дозозависимые уровни титров связывающих антител при применении доз 0,5 мкг, 2 мкг, 8 мкг и 40 мкг и достижение насыщения в группах, вакцинированных 40 мкг (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника). На 14 день на ФИГ. 5 С (титр IgG1) и 5 D (титр IgG2a) представлены дозозависимые уровни титров связывающих антител при применении доз 0,5 мкг, 2 мкг, 8 мкг и 40 мкг и достижение насыщения в группах, вакцинированных 40 мкг (при покрытии белком RBD варианта В.1.351 К417N, E484K, N501Y). На 21 день на ФИГ. 5 Е (титр IgG1) и 5 F (титр IgG2a) представлены дозозависимые уровни титра связывающих антител, а также титр IgG1 в состоянии насыщения и титр IgG2a в случае вакцинации CV2CoV.351 для всех количеств и насыщение для количеств >8 мкг (группа I) в случае CV2CoV (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника). На 21 день на ФИГ. 5 G (титр IgG1) и 5 H (титр IgG2a) представлены дозозависимые уровни титра связывающих антител, а также титры IgG1 и IgG2a в состоянии насыщения после вакцинации CV2CoV.351 для всех количеств и насыщение для количеств >8 мкг (группа I) в случае мРНК-вакцины CV2CoV (при покрытии белком RBD варианта В.1.351 К417N, E484K, N501Y).

На ФИГ. 6 представлена значимая индукция VNT, оцененная с помощью анализа СРЕ при использовании SARS-CoV-2-предшественника (CV2CoV, ФИГ. 6 А, 6 С и 6 Е) или варианта В.1.351 SARS-CoV-2 (CV2CoV.351, ФИГ. 6 В, 6 D и 6 F) на 14 день, 21 день и 42 день. На ФИГ. 6 также представлена значимая индукция VNT, оцененная на основании СРЕ при использовании варианта SARS-CoV-2 В.1.1.7 (ФИГ. 6 G) или варианта В.1.1.28 Р.1 (ФИГ. 6 H) на 42 день. На ФИГ. 6 А показано, что вакцина CV2CoV.351 против варианта В.1.351 индуцирует дозозависимые VNT против

SARS-CoV-2-предшественника (гетерологичный ответ) на 14 день в группах для всех доз. По сравнению с ответами после вакцинации CV2CoV (гомологичный ответ), на 14 день VNT в группах, вакцинированных CV2CoV.351, снижаются примерно в 2 раза. На **ФИГ. 6 В** показано, что CV2CoV.351 индуцирует дозозависимые VNT против SARS-CoV-2 B.1.351 (гомологичный ответ) на 14 день в группах для всех доз. Вакцинация CV2CoV.351 вызывала высокие уровни VNT против гомологичного вируса, которые на 14 день были повышены в 45 раз по сравнению с гетерологичными VNT против вируса-предшественника (среднее различие между группами для всех доз). По сравнению с вакцинацией CV2CoV, VNT, индуцированные CV2CoV.351, на 14 день были повышены в 41 раз (среднее различие между группами для всех доз). На **ФИГ. 6 С** показано, что вакцина CV2CoV.351 против варианта B.1.351 индуцирует дозозависимые VNT против SARS-CoV-2-предшественника (гетерологичный ответ) на 21 день в группах для всех доз. По сравнению с ответами после вакцинации CV2CoV (гомологичный ответ), на 21 день VNT в группах, вакцинированных CV2CoV.351, снижаются примерно в 2 раза. На **ФИГ. 6 D** показано, что CV2CoV.351 индуцирует незначительно зависящие от дозы VNT против SARS-CoV-2 B.1.351 (гомологичный ответ) на 21 день в группах для всех доз. Вакцинация CV2CoV.351 вызывала высокие уровни VNT против гомологичного вируса, которые на 21 день были повышены в 35 раз по сравнению с гетерологичными VNT против вируса-предшественника (среднее различие между группами для всех доз). По сравнению с вакцинацией CV2CoV, VNT, индуцированные CV2CoV.351, на 21 день были повышены в 42 раза (среднее различие между группами для всех доз). На **ФИГ. 6 E** показано, что вакцина CV2CoV.351 против варианта B.1.351 индуцировала дозозависимые VNT против SARS-CoV-2-предшественника (гетерологичный ответ) на 42 день в группах для всех доз. Незначительно более высокие ответы, за исключением всех случаев вакцинации дозой 0,5 мкг (группа F), были показаны после вакцинации CV2CoV (гомологичный ответ). На **ФИГ. 6 F** показано, что CV2CoV.351 индуцирует дозозависимые VNT против SARS-CoV-2 B.1.351 (гомологичный ответ) на 42 день в группах для всех доз. По сравнению с вакцинацией CV2CoV, VNT, индуцированные CV2CoV.351, на 42 день были повышены. На **ФИГ. 6 G** показано, что вакцина CV2CoV.351 против варианта B.1.351 индуцирует дозозависимые VNT против варианта SARS-CoV-2 B.1.1.7 (гетерологичный ответ) на 42 день в группах для всех доз. Схожие ответы для группы H, за исключением вакцинации дозой 0,5 мкг (группа F), были показаны после



вакцинации CV2CoV (гомологичный ответ). На **ФИГ. 6 Н** показано, что CV2CoV.351 индуцирует дозозависимые VNT против варианта SARS-CoV-2 B.1.1.28 P.1 (гомологичный ответ) на 42 день в группах для всех доз. Более низкие ответы наблюдали при вакцинации CV2CoV (гомологичный ответ).

На **ФИГ. 7** представлены значимые ответы в виде выработки связывающих антител IgG1 и IgG2a на 14 день (**ФИГ. 7 А-Д**) для групп, вакцинированных двухвалентной композицией мРНК-вакцин **CV2CoV + CV2CoV.351**, приготовленной в LNP. На 14 день на **ФИГ. 7 А** (титр IgG1) и **7 В** (титр IgG2a) представлены дозозависимые уровни титров связывающих антител при применении доз 0,5 мкг, 2 мкг и 8 мкг (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника). На 14 день на **ФИГ. 7 С** (титр IgG1) и **7 D** (титр IgG2a) представлены дозозависимые уровни титров связывающих антител при применении доз 0,5 мкг, 2 мкг и 8 мкг (при покрытии белком RBD варианта B.1.351 K417N, E484K, N501Y). Представлена значимая индукция VNT, оцененная с помощью анализа СРЕ при использовании SARS-CoV-2-предшественника (**ФИГ. 7 Е, 7 F и 7 I**) или варианта SARS-CoV-2 B.1.351 (**ФИГ. 7 G, 7 H и 7 J**) на 14 день, 21 день и 42 день, соответственно. На **ФИГ. 7 К** и **7 L** также представлена значимая индукция VNT, оцененная с помощью анализа СРЕ при использовании варианта SARS-CoV-2 1.1.7 (**ФИГ. 7 К**) или варианта B.1.1.28 P.1 (**ФИГ. 7 L**) на 42 день.

На **ФИГ. 8** представлены VNT, оцененные с помощью анализа СРЕ при использовании SARS-CoV-2-предшественника (**ФИГ. 8 А**) или при использованием варианта SARS-CoV-2 B.1.351 (**ФИГ. 8 В**). Бустерная иммунизация с помощью вакцины CV2CoV или вакцины против варианта B.1.351 CV2CoV.351 демонстрирует выраженную бустерную способность в отношении SARS-CoV-2-предшественника и варианта SARS-CoV-2 B.1.351 в случае гомологичного и гетерологичного ответа. Гомологичный ответ представлен на **ФИГ. 8 А** для групп В, D и F и на **ФИГ. 8 В** для групп С, Е и G. Гетерологичный ответ представлен на **ФИГ. 8 А** для групп С, Е и G и на **ФИГ. 8 В** для групп В, D и F. Вируснейтрализующие ответы против SARS-CoV-2-предшественника, а также против вариантов SARS-CoV-2 B.1.1.7 (альфа), B.1.351 (бета) и P.1 (гамма) исследовали через 14 дней после бустерной иммунизации (**ФИГ. 8 С – 8 F**) на 119 день (VNT против SARS-CoV-2-предшественника (**ФИГ. 8 С**), против SARS-CoV-2 B.1.351 (**ФИГ. 8 D**), против SARS-CoV-2 B.1.1.7 (**ФИГ. 8 Е**) и против P.1 (**ФИГ. 8 F**)).

На **ФИГ. 9** представлен значимый ответ в виде выработки связывающих шиповидный белок антител - общего IgG в отношении RBD SARS-CoV-2-предшественника (**ФИГ. 9 А**) и RBD варианта B.1.351 K417N, E484K, N501Y (**ФИГ. 9 В**) на 14 день для всех групп. Индукция VNT против различных вариантов SARS-CoV-2 в зависимости от времени представлена на **ФИГ. 9 С-Ф** (**ФИГ. 9 С**: предшественник; **ФИГ. 9 D**: B.1.1.7; **ФИГ. 9 E**: B.1.351; **ФИГ. 9 F**: P1). На **ФИГ. 9 G-J** представлены клеточные иммунные ответы CD8 (**ФИГ. 9 G** и **9 I**) и CD4 (**ФИГ. 9 H** и **9 J**) положительных Т-клеток у мышей, стимулированных смесью библиотеки пептидов SARS-CoV-2-предшественника (**ФИГ. 9 G** и **H**) или стимулированных смесью библиотеки пептидов SARS-CoV-2 B.1.351 (**ФИГ. 9 I** и **J**), оцененные с помощью анализа внутриклеточного окрашивания цитокинов.

На **ФИГ. 10** представлены клеточные иммунные ответы CD8 (**ФИГ. 10 В**) и CD4 (**ФИГ. 10 А**) положительных Т-клеток у мышей, стимулированных смесью библиотеки пептидов SARS-CoV-2-предшественника, оцененные с помощью анализа внутриклеточного окрашивания цитокинов.

На **ФИГ. 11** представлены VNT после праймирующей и бустерной вакцинации CVnCoV или CV2CoV и третьей вакцинации двухвалентной композицией вакцин CV2CoV + CV2CoV.351 у крыс в зависимости от времени вплоть до 133 дня после первой вакцинации (**ФИГ. 11 А**: VNT против SARS-CoV-2-предшественника, **ФИГ. 11 В**: VNT против SARS-CoV-2 B.1.351). На 119 день были индуцированы устойчивые и высокие VNT не только против SARS-CoV-2-предшественника и SARS-CoV-2 B.1.351, но и против вариантов SARS-CoV-2 B.1.1.7 и P.1 (**ФИГ. 11 С**: предшественник, **ФИГ. 11 D**: B.1.351, **ФИГ. 11 E**: B.1.1.7, **ФИГ. 11 F**: P.1).

На **ФИГ. 12** представлены ответы в виде выработки антител после вакцинации вакцинными композициями, содержащими различные форматы мРНК стабилизированного шиповидного белка (S\_stab pp) варианта дельта SARS-CoV-2 B.1.617.2, у крыс (**ФИГ. 12 А** и **12 В**: обнаруженные с помощью ELISA связывающие шиповидный белок антитела против RBD варианта дельта B.1.617.2 на 14 день и 42 день, соответственно; **ФИГ. 12 С**, **12 D**, **12 E**: VNT против SARS-CoV-2 B.1.617.2 на 14 день, 21 день и 42 день, соответственно). Устойчивые VNT были индуцированы не только против гомологичного варианта SARS-CoV-2 (B.1.617.2), но и против гетерологичного SARS-CoV-2-предшественника и вариантов SARS-CoV-2 B.1.351 и P.1 (**ФИГ. 12 F**: предшественник, **ФИГ. 12 G**: B.1.351, **ФИГ. 12 H**: P.1).

На **ФИГ. 13** представлены ранние ответы в виде выработки антител (общий IgG) на 14 день после вакцинации вакцинными композициями, содержащими различные конструкции мРНК, кодирующие S\_stab pp различных вариантов SARS-CoV-2, у крыс. Кроме того, при бивалентном подходе сравнивают химически модифицированную мРНК с немодифицированной мРНК (**ФИГ. 13 А**: RBD предшественника; **ФИГ. 13 В**: RBD дельта (L452R, T478K); **ФИГ. 13 С**: RBD бета (K417N, E484K, N501Y).

На **ФИГ. 14** представлена эффективность вакцины при заражении мышей либо вариантом SARS-CoV-2 В.1.351, либо вариантом SARS-CoV-2 В.1.627.2. Выживаемость зараженных мышей представлена на **ФИГ. 14 А**: заражение В.1.351 и **ФИГ. 14 В**: заражение В.1.617.2. Среднее изменение массы тела в процентах представлено на **ФИГ. 14 С**: заражение В.1.351 и **ФИГ. 14 D**: заражение В.1.617.2. Нагрузка вирусной РНК в слюне представлена на **ФИГ. 14 Е**: группа заражения В.1.351 и **ФИГ. 14 F**: группа заражения В.1.617.2. Вирусная нагрузка в верхних дыхательных путях (ВДП) (раковинах) показана на **ФИГ. 14 G** для группы заражения В.1.351 и **ФИГ. 14 H** для группы заражения В.617.2, а в нижних дыхательных путях (НДП) (легких) на **ФИГ. 14 I** (заражение В.1.351) и **И** (заражение В.1.617.2). Вирусная нагрузка в головном мозге представлена на **ФИГ. 14 K- ФИГ. N** (**ФИГ. 14 K и L** для мозжечка, **ФИГ. 14 M и N** для большого мозга (для группы заражения В.1.351: **ФИГ. 14 K и M**, для В.1.617.2: **ФИГ. 14 L и N**). Индукция общих иммуноглобулинов к RBD представлена на **ФИГ. 14 O**: группа заражения В.1.351 и **ФИГ. 14 P**: группа заражения В.1.617.2, а VNT - на **ФИГ. 14 Q**: группа В.1.351 после заражения, **ФИГ. 14 R**: группа В.1.617.2 до заражения и **ФИГ. 14 S**: группа В.1.617.2 после заражения.

На **ФИГ. 15** представлена эффективность вакцины у хомячков, зараженных вариантом SARS-CoV-2 В.1.351. На **ФИГ. 15 А** показано изменение массы тела в процентах по дням после заражения. Нагрузка вирусной РНК в слюне представлена на **ФИГ. 15B**, а в тканях легких - на **ФИГ. 15 C**. На **ФИГ. 15 D** показана индукция общих иммуноглобулинов (Ig) к RBD, а на **ФИГ. 15 E** - VNT.

### **Определения**

С целью ясности и удобства чтения представлены следующие определения. Любой технический признак, упомянутый в этих определениях, может быть включен во все без исключения воплощения настоящего изобретения. В контексте этих

воплощений могут быть конкретно предоставлены дополнительные определения и пояснения.

Проценты в контексте чисел следует понимать как относящиеся к общему количеству соответствующих элементов. В других случаях и если контекстом не предусмотрено иное, проценты следует понимать как проценты по массе (масс.%).

Примерно: Термин «примерно» используется, когда детерминанты или значения не обязательно должны быть идентичными, то есть на 100% одинаковыми. Соответственно, «примерно» означает, что определяемые величины или значения могут отличаться на 0,1%-20% или на 0,1%–10%, включая любую точку в пределах этих диапазонов; например, на 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%. Специалисту известно, что, например, некоторые параметры или детерминанты могут незначительно отличаться в зависимости от метода определения параметра. Например, если некоторые детерминанты или значение определены в настоящем документе как имеющие, например, длину «примерно 1000 нуклеотидов», длина может отличаться на 0,1%-20% или на 0,1%-10%, включая любую точку в пределах этих диапазонов; например, на 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%. Соответственно, специалисту известно, что в этих конкретных примерах длина может отличаться на 1-200 нуклеотидов или на 1-100 нуклеотидов; в частности, на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 нуклеотидов или любое целочисленное значение в пределах указанного диапазона.

Адаптивный иммунный ответ: Термин «адаптивный иммунный ответ», используемый в настоящем документе, известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения специфичного к антигену ответа иммунной системы (адаптивная иммунная система). Антигенная специфичность обеспечивает возможность получения ответов, адаптированных к конкретным патогенам или инфицированным патогенами клеткам. Способность формировать эти адаптированные ответы обычно поддерживается в организме «клетками памяти» (В-клетками). В контексте настоящего изобретения антиген обеспечивается РНК, кодирующей по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из SARS-CoV-2, например из штамма SARS-Cov-2, включая, но не

ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия). Предпочтительно антиген обеспечивается РНК, кодирующей по меньшей мере один антигенный пептид, полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, например, включающий шиповидный белок, полученный из штамма SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

Антиген: Термин «антиген», используемый в настоящем документе, известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения вещества, которое может быть распознано иммунной системой, предпочтительно адаптивной иммунной системой, и способно вызывать специфичный к антигену иммунный ответ, например, путем образования антител и/или специфичных к антигену Т-клеток в качестве части адаптивного иммунного ответа. Как правило, антиген может представлять собой или может содержать пептид или белок, которые могут быть презентированы с помощью МНС Т-клеткам. Также фрагменты, варианты и производные пептидов или белков, полученные, например, из шиповидного белка (S) SARS-CoV-2, например, шиповидного белка (S) штамма SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5),

С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия), содержащие по меньшей мере один эпитоп, рассматриваются как антигены в контексте настоящего изобретения. В контексте настоящего изобретения антиген может представлять собой продукт трансляции предложенной РНК, определенной в настоящем документе.

Антигенный пептид или белок: Термин «антигенный пептид или белок» или «иммуногенный пептид или белок» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения пептида, белка, полученного из (антигенного или иммуногенного) белка, который стимулирует адаптивную иммунную систему организма с обеспечением адаптивного иммунного ответа. Следовательно, антигенный/иммуногенный пептид или белок содержит по меньшей мере один эпитоп или антиген белка, из которого он получен (например, шиповидного белка (S) SARS-CoV-2), например, полученный из шиповидного белка (S) штамма SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

Катионный: Если иное значение явно не следует из конкретного контекста, термин «катионный» означает, что соответствующая структура имеет положительный заряд либо постоянно, либо не постоянно, а в качестве ответа на определенные условия, такие как pH. Таким образом, термин «катионный» охватывает термины как «постоянно катионный», так и «катионизируемый».

Катионируемый: Термин «катионируемый», используемый в настоящем документе, означает, что соединение, или группа, или атом положительно заряжены при более низком рН и не заряжены при более высоком рН среды. Также в неводных средах, где значение рН не может быть определено, катионируемое соединение, группа или атом положительно заряжены при высокой концентрации ионов водорода и не заряжены при низкой концентрации или активности ионов водорода. Это зависит от индивидуальных свойств катионируемого или поликатионируемого соединения, в частности, рКа соответствующей катионируемой группы или атома, от того, при каком рН или концентрации ионов водорода они заряжены или не заряжены. В разбавленных водных средах доля катионируемых соединений, групп или атомов, имеющих положительный заряд, может быть оценена с помощью так называемого уравнения Гендерсона-Хассельбаха, которое хорошо известно специалисту в данной области техники. Например, в некоторых воплощениях, если соединение или фрагмент являются катионируемыми, предпочтительно, чтобы они были положительно заряжены при значении рН примерно от 1 до 9, предпочтительно от 4 до 9, от 5 до 8 или даже от 6 до 8, более предпочтительно при значении рН 9 или ниже, 8 или ниже, 7 или ниже, наиболее предпочтительно при физиологических значениях рН, например, примерно от 7,3 до 7,4, то есть в физиологических условиях, в частности, при физиологическом содержании солей в клетке *in vivo*. В других воплощениях предпочтительно, чтобы катионируемое соединение или фрагмент были преимущественно нейтральными при физиологических значениях рН, например, примерно 7,0-7,4, но приобретали положительный заряд при более низких значениях рН. В некоторых воплощениях предпочтительный диапазон рКа для катионируемого соединения или фрагмента составляет от примерно 5 до примерно 7.

Кодирующая последовательность/кодирующая область: Термины «кодирующая последовательность» или «кодирующая область» и соответствующая аббревиатура «cds», используемые в настоящем документе, известны и понятны среднему специалисту в данной области техники и предназначены, например, для обозначения последовательности нескольких триплетов нуклеотидов, которая может подлежать трансляции с получением пептида или белка. Кодирующая последовательность в контексте настоящего изобретения может представлять собой последовательность РНК, состоящую из числа нуклеотидов, которое может быть поделено на три, которая начинается с иницирующего кодона и предпочтительно заканчивается стоп-кодоном.

Полученный из: Термин «полученная из», используемый во всем объеме настоящего описания в контексте нуклеиновой кислоты, то есть для нуклеиновой кислоты, «полученной из» (другой) нуклеиновой кислоты, означает, что указанная нуклеиновая кислота, полученная из (другой) нуклеиновой кислоты, имеет, например, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательностей с нуклеиновой кислотой, из которой она получена. Специалисту известно, что идентичность последовательностей, как правило, вычисляют для одних и тех же типов нуклеиновых кислот, то есть для последовательностей ДНК или для последовательностей РНК. Таким образом, понятно, что если ДНК «получена из» РНК или если РНК «получена из» ДНК, на первой стадии последовательность РНК превращают в соответствующую последовательность ДНК (в частности, путем замены остатков урацила (U) на остатки тимидина (T) во всей последовательности) или, наоборот, последовательность ДНК превращают в соответствующую последовательность РНК (в частности, путем замены T на U во всей последовательности). После этого определяют идентичность последовательностей ДНК или идентичность последовательностей РНК. Предпочтительно термин нуклеиновая кислота, «полученная из» нуклеиновой кислоты, также относится к нуклеиновой кислоте, которая является модифицированной по сравнению с нуклеиновой кислотой, из которой она получена, например, с целью дополнительного повышения стабильности РНК и/или пролонгирования и/или повышения продукции белка. В контексте аминокислотных последовательностей (например, антигенных пептидов или белков) термин «полученный из» означает, что указанная аминокислотная последовательность, полученная из (другой) аминокислотной последовательности, имеет, например, по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью, из которой она получена.

Эпитоп: Термин «эпитоп» (также называемый в данной области техники «антигенной детерминантой»), используемый в настоящем документе, известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения эпитопов Т-клеток или эпитопов В-клеток. Эпитопы Т-клеток представляют собой части антигенных пептидов или белков и могут включать



фрагменты, предпочтительно имеющие длину от примерно 6 до примерно 20 или даже более аминокислот, например, фрагменты, процессируемые и презентуемые молекулами МНС класса I, предпочтительно имеющие длину от примерно 8 до примерно 10 аминокислот, например 8, 9 или 10 (или даже 11 или 12 аминокислот), или фрагменты, процессируемые и презентуемые молекулами МНС класса II, предпочтительно имеющие длину от примерно 13 до примерно 20 или даже более аминокислот. Эти фрагменты, как правило, распознаются Т-клетками в виде комплекса, состоящего из пептидного фрагмента и молекулы МНС, то есть фрагменты, как правило, не распознаются в их нативной форме. Эпитопы В-клеток, как правило, представляют собой фрагменты, расположенные на внешней поверхности (нативных) белковых или пептидных антигенов, предпочтительно содержащие от 5 до 15 аминокислот, более предпочтительно содержащие от 5 до 12 аминокислот, еще более предпочтительно содержащие от 6 до 9 аминокислот, которые могут быть распознаны антителами, то есть находящиеся в нативной форме. Кроме того, такие эпитопы белков или пептидов могут быть выбраны из любых из упомянутых в настоящем документе вариантов таких белков или пептидов. В этом контексте эпитопы могут представлять собой конформационные, или прерывистые, эпитопы, которые состоят из сегментов белков или пептидов, определенных в настоящем документе, которые отстоят друг от друга в аминокислотной последовательности белков или пептидов, определенных в настоящем документе, но объединены в трехмерную структуру, или непрерывные, или линейные, эпитопы, состоящие из одной полипептидной цепи.

Фрагмент: Термин «фрагмент», используемый во всем объеме настоящего описания в контексте последовательности нуклеиновой кислоты (например, РНК или ДНК) или аминокислотной последовательности, как правило, может обозначать более короткую часть полноразмерной последовательности, например, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, которая при этом сохраняет надлежащую функцию. Соответственно, фрагмент, как правило, состоит из последовательности, идентичной соответствующему участку внутри полноразмерной последовательности. Предпочтительный фрагмент последовательности в контексте настоящего изобретения состоит из непрерывного участка из структурных единиц, таких как нуклеотиды или аминокислоты, соответствующего непрерывному участку из структурных единиц в молекуле, из которой получен фрагмент, и составляет по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% от полной (то есть полноразмерной) молекулы, из которой получен указанный фрагмент (например, шиповидный белок (S) SARS-CoV-2, полученный, например, из шиповидного белка (S) штамма SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия)). Термин «фрагмент», используемый во всем объеме настоящего описания в контексте белков или пептидов, как правило, может включать последовательность белка или пептида, определенного в настоящем документе, которая, в отношении его аминокислотной последовательности, является укороченной с N-конца и/или С-конца по сравнению с аминокислотной последовательностью исходного белка. При этом, такое усечение может происходить либо на уровне аминокислот, либо, соответственно, на уровне нуклеиновых кислот. Следовательно, идентичность последовательности применительно к такому фрагменту, определенному в настоящем документе, может предпочтительно относиться ко всему белку или пептиду, определенному в настоящем документе, или ко всей (кодирующей) молекуле нуклеиновой кислоты такого белка или пептида. Фрагменты белков или пептидов могут содержать по меньшей мере один эпитоп этих белков или пептидов.

Гетерологичный: Термины «гетерологичный» или «гетерологичная последовательность», используемые во всем объеме настоящего описания в контексте последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, относятся к последовательности (например, РНК, ДНК, аминокислотной последовательности), которую следует понимать как последовательность, которая получена из другого гена, другого аллеля или, например, другого вида или вируса. Две последовательности, как правило, считаются «гетерологичными», если они не могут быть получены из одного и того же гена или одного и того же аллеля. То есть, хотя гетерологичные последовательности могут быть получены из одного и того же

организма или вируса, в природе они не встречаются в одной и той же нуклеиновой кислоте или белке.

Гуморальный иммунный ответ: Термины «гуморальный иммунитет» или «гуморальный иммунный ответ» известны и понятны среднему специалисту в данной области техники и предназначены, например, для обозначения опосредованной В-клетками выработки антител, и, возможно, дополнительных процессов, сопровождающих выработку антител. Гуморальный иммунный ответ, как правило, может характеризоваться, например, активацией Th2 и выработкой цитокинов, формированием зародышевого центра и переключением изотипа, созреванием аффинности и образованием клеток памяти. Гуморальный иммунитет может также относиться к эффекторным функциям антител, которые включают нейтрализацию патогенов и токсинов, активацию комплемента по классическому пути, а также стимулирование опсоном фагоцитоза и устранение патогенов.

Идентичность (последовательности): Термин «идентичность», используемый во всем объеме настоящего документа в контексте последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения доли в процентах, в которой две последовательности являются идентичными по полной/всей их длине или в определенной обозначенной части, области или домене. Например, наблюдается по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% идентичности по полной/всей их длине или в определенной обозначенной части, области или домене. Чтобы определить долю в процентах, в которой две последовательности идентичны, например, последовательности нуклеиновых кислот или последовательности аминокислот (aa), определенные в настоящем документе, предпочтительно последовательности aa, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, определенной в настоящем документе, или последовательности aa как таковые, указанные последовательности могут быть выровнены для последующего сравнения друг с другом. Следовательно, например, положение в первой последовательности можно сравнить с соответствующим положением во второй последовательности. Если положение в первой последовательности занято тем же остатком, которым занято положение во второй последовательности, две последовательности идентичны в этом положении. Если это не так, последовательности

различны в этом положении. Если во второй последовательности имеются вставки по сравнению с первой последовательностью, в первую последовательность могут быть введены пропуски, чтобы обеспечить возможность дальнейшего выравнивания. Если во второй последовательности имеются делеции по сравнению с первой последовательностью, во вторую последовательность могут быть введены пропуски, чтобы обеспечить возможность дальнейшего выравнивания. Следовательно, доля в процентах, в которой две последовательности являются идентичными, представляет собой функцию от количества идентичных положений, деленного на общее количество положений, включая те положения, которые заняты только в одной последовательности. Доля в процентах, в которой две последовательности идентичны, может быть определена с помощью алгоритма, например, алгоритма, интегрированного в программу BLAST.

Иммуноген, иммуногенный: Термины «иммуноген» или «иммуногенный» известны и понятны среднему специалисту в данной области техники и предназначены, например, для обозначения соединения, которое способно стимулировать/индуцировать иммунный ответ. Предпочтительно иммуноген может представлять собой пептид, полипептид или белок. Иммуноген в контексте настоящего изобретения представляет собой продукт трансляции предложенной РНК, содержащей по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид, белок, полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, например, белок, полученный из шиповидного белка штамма SARS-CoV-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия), как определено в настоящем документе. Как правило, иммуноген вызывает адаптивный иммунный ответ.

Иммунный ответ: Термин «иммунный ответ» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения специфичной реакции адаптивной иммунной системы на конкретный антиген (так называемый специфичный или адаптивный иммунный ответ) или неспецифичной реакции врожденной иммунной системы (так называемый неспецифичный или врожденный иммунный ответ) или их комбинации. Подходящая вакцина индуцирует эффективный иммунный ответ у соответствующего норме здорового реципиента, которому вводится вакцина. При эффективном иммунном ответе одна вакцинация обеспечит титр вируснейтрализующих антител. Кроме того, или в качестве альтернативы, эффективный иммунный ответ будет вызывать адаптивный иммунный ответ. В некоторых воплощениях эффективный иммунный ответ будет снижать коронавирусную инфекцию по меньшей мере на 50% по сравнению с титром нейтрализующих антител у невакцинированного контрольного субъекта. В некоторых воплощениях эффективным иммунным ответом будет иммунный ответ, при котором титр нейтрализующих антител и/или Т-клеточный иммунный ответ достаточен для снижения частоты бессимптомной вирусной инфекции по сравнению с титром нейтрализующих антител у невакцинированных контрольных субъектов. Эффективным иммунным ответом также может быть иммунный ответ, при котором титр нейтрализующих антител и/или Т-клеточный иммунный ответ достаточен для предупреждения латентного существования вируса у субъекта, и/или титр нейтрализующих антител достаточен для блокирования слияния вируса с эпителиальными клетками субъекта. В некоторых воплощениях эффективный иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, при котором введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида или вакцины индуцирует Т-клеточный иммунный ответ против коронавируса у субъекта. В предпочтительных воплощениях Т-клеточный иммунный ответ включает иммунный ответ CD4<sup>+</sup> Т-клеток и/или иммунный ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В других аспектах эффективный иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, который обеспечивает защиту субъекта от тяжелого заболевания COVID-19 в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев и/или снижает частоту госпитализаций по сравнению с невакцинированным субъектом. Эффективный иммунный ответ может также снизить передачу вируса по сравнению с передачей от невакцинированного субъекта, инфицированного вирусом. Эффективный иммунный ответ можно также

рассматривать как иммунный ответ, который обеспечивает некоторую защиту от вариантов, что обусловлено гетерологичными иммунными ответами.

Иммунная система: Термин «иммунная система» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения системы организма, которая может защищать организмы от инфекции. Если патогену удастся преодолеть физический барьер организма и проникнуть в этот организм, врожденная иммунная система обеспечивает немедленный, но неспецифичный ответ. Если патогены избегают этого врожденного ответа, у позвоночных имеется второй уровень защиты, адаптивная иммунная система. В этом случае иммунная система адаптирует свой ответ во время инфекции, чтобы улучшить распознавание патогена. Этот улучшенный ответ впоследствии сохраняется после устранения патогена в форме иммунологической памяти и позволяет адаптивной иммунной системе обеспечивать более быстрые и сильные реакции каждый раз, когда встречается этот патоген. В соответствии с этим иммунная система включает врожденную и адаптивную иммунную систему. Каждая из этих двух частей, как правило, включает так называемые гуморальные и клеточные компоненты.

Врожденная иммунная система: Термин «врожденная иммунная система» (известная также как неспецифичная или неспецифическая иммунная система) известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения системы, как правило, включающей клетки и механизмы, которые защищают хозяина от инфекции другими организмами неспецифичным образом. Это означает, что клетки врожденной системы могут распознавать патогены и отвечать на них универсальным образом, но, в отличие от адаптивной иммунной системы, она не обеспечивает хозяину длительного или защитного иммунитета. Врожденная иммунная система может быть активирована лигандами паттерн-распознающего рецептора, например, Toll-подобных рецепторов, NOD-подобных рецепторов или RIG-I-подобных рецепторов и так далее.

Липидоидное соединение: Липидоидное соединение, также называемое липидоидом, представляет собой липидоподобное соединение, то есть амфифильное соединение с липидоподобными физическими свойствами. В контексте настоящего изобретения предполагается, что термин «липид» охватывает липидоидные соединения.

Постоянно катионный: Термин «постоянно катионный», используемый в настоящем документе, известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и означает, например, что соответствующее соединение, или группа, или атом положительно заряжены при любом значении рН или активности ионов водорода в среде. Как правило, положительный заряд возникает вследствие присутствия четвертичного атома азота. Если соединение несет множество таких положительных зарядов, его можно назвать постоянно поликатионным.

Последовательность РНК: Термин «последовательность РНК» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения конкретного и индивидуального порядка следования непрерывного ряда рибонуклеотидов.

Стабилизированная РНК: Термин «стабилизированная РНК» относится к РНК, которая модифицирована таким образом, что она становится более устойчивой к дезинтеграции или деградации, например, под действием факторов окружающей среды или ферментативного расщепления, такого как деградация под действием экзо- или эндонуклеаз, по сравнению с РНК без такой модификации. Предпочтительно стабилизированная РНК в контексте настоящего изобретения является стабилизированной в клетке, такой как прокариотическая или эукариотическая клетка, предпочтительно в клетке млекопитающего, такой как клетка человека. Эффект стабилизации может проявляться также вне клеток, то есть в буферном растворе и так далее, например, для хранения композиции, содержащей стабилизированную РНК.

Т-клеточные ответы: Термины «клеточный иммунитет», или «клеточный иммунный ответ», или «клеточные ответы Т-клеток», используемые в настоящем документе, известны и понятны среднему специалисту в данной области техники и предназначены, например, для обозначения активации макрофагов, клеток-естественных киллеров (НК), специфичных к антигену цитотоксических Т-лимфоцитов и высвобождения различных цитокинов в ответ на антиген. В более общем смысле клеточный иммунитет основан не на антителах, а на активации клеток иммунной системы. Как правило, клеточный иммунный ответ может характеризоваться, например, активацией специфичных к антигену цитотоксических Т-лимфоцитов, способных индуцировать апоптоз в клетках, например, специфичных иммунных клетках, таких как дендритные клетки или другие клетки, представляющие на своей поверхности эпитопы чужеродных антигенов.

UTR: Термин «нетранслируемая область», или «UTR», или «элемент UTR» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения части молекулы нуклеиновой кислоты, расположенной, как правило, с 5'-конца или 3'-конца кодирующей последовательности. UTR не транслируется с получением белка. UTR может представлять собой часть нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК. UTR может содержать элементы для контроля экспрессии генов, также называемые регуляторными элементами. Такие регуляторные элементы могут представлять собой, например, сайты связывания рибосом, сайты связывания микроРНК и так далее.

3'-UTR: Термин «3'-нетранслируемая область», или «3'-UTR», или «элемент 3'-UTR» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения части молекулы нуклеиновой кислоты, расположенной с 3'-конца (то есть следующей после) кодирующей последовательности и не транслируемой с получением белка. 3'-UTR может представлять собой часть РНК, расположенную между кодирующей последовательностью и (возможно) поли(А)-последовательностью. 3'-UTR может содержать элементы для контроля экспрессии генов, также называемые регуляторными элементами. Такие регуляторные элементы могут представлять собой, например, сайты связывания рибосом, сайты связывания микроРНК и так далее.

5'-UTR: Термин «5'-нетранслируемая область», или «5'-UTR», или «элемент 5'-UTR» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения части молекулы нуклеиновой кислоты, расположенной с 5'-конца (то есть предшествующей) кодирующей последовательности и не транслируемой с получением белка. 5'-UTR может представлять собой часть РНК, расположенную между кодирующей последовательностью и (возможно) 5'-кэпом. 5'-UTR может содержать элементы для контроля экспрессии генов, также называемые регуляторными элементами. Такие регуляторные элементы могут представлять собой, например, сайты связывания рибосом, сайты связывания микроРНК и так далее.

Вариант (последовательности): Термин «вариант», используемый во всем объеме настоящего документа в контексте последовательности нуклеиновой кислоты, известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения варианта последовательности нуклеиновой кислоты, полученного из другой последовательности нуклеиновой кислоты. Например, вариант



последовательности нуклеиновой кислоты может иметь одну или более делеций, вставок, добавлений и/или замен нуклеотидов по сравнению с последовательностью нуклеиновой кислоты, из которой получен указанный вариант. Вариант последовательности нуклеиновой кислоты может быть по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, из которой получен указанный вариант. Вариант представляет собой функциональный вариант в том аспекте, что указанный вариант сохранил по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более функцию последовательности, из которой он получен. В одном из воплощений «вариант» последовательности нуклеиновой кислоты может иметь по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% идентичности нуклеотидов на участке по меньшей мере из 10, 20, 30, 50, 75 или 100 нуклеотидов такой последовательности нуклеиновой кислоты.

Термин «вариант», используемый во всем объеме настоящего документа в контексте белков или пептидов, предназначен, например, для обозначения варианта белка или пептида, имеющего аминокислотную последовательность, которая отличается от исходной последовательности одной или более мутациями/заменами, такими как одна или более подвергнутых замене, вставке и/или делеции аминокислот. Например, в некоторых аспектах вставка в последовательность белка включает вставку от 1 до 10 аминокислот, как то 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 следующих одна за другой аминокислот. Предпочтительно эти фрагменты и/или варианты могут иметь одинаковые или сопоставимые специфичные антигенные свойства (иммуногенные варианты, антигенные варианты). Вставки и замены возможны, в частности, в тех положениях последовательности, в которых они не вызывают модификации трехмерной структуры или не влияют на область связывания. Модификации трехмерной структуры путем вставки (вставок) или делеции (делеций) могут быть легко определены, например, с помощью спектров CD (спектров кругового дихроизма). «Вариант» белка или пептида может иметь по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% идентичности аминокислот на участке по меньшей мере из 10,

20, 30, 50, 75 или 100 аминокислот или по всей длине такого белка или пептида. Предпочтительно вариант белка может включать функциональный вариант белка, что в контексте настоящего изобретения означает, что указанный вариант демонстрирует по существу такую же иммуногенность или по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или более иммуногенности белка, из которого он получен.

### **Краткое изложение сущности изобретения**

Настоящее изобретение частично основано на обнаружении того факта, что РНК, кодирующая шиповидные белки, полученные из вариантов SARS-CoV-2, может эффективно экспрессироваться в клетках человека и индуцировать ответ в виде выработки антител у животных, который, обладая широким спектром действия, нейтрализует различные варианты SARS-CoV-2, например, штамм SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия). Кроме того, также показано, что смеси РНК, кодирующие различные варианты шиповидных белков SARS-CoV-2, эффективно обеспечивают выработку нейтрализующих антител к ряду вариантов SARS-CoV-2. Эти результаты служат основой для новых вакцин против коронавируса на основе РНК.

Последовательности РНК, композиция или вакцины, описанные в настоящем документе, обладают по меньшей мере некоторыми из следующих полезных признаков:

- Трансляция РНК в месте инъекции/вакцинации (например, мышце);
- Очень эффективная индукция специфичных к антигену иммунных ответов против кодируемого белка SARS-CoV-2 при очень низкой дозе и схеме введения;
- Пригодность для вакцинации детей раннего возраста и/или новорожденных или людей старшего возраста, особенно людей старшего возраста;

- Пригодность композиции/вакцины для внутримышечного введения;
- Индукция специфичного и функционального гуморального иммунного ответа против вариантов SARS-CoV-2;
- Индукция функциональных клеточных ответов Т-клеток с широким спектром действия против вариантов SARS-CoV-2;
- Индукция специфичной В-клеточной памяти против вариантов SARS-CoV-2;
- Индукция функциональных антител, способных эффективно нейтрализовать варианты вируса SARS-CoV-2;
- Индукция функциональных антител, также способных эффективно нейтрализовать исходный вирус SARS-CoV-2;
- Повышение опосредованного IgA иммунитета слизистых оболочек путем индукции антител IgA слизистых оболочек;
- Индукция сбалансированного ответа В-клеток и Т-клеток;
- Индукция защитного иммунитета против вариантов SARS-CoV-2;
- Быстрое начало иммунной защиты от вариантов SARS-CoV-2;
- Продолжительность индуцированных иммунных ответов против вариантов SARS-CoV-2;
- Отсутствие усиления инфекции SARS-CoV-2 вследствие вакцинации или иммунопатологических эффектов;
- Отсутствие антителозависимого усиления (ADE) инфекции, вызванного вакциной против SARS-CoV-2 на основе РНК;
- Отсутствие избыточной индукции системного цитокинового или хемокинового ответа после применения вакцины, что могло бы привести к нежелательной высокой реактогенности при вакцинации;
- Хорошая переносимость, отсутствие побочных эффектов, нетоксичность вакцины;
- Обеспечивающие преимущество характеристики стабильности вакцины на основе РНК;
- Скорость, пригодность для адаптации, простота и масштабируемость производства вакцины против вариантов SARS-CoV-2;

- Обеспечивающая преимущество схема вакцинации, при которой требуется только одна или две вакцинации для достаточной защиты;
- Обеспечивающая преимущество схема вакцинации, при которой требуется только низкая доза вакцины для достаточной защиты;
- Обеспечивающая преимущество схема вакцинации, при которой требуется только низкая доза композиции/вакцины для достаточной защиты, что позволяет комбинировать различные обеспечивающие антиген РНК для получения поливалентных вакцин;
- Возможность стимулирования существующего иммунитета против SARS-CoV-2, предпочтительно индуцирующего дополнительные иммунные ответы против вариантов SARS-CoV-2;
- Индукция различных, специфичных к штаммам SARS-CoV-2 иммунных ответов у субъектов, подвергшихся воздействию другого штамма или вакцинированных вакциной против другого штамма;
- Индукция иммунного ответа с широким спектром действия в отношении различных вариантов SARS-CoV-2.

**В первом аспекте** настоящего изобретения предложена РНК, кодирующая по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485; F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505; Q506; Y144; A570; P681; T716; S982; D1118; L18; D80; D215; L242; A243; L244; R246; A701; T20; P26; D138; R190; H655; T1027; S13; W152; L452; R346; P384; G447; G502; T748; A522; V1176; T859; S247; Y248; L249; T250; P251; G252; G75; T76; D950; E154; G769; S254; Q613; F157; R158; Q957; D253; T95; F888; Q677; A67; Q414; N450; V483; G669; T732; Q949; Q1071; E1092; H1101; N1187; W258; T19; V126; H245; S12; A899; G142; E156; K558 и/или Q52, относительно последовательности SEQ ID NO: 1, где РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную нетранслируемую область. В некоторых воплощениях РНК кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, который содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем положению в шиповидном белке варианта SARS-CoV-2 (например, белке из штамма

SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия)).

Во **втором аспекте** настоящего изобретения предложена композиция, предпочтительно иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту. Соответственно, указанная композиция содержит по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту, приготовленную в носителях на липидной основе, предпочтительно в липидных наночастицах (LNP). В предпочтительных воплощениях второй аспект относится к поливалентным композициям, таким как композиции, содержащие РНК, кодирующие шиповидные белки SARS-CoV-2, имеющие различные кодирующие аминокислоты последовательности (например, шиповидные белки из более чем одного штамма SARS-CoV-2, включая более чем один вариантный штамм SARS-CoV-2, например, шиповидные белки из более чем одного штамма SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия)).

В **третьем аспекте** настоящего изобретения предложена вакцина против варианта SARS-CoV-2, где указанная вакцина содержит по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту или по меньшей мере одну композицию согласно второму

аспекту. В предпочтительных воплощениях второй аспект относится к поливалентным вакцинам против SARS-CoV-2. В предпочтительных воплощениях третий аспект относится к бустерным вакцинам против варианта SARS-CoV-2. Бустерные вакцины против варианта SARS-CoV-2 могут быть получены для одного или более штаммов SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

**В четвертом аспекте** настоящего изобретения предложен набор или составной набор, содержащий по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту, и/или по меньшей мере одну композицию согласно второму аспекту, и/или по меньшей мере одну вакцину против варианта SARS-CoV-2 согласно третьему аспекту.

**В пятом аспекте** настоящего изобретения предложена комбинация, содержащая по меньшей мере два отдельных компонента, где указанные по меньшей мере два отдельных компонента каждый представляют собой разновидности РНК согласно первому аспекту, и/или композиции согласно второму аспекту, и/или вакцины против варианта SARS-CoV-2 согласно третьему аспекту, то есть каждый компонент представляет собой разновидность РНК, композицию и/или вакцину против варианта SARS-Cov-2, нацеленные на различные SARS-Cov-2, где каждый из указанных двух отдельных компонентов может быть нацелен на вариант SARS-Cov-2, включая, но не ограничиваясь ими: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда),

В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), Р.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), Р.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

**Другие аспекты** настоящего изобретения относятся к способу лечения или предупреждения инфекции SARS-CoV-2 у субъекта, а также к первому и второму медицинскому применению нуклеиновой кислоты, композиций и вакцин. Также предложены способы изготовления указанных нуклеиновой кислоты, композиции или вакцины.

#### **Подробное изложение сущности изобретения**

Настоящая заявка подана совместно с перечнем последовательностей в электронном формате, который является частью описания настоящей заявки (стандарт WIPO ST.25). Информация, содержащаяся в перечне последовательностей, полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В случае, когда в настоящем документе имеется ссылка на «SEQ ID NO», она относится к соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты или последовательности аминокислот (aa) в перечне последовательностей, имеющей соответствующий идентификатор. Для многих последовательностей перечень последовательностей также содержит дополнительную подробную информацию, например, относительно определенных структурных особенностей, оптимизации последовательности, идентификаторов GenBank (NCBI) или GISAID (epi), или дополнительную подробную информацию о кодирующей емкости последовательности. В частности, такая информация представлена под числовым идентификатором <223> в перечне последовательностей согласно стандарту WIPO ST.25. Соответственно, информация, представленная под указанным числовым идентификатором <223>, явным образом полностью включена в настоящий документ и ее следует рассматривать как неотъемлемую часть описания представленного ниже изобретения.

#### **РНК, подходящая для вакцины против варианта SARS-CoV-2:**

В первом аспекте настоящее изобретение относится к РНК, подходящей для вакцины против варианта SARS-CoV-2.

Следует отметить, что конкретные признаки и воплощения, описанные в контексте первого аспекта настоящего изобретения, то есть РНК согласно настоящему изобретению, также применимы ко второму аспекту (композиции согласно настоящему изобретению), третьему аспекту (вакцине согласно настоящему изобретению), четвертому аспекту (набору или составному набору согласно настоящему

изобретению), пятому аспекту (комбинации согласно настоящему изобретению) или другим аспектам, включая медицинские применения и способ лечения.

РНК согласно первому аспекту составляет основу для композиции или вакцины на основе РНК. Как правило, вакцины на основе белков или живые аттенуированные вакцины не являются оптимальными для применения в развивающихся странах вследствие высокой стоимости их производства. Кроме того, вакцины на основе белков или живые аттенуированные вакцины требуют длительного времени разработки и не подходят для быстрого реагирования на вспышки пандемии вируса, такие как вспышка SARS-CoV-2 в 2019/2020 гг. Напротив, вакцины на основе РНК согласно настоящему изобретению обеспечивают возможность очень быстрого и экономически эффективного производства. Следовательно, по сравнению с известными вакцинами, вакцину на основе РНК согласно настоящему изобретению можно производить значительно дешевле и быстрее, что является большим преимуществом, в частности, для применения в развивающихся странах. Еще одним преимуществом вакцины на основе РНК может быть ее температурная стабильность по сравнению с вакцинами на основе белков или пептидов.

В особенно предпочтительных воплощениях первый аспект настоящего изобретения относится к РНК, содержащей по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок из шиповидного белка SARS-CoV-2 или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную нетранслируемую область (UTR), и где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из варианта SARS-CoV-2, и, возможно, стабилизирующую мутацию штамма SARS-CoV-2.

Термин «антигенный пептид или белок из шиповидного белка SARS-CoV-2» в настоящем документе означает (i) антиген, который представляет собой шиповидный белок SARS-CoV-2, имеющий аминокислотную последовательность антигенного пептида или белка (или его фрагмента), которая идентична белку варианта SARS-CoV-2 (или его фрагменту), или (ii) антиген, полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, имеющий аминокислотную последовательность антигенного пептида или белка (или его фрагмента), которая не идентична соответствующему белку варианта SARS-CoV-2 (или его фрагменту). Например, соответствующий шиповидный белок SARS-CoV-2 может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену, вставку или



делецию, выбранную из варианта SARS-CoV-2, и/или по меньшей мере одну стабилизирующую конформацию до слияния мутацию.

Термин «иммуногенный фрагмент» или «иммуногенный вариант» в настоящем документе означает любой фрагмент/вариант соответствующего антигена SARS-CoV-2, который способен вызывать иммунный ответ у субъекта. Предпочтительно внутримышечное или внутрикожное введение РНК согласно первому аспекту приводит к экспрессии кодируемого шиповидного белка SARS-CoV-2 у субъекта.

Термин «экспрессия», используемый в настоящем документе, относится к продукции шиповидного белка SARS-CoV-2, где указанный шиповидный белок SARS-CoV-2 обеспечивается кодирующей последовательностью РНК согласно первому аспекту. Например, «экспрессия» РНК относится к продукции белка (например, после введения указанной РНК в клетку или субъекту) посредством трансляции РНК с получением полипептида, например, с получением пептида или белка, который имеет происхождение из коронавируса SARS-CoV-2. Термин «экспрессия» и термин «продукция» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо. При этом, термин «экспрессия» предпочтительно относится к продукции определенного пептида или белка при введении РНК в клетку или организм.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению является подходящей для вакцины против варианта SARS-CoV-2.

Шиповидный белок SARS-CoV-2 представляет собой белок слияния вируса типа I, который существует в виде тримера на поверхности вируса, где каждый мономер состоит из головки (S1) и стебля (S2). Отдельные полипептиды-предшественники S образуют гомотример и подвергаются гликозилированию в аппарате Гольджи, а также процессингу с удалением сигнального пептида и расщеплению клеточной протеазой с образованием отдельных полипептидных цепей S1 и S2, которые остаются ассоциированными в виде протомеров S1/S2 в гомотримере, и таким образом образуют тример гетеродимеров. Домен S1 шиповидного гликопротеина включает рецептор-связывающий домен (RBD), который взаимодействует (наиболее вероятно) с рецепторами ангиотензин-конвертирующего фермента 2 и опосредует слияние вируса с клеткой-хозяином, N-концевой домен, который может устанавливать первоначальный контакт с клетками-мишенями, и 2 субдомена, все из которых подвержены действию нейтрализующих антител. Домен S2 состоит из ядра слияния, представляющего собой пучок из шести спиралей, участвующего в слиянии мембраны с эндосомальной

мембраной хозяина, и также являющегося мишенью для нейтрализации. Субъединица S2 дополнительно включает две последовательности с гептадными повторами (HR1 и HR2) и центральную спираль, типичную для гликопротеинов слияния, трансмембранный домен и домен цитозольного хвоста.

В контексте настоящего изобретения может быть применен и может подходящим образом кодироваться кодирующей последовательностью или РНК согласно первому аспекту любой шиповидный белок, который выбран или получен из варианта SARS-CoV-2 и содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку по сравнению с SEQ ID NO:1. Кроме того, в объем представленного ниже изобретения входит то, что по меньшей мере один антигенный пептид или белок может содержать или состоять из синтетически сконструированного или искусственного шиповидного белка SARS-CoV-2. Термин «синтетически сконструированный» шиповидный белок SARS-CoV-2, или термин «искусственный шиповидный белок SARS-CoV-2», или термин «рекомбинантный» шиповидный белок SARS-CoV-2 относится к белку, который не встречается в природе. Соответственно, «искусственный шиповидный белок SARS-CoV-2» или «синтетически сконструированный шиповидный белок SARS-CoV-2» или обозначенный термином «рекомбинантный» шиповидный белок SARS-CoV-2 могут, например, отличаться по меньшей мере на одну аминокислоту от встречающегося в природе шиповидного белка SARS-CoV-2 (например, содержать одну или более гетерологичных/введенных аминокислот по сравнению с встречающимся в природе шиповидным белком SARS-CoV-2), и/или могут содержать дополнительный гетерологичный пептидный или белковый элемент, и/или могут быть удлиненными или укороченными с N-конца или C-конца.

Далее подробно описаны последовательности предпочтительных антигенных пептидов или белков, обеспечиваемых РНК согласно настоящему изобретению.

Следует отметить, что в случае ссылки на аминокислотные (aa) остатки и их положение в шиповидном белке SARS-CoV-2 (S) любая используемая в настоящем документе нумерация, если не указано иное, относится к положению соответствующего аминокислотного остатка в соответствующем шиповидном белке (S) исходного изолята коронавируса SARS-CoV-2 EPI\_ISL\_402128 в соответствии с SEQ ID NO: 1. В настоящем изобретении соответствующие положения аминокислот в качестве примера

указаны для шиповидного белка (S) исходного изолята коронавируса SARS-CoV-2 EPI\_ISL\_402128 (SEQ ID NO: 1).

Аннотация белка, используемая в настоящем документе, относится к SEQ ID NO: 1 в качестве эталонного белка. Эталонный белок – полноразмерный шиповидный белок (S) исходного коронавируса SARS-CoV-2 – содержит 1273 аминокислотных остатка и включает следующие элементы:

- секреторный сигнальный пептид                    положения аминокислот от aa 1 до aa 15 (см. SEQ ID NO: 28)
- фрагмент шиповидного белка S1:                    положения аминокислот от aa 1 до aa 681 (см. SEQ ID NO: 27)
- S1- N-концевой домен (S1-NTD)                    положения аминокислот от aa 13 до aa 303 (см. SEQ ID NO: 26992)
- рецептор-связывающий домен (RBD):                    положения аминокислот от aa 319 до aa 541 (см. SEQ ID NO: 13243)
- критический домен нейтрализации (CND):                    положения аминокислот от aa 329 до aa 529 (см. SEQ ID NO: 13310)
- фрагмент шиповидного белка S2:                    положения аминокислот от aa 682 до aa 1273 (см. SEQ ID NO: 30)
- трансмембранный домен (TM)                    положения аминокислот от aa 1212 до aa 1273 (см. SEQ ID NO: 49)
- трансмембранный домен (TMflex) положения аминокислот от aa 1148 до aa 1273 (см. SEQ ID NO: 13176)
- Область сайта расщепления фурином (S1/S2)                    положения аминокислот от aa 681 до aa 685 (см. SEQ ID NO: 26994)

Следует отметить, что среди шиповидных белков, полученных из различных изолятов SARS-CoV-2 или вариантов SARS-CoV-2, естественным образом возникают вариации на уровне аминокислот. В контексте настоящего изобретения такие вариации аминокислот могут быть применены к антигенному пептиду или белку, полученному из шиповидного белка, описанному в настоящем документе. Соответственно, вариации или мутации аминокислот выбирают таким образом, чтобы 1) индуцировать иммунный ответ против варианта вируса SARS-CoV-2, от которого имеет происхождение замена/мутация, и/или (2) получить антигенный пептид или белок, который является желательным для индукции иммунного ответа (например, антигенный пептид или

белок, полученный из шиповидного белка и находящийся в предшествующей слиянию форме).

Соответственно, в особенно предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку, выбранную из варианта SARS-CoV-2.

В этом контексте термин «по меньшей мере одна аминокислотная замена, делеция или вставка, выбранная из варианта SARS-CoV-2» в настоящем документе означает по меньшей мере одно положение аминокислоты в шиповидном белке SARS-CoV-2 (или его фрагменте), которое отличает его от исходного шиповидного белка SARS-CoV-2 (соответствующего эталонному штамму, SEQ ID NO: 1).

В предпочтительных воплощениях вариант SARS-CoV-2 выбран или получен из следующих генетических линий SARS-CoV-2: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

В особенно предпочтительных воплощениях вариант SARS-CoV-2 выбран или получен из следующих генетических линий SARS-CoV-2: В.1.351 (Южная Африка), P.1 (Бразилия), В.1.617.1 (Индия), В.1.617.2 (Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5).

Соответственно, каждый шиповидный белок, представленный в настоящем документе и рассматриваемый в качестве подходящего антигена в контексте настоящего изобретения, может иметь одну или более из следующих вариаций или мутаций аминокислот (положения аминокислот в референсной последовательности

SEQ ID NO: 1), указанных в **перечне 1**. Вариации или мутации, представленные ниже, имеют происхождение от новых появляющихся вариантов вируса SARS-CoV-2 и могут быть введены в шиповидный белок, который кодирует РНК согласно настоящему изобретению:

**Перечень 1А: Положения аминокислот для замен, делеций и/или вставок**

H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485; F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505; Q506; Y144; A570; P681; T716; S982; D1118; L18; D80; D215; L242; A243; L244; R246; A701; T20; P26; D138; R190; H655; T1027; S13; W152; L452; R346; P384; G447; G502; T748; A522; V1176; T859; S247; Y248; L249; T250; P251; G252; G75; T76; D950; E154; G769; S254; Q613; F157; R158; Q957; D253; T95; F888; Q677; A67; Q414; N450; V483; G669; T732; Q949; Q1071; E1092; H1101; N1187; W258; T19; V126; H245; S12; A899; G142; E156; K558; G339; P9; C136; Y449; L24; P25; P26; A27; V213; S371; T376; D405; A701; I210; D936; S939; R357; R682; R683; A684; R685; V143; Y144; Y145; N211; L212; R214; E241; G339; S371; S373; S375; N440; G496; Q498; Y505; T547; D614; N679; P681; N764; D796; N856; Q954; N969; L981 или Q52 (относительно последовательности SEQ ID NO: 1).

**Перечень 1В: Аминокислотные замены, делеции или вставки**

H69del; V70del; A222V; Y453F; S477N; I692V; R403K; K417N; N437S; N439K; V445A; V445I; V445F; G446V; G446S; G446A; L455F; F456L; K458N; A475V; G476S; G476A; S477I; S477R; S477G; S477T; T478I; T478K; T478R; T478A; E484Q; E484K; E484A; E484D; G485R; G485S; F486L; N487I; Y489H; F490S; F490L; Q493L; Q493K; S494P; S494L; P499L; T500I; N501Y; N501T; N501S; V503F; V503I; G504D; Y505W; Q506K; Q506H; Y144del; A570D; P681H; T716I; S982A; D1118H; L18F; D80A; D215G; L242del; A243del; L244del; L242del; A243del; L244del; R246I; A701V; T20N; P26S; D138Y; R190S; H655Y; T1027I; S13I; W152C; L452R; R346T; P384L; L452M; F456A; F456K; F456V; E484P; K417T; G447V; L452Q; A475S; F486I; F490Y; Q493R; S494A; P499H; P499S; G502V; T748K; A522S; V1176F; T859N; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; R246del; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; G75V; T76I; G75V; T76I; D950N; P681R; E154K; G769V; S254F; Q613H; F157L; F157del; R158del; Q957R; D253G; T95I; F888L; Q677H; A67V; Q414K; N450K; V483A; G669S; T732A; Q949R; Q1071H; E1092K; H1101Y; N1187D; W258L; V70F; T19R; T19I; Y144T; Y145S; ins145N; R346K; R346S; V126A; H245Y; ins214TDR; S12F;

W152R; A899S; G142D; E156G; K558N; P9L; C136F; Y449H; L24del; P25del; P26del; A27S; V213G; S371F; T376A; D405N; D253N; Y144S; I210T; D936N; S939F; W152L; T20I; R357K; D796H; Y145H; R682del; R683del; A684del; R685del; A701V; V143del, Y144del, Y145del, Y145N; N211del, L212del, L212I, ins214EPE, E241del, G339D, S371L, S373P, S375F, N440K, G496S, Q498R, Y505H; T547K, D614G, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F или Q52R (относительно последовательности SEQ ID NO: 1).

В предпочтительном воплощении предложена РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485, F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505; Q506; Y144; A570; P681; T716; S982; D1118; L18; D80; D215; L242; A243; L244; R246; A701; T20; P26; D138; R190; H655; T1027; S13; W152; L452; R346; P384; G447; G502; T748; A522; V1176; T859; S247; Y248; L249; T250; P251; G252; G75; T76; D950; E154; G769; S254; Q613; F157; R158; Q957; D253; T95; F888; Q677; A67; Q414; N450; V483; G669; T732; Q949; Q1071; E1092; H1101; N1187; W258; T19; V126; H245; S12; A899; G142; E156; K558 и/или Q52, относительно последовательности SEQ ID NO: 1, где РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную нетранслируемую область. В некоторых аспектах РНК не содержит 3' UTR, содержащей последовательность SEQ ID NO: 268. В некоторых аспектах РНК содержит 3' UTR, содержащую последовательность SEQ ID NO: 268.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69del; V70del; A222V; Y453F; S477N; I692V; R403K; K417N; N437S; N439K; V445A; V445I; V445F; G446V; G446S; G446A; L455F; F456L; K458N; A475V; G476S; G476A; S477I; S477R; S477G; S477T; T478I; T478K; T478R; T478A; E484Q; E484K; E484A; E484D; G485R; G485S, F486L; N487I; Y489H; F490S; F490L; Q493L; Q493K; S494P; S494L; P499L; T500I; N501Y; N501T; N501S; V503F; V503I; G504D; Y505W; Q506K; Q506H; Y144del; A570D; P681H; T716I; S982A; D1118H; L18F; D80A; D215G; L242del; A243del; L244del; L242del; A243del; L244del;

R246I; A701V; T20N; P26S; D138Y; R190S; H655Y; T1027I; S13I; W152C; L452R; R346T; P384L; L452M; F456A; F456K; F456V; E484P; K417T; G447V; L452Q; A475S; F486I; F490Y; Q493R; S494A; P499H; P499S; G502V; T748K; A522S; V1176F; T859N; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; R246del; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; G75V; T76I; G75V; T76I; D950N; P681R; E154K; G769V; S254F; Q613H; F157L; F157del; R158del; Q957R; D253G; T95I; F888L; Q677H; A67V; Q414K; N450K; V483A; G669S; T732A; Q949R; Q1071H; E1092K; H1101Y; N1187D; W258L; V70F; T19R; Y144T; Y145S; ins145N; R346K; R346S; V126A; H245Y; ins214TDR; S12F; W152R; A899S; G142D; E156G; K558N и/или Q52R, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях предложена РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485; F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505 и/или Q506, относительно последовательности SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69del; V70del; A222V; Y453F; S477N; I692V; R403K; K417N; N437S; N439K; V445A; V445I; V445F; G446V; G446S; G446A; L455F; F456L; K458N; A475V; G476S; G476A; S477I; S477R; S477G; S477T; T478I; T478K; T478R; T478A; E484Q; E484K; E484A; E484D; G485R; G485S; F486L; N487I; Y489H; F490S; F490L; Q493L; Q493K; S494P; S494L; P499L; T500I; N501Y; N501T; N501S; V503F; V503I; G504D; Y505W; Q506K и/или Q506H, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

В другом воплощении предложена РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485; F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501;

V503; G504; Y505; Q506; Y144; A570; P681; T716; S982; D1118; L18; D80; D215; L242; A243; L244; R246; A701; T20; P26; D138; R190; H655; T1027; S13; W152; L452; R346; P384; G447; G502; T748; A522 или V1176, относительно последовательности SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69del; V70del; A222V; Y453F; S477N; I692V; R403K; K417N; N437S; N439K; V445A; V445I; V445F; G446V; G446S; G446A; L455F; F456L; K458N; A475V; G476S; G476A; S477I; S477R; S477G; S477T; T478I; T478K; T478R; T478A; E484Q; E484K; E484A; E484D; G485R; G485S; F486L; N487I; Y489H; F490S; F490L; Q493L; Q493K; S494P; S494L; P499L; T500I; N501Y; N501T; N501S; V503F; V503I; G504D; Y505W; Q506K; Q506H; Y144del; A570D; P681H; T716I; S982A; D1118H; L18F; D80A; D215G; L242del; A243del; L244del; L242del; A243del; L244del; R246I; A701V; T20N; P26S; D138Y; R190S; H655Y; T1027I; S13I; W152C; L452R; R346T; P384L; L452M; F456A; F456K; F456V; E484P; K417T; G447V; L452Q; A475S; F486I; F490Y; Q493R; S494A; P499H; P499S; G502V; T748K; A522S и/или V1176F, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

В другом предпочтительном воплощении предложена РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем T859; R246; S247; Y248; L249; T250; P251; G252; G75; T76; D950; E154; G769; S254; Q613; F157; Q957; D253; T95; F888; Q677; A67; Q414; N450; V483; G669; T732; Q949; Q1071; E1092; H1101; N1187; F157; R158; W258; T19; H245; S12; A899; G142; E156; K558 и/или Q52, относительно последовательности SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем T859N; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; R246del; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; G75V; T76I; G75V; T76I; D950N; P681R; E154K; G769V; S254F; Q613H; F157L; Q957R; D253G; T95I; F888L; Q677H; A67V; Q414K; N450K; V483A; G669S; T732A; Q949R; Q1071H; E1092K; H1101Y; N1187D; F157del; R158del; W258L; V70F; T19R; Y144T; Y145S; ins145N;



R346K; R346S; V126A; H245Y; ins214TDR; S12F; W152R; A899S; G142D; E156G; K558N и/или Q52R, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

В еще одном воплощении предложена РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем D614; H49; V367; P1263; V483; S939; S943; L5; L8; S940; C1254; Q239; M153; V1040; A845; Y145; A831 и/или M1229, относительно последовательности SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем D614G; H49Y; V367F; P1263L; V483A; S939F; S943P; L5F; L8V; S940F; C1254F; Q239K; M153T; V1040F; A845S; Y145H; A831V и/или M1229I, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

В еще одном воплощении предложена РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену или делецию в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485; F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505; Q506; Y144; A570; P681; T716; S982; D1118; L18; D80; D215; L242; A243; L244; R246; A701; T20; P26; D138; R190; H655; T1027; S13; W152; L452; R346; P384; G447; G502; T748; A522; V1176; T859; S247; Y248; L249; T250; P251; G252; G75; T76; D950; E154; G769; S254; Q613; F157; Q957; D253; T95; F888; Q677; A67; Q414; N450; V483; G669; T732; Q949; Q1071; E1092; H1101; N1187 и/или Q52, относительно последовательности SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену или делецию в положении, соответствующем H69del; V70del; A222V; Y453F; S477N; I692V; R403K; K417N; N437S; N439K; V445A; V445I; V445F; G446V; G446S; G446A; L455F; F456L; K458N; A475V; G476S; G476A; S477I; S477R; S477G; S477T; T478I; T478K; T478R; T478A; E484Q; E484K; E484A; E484D; G485R; G485S; F486L; N487I; Y489H; F490S; F490L; Q493L; Q493K; S494P; S494L; P499L; T500I; N501Y;

N501T; N501S; V503F; V503I; G504D; Y505W; Q506K; Q506H; Y144del; A570D; P681H; T716I; S982A; D1118H; L18F; D80A; D215G; L242del; A243del; L244del; L242del; A243del; L244del; R246I; A701V; T20N; P26S; D138Y; R190S; H655Y; T1027I; S13I; W152C; L452R; R346T; P384L; L452M; F456A; F456K; F456V; E484P; K417T; G447V; L452Q; A475S; F486I; F490Y; Q493R; S494A; P499H; P499S; G502V; T748K; A522S; V1176F; T859N; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; R246del; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; G75V; T76I; G75V; T76I; D950N; P681R; E154K; G769V; S254F; Q613H; F157L; F157del; R158del; Q957R; D253G; T95I; F888L; Q677H; A67V; Q414K; N450K; V483A; G669S; T732A; Q949R; Q1071H; E1092K; H1101Y; N1187D; W258L; V70F; T19R; Y144T; Y145S; R346K; R346S; V126A; H245Y; S12F; W152R; A899S; G142D; E156G; K558N и/или Q52R.

В предпочтительном воплощении предложена РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем T19I; L24del; P25del; P26del; A27S; A67V; H69del; V70del; T95I; G142D; V143del; Y144del; Y145del; N211del; L212I; V213G; ins214EPE; G339D; S371L; S371F; S373P; S375F; T376A; D405N; K417N; N440K; G446S; S477N; T478K; E484A; Q493R; G496S; Q498R; N501Y; Y505H; T547K; D614G; H655Y; N679K; P681H; A701V; N764K; D796Y; N856K; Q954H; N969K; L981F, относительно последовательности SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем T19I; L24del; P25del; P26del; A27S; A67V; H69del; V70del; T95I; G142D; V143del; Y144del; Y145del; N211del; L212I; V213G; ins214EPE; G339D; S371L; S371F; S373P; S375F; T376A; D405N; K417N; N440K; G446S; S477N; T478K; E484A; Q493R; G496S; Q498R; N501Y; Y505H; T547K; D614G; H655Y; N679K; P681H; A701V; N764K; D796Y; N856K; Q954H; N969K; L981F, относительно последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10 и содержит по меньшей мере 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотных замен, делеций или вставок, выбранных из группы, состоящей из T19I; L24del; P25del; P26del; A27S;

A67V; H69del; V70del; T95I; G142D; V143del; Y144del; Y145del; N211del; L212I; V213G; ins214EPE; G339D; S371L; S371F; S373P; S375F; T376A; D405N; K417N; N440K; G446S; S477N; T478K; E484A; Q493R; G496S; Q498R; N501Y; Y505H; T547K; D614G; H655Y; N679K; P681H; A701V; N764K; D796Y; N856K; Q954H; N969K; L981F, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

В еще одном воплощении предложена РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, вставку или делецию, соответствующую A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении, расположенном в домене RBD (положения аминокислот от aa 319 до aa 541; положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1) или домене CND (положения аминокислот от aa 329 до aa 529; положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Без ограничения какой-либо теорией, аминокислотные замены или мутации в домене CND могут помогать новым появляющимся вариантам SARS-CoV-2 избегать обнаружения антителами некоторых типов, индуцированными у субъектов, вакцинированных вакцинами первого поколения (разработанными против исходного штамма SARS-CoV-2), или индуцированными у субъектов после инфекции исходным штаммом SARS-CoV-2.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях первый аспект настоящего изобретения относится к РНК, содержащей по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок из шиповидного белка SARS-CoV-2 или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную нетранслируемую область (UTR), и где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, расположенном в домене RBD (положения аминокислот от aa 319 до aa 541; положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1) или домене CND (положения аминокислот от aa 329 до aa 529; положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

В некоторых предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену, вставку или делецию по меньшей мере в одном из следующих положений: R346; V367, P384; R403; K417; N437; N439; V445; G446; G447; N450; L452; Y453; L455; F456; A475; G476; S477; T478; E484; G485; F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; G502; V503; G504; Y505; Q506; A522 (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

Соответственно, в некоторых предпочтительных воплощениях первый аспект настоящего изобретения относится к РНК, содержащей по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок из шиповидного белка SARS-CoV-2 или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положениях, выбранных из K417; L452; T478; E484; N501 и/или P681 (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1), и где РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную нетранслируемую область (UTR).

Без ограничения какой-либо теорией, аминокислотная замена в положении E484 может помогать вариантам вируса SARS-CoV-2 избегать обнаружения антителами некоторых типов, индуцированными у субъектов, вакцинированных вакцинами первого поколения (разработанными против исходного штамма SARS-CoV-2), или индуцированными у субъектов после инфекции исходным штаммом SARS-CoV-2. Мутация/замена в положении N501 происходит вблизи верхней части шипа коронавируса, где она может изменить форму белка, что может помочь избежать некоторых типов антител к коронавирусу. Такие SARS-CoV-2 в настоящем изобретении называются вариантами SARS-CoV-2 E484 и включают, например, SARS-CoV-2 B.1.351 (Южная Африка), SARS-CoV-2 B.1.617 (Индия), P.1 (Бразилия) или B.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая BA.1\_v1, BA.1\_v0, B.1.1.529, BA.2, BA.1\_v2, BA.1\_v3, BA.1\_v4, BA.1\_v5).

Соответственно, в некоторых воплощениях может являться преимуществом, что РНК согласно настоящему изобретению обеспечивает шиповидный белок SARS-CoV-2, содержащий замену в положении E484, позволяющую индуцировать эффективные иммунные ответы против вариантов вируса SARS-CoV-2 E484.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении E484, где аминокислота E484 заменена на K, P,

Q, A или D (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену E484K, E484P, E484Q, E484A, E484D.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении E484, где аминокислота E484 заменена на K или Q (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену E484K или E484Q. В некоторых предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену E484K.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении N501, где аминокислота N501 заменена на другую аминокислоту (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

Без ограничения какой-либо теорией, аминокислотная замена в положении N501 может помогать вариантам вируса SARS-CoV-2 избегать обнаружения антителами некоторых типов, индуцированными у субъектов, вакцинированных вакцинами первого поколения (разработанными против исходного штамма SARS-CoV-2), или индуцированными у субъектов после инфекции исходным штаммом SARS-CoV-2. Мутация/замена в положении N501 происходит вблизи верхней части шипа коронавируса, где она может изменить форму белка, что может помочь избежать некоторых типов антител к коронавирусу. Такие SARS-CoV-2 в настоящем изобретении называются вариантами SARS-CoV-2 N501 и включают, например, SARS-CoV-2 B.1.351 (Южная Африка), SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Великобритания), P.1 (Бразилия) или B.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая BA.1\_v1, BA.1\_v0, B.1.1.529, BA.2, BA.1\_v2, BA.1\_v3, BA.1\_v4, BA.1\_v5).

Соответственно, может являться преимуществом, что РНК согласно настоящему изобретению обеспечивает шиповидный белок SARS-CoV-2, содержащий замену в положении N501, позволяющую индуцировать эффективные иммунные ответы против вариантов вируса SARS-CoV-2 N501.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении N501, где аминокислота N501 заменена на Y, T, S (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, антигенный

пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену N501Y, N501T, N501S.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении N501, где аминокислота N501 заменена на Y (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену N501Y.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении K417, где аминокислота K417 заменена на другую аминокислоту (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

Без ограничения какой-либо теорией, аминокислотная замена в положении K417 может помогать вариантам вируса SARS-CoV-2 избегать обнаружения антителами некоторых типов, индуцированными у субъектов, вакцинированных вакцинами, разработанными против исходного штамма SARS-CoV-2 с применением SEQ ID NO:1, или индуцированными у субъектов после инфекции исходным штаммом SARS-CoV-2, содержащим SEQ ID NO:1. Мутация/замена в положении K417 происходит вблизи верхней части шипа коронавируса, где она может изменить форму белка, что может помочь избежать некоторых типов антител к коронавирусу. Такие SARS-CoV-2 в настоящем изобретении называются вариантами SARS-CoV-2 K417 и включают, например, SARS-CoV-2 B.1.351 (Южная Африка), SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Великобритания), P.1 (Бразилия), AY.1/AY.2 или B.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая BA.1\_v1, BA.1\_v0, B.1.1.529, BA.2, BA.1\_v2, BA.1\_v3, BA.1\_v4, BA.1\_v5).

Соответственно, может являться преимуществом, что РНК согласно настоящему изобретению обеспечивает шиповидный белок SARS-CoV-2, содержащий замену в положении K417, позволяющую индуцировать эффективные иммунные ответы против вариантов вируса SARS-CoV-2 K417.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении K417, где аминокислота N501 заменена на S, T, Q или N (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену K417S, K417T, K417Q или K417N.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении N501, где аминокислота K417 заменена

на Т или N (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену K417T или K417N. В некоторых предпочтительных воплощениях антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену K417N.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении L452, где аминокислота L452 заменена на другую аминокислоту (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

Без ограничения какой-либо теорией, аминокислотная замена в положении L452 может помочь вариантам вируса SARS-CoV-2 избежать обнаружения антителами некоторых типов, индуцированными у субъектов, вакцинированных вакцинами, разработанными против исходного штамма SARS-CoV-2 на основе SEQ ID NO:1, или индуцированными у субъектов после инфекции исходным штаммом SARS-CoV-2, содержащим SEQ ID NO:1. Мутация/замена в положении L452 происходит вблизи верхней части шипа коронавируса, где она может изменить форму белка, что может помочь избежать некоторых типов антител к коронавирусу. Такие SARS-CoV-2 в настоящем изобретении называются вариантами SARS-CoV-2 L452 и включают, например, SARS-CoV-2 B.1.617.1 (Индия), SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Индия) или SARS-CoV-2 B.1.617.3 (Индия).

Соответственно, может являться преимуществом, что РНК согласно настоящему изобретению обеспечивает шиповидный белок SARS-CoV-2, содержащий замену в положении L452, позволяющую индуцировать эффективные иммунные ответы против вариантов вируса SARS-CoV-2 L452.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении L452, где аминокислота L452 заменена на R или Q (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену L452R или L452Q.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении L452, где аминокислота L452 заменена на R (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно,

антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену L452R.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении, расположенном в сайте расщепления фурином (положения аминокислот от aa 681 до 685; положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Считается, что этот участок последовательности (PRRAR в SEQ ID NO: 1) выполняет функцию сайта распознавания для расщепления фурином. Без ограничения какой-либо теорией, аминокислотные замены или мутации в сайте расщепления фурином могут способствовать повышенной способности к слиянию с мембраной у новых появляющихся вариантов SARS-CoV-2 и, таким образом, вызывать повышенную трансмиссивность.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении P681 в сайте расщепления фурином. Соответственно, аминокислота P681 заменена на другую аминокислоту (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1), предпочтительно на аминокислоту, которая повышает расщепление фурином. Такие SARS-CoV-2 в настоящем изобретении называются вариантами SARS-CoV-2 P681 и включают, например, SARS-CoV-2 B.1.617.1 (Индия), SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Индия) или SARS-CoV-2 B.1.617.3 (Индия), SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Великобритания), SARS-CoV-2 A.23.1 (Уганда) или B.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая BA.1\_v1, BA.1\_v0, B.1.1.529, BA.2, BA.1\_v2, BA.1\_v3, BA.1\_v4, BA.1\_v5).

Соответственно, может являться преимуществом, что РНК согласно настоящему изобретению обеспечивает шиповидный белок SARS-CoV-2, содержащий замену в положении P681, позволяющую индуцировать эффективные иммунные ответы против вариантов вируса SARS-CoV-2 P681.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении P681, где аминокислота P681 заменена на R или H (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену P681R или P681H.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотную замену в положении P681, где аминокислота P681 заменена на R (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно,



антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, содержит аминокислотную замену P681R.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит аминокислотную замену в положении L452, определенную в настоящем документе, предпочтительно L452R, и аминокислотную замену в положении P681, определенную в настоящем документе, предпочтительно P681R (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

В другом особенно предпочтительном воплощении шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит аминокислотную замену в положении L452, определенную в настоящем документе, предпочтительно L452R, и аминокислотную замену в положении P681, определенную в настоящем документе, предпочтительно P681R (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). В другом предпочтительном воплощении шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит аминокислотную замену в положении L452, определенную в настоящем документе, предпочтительно L452R, аминокислотную замену в положении P681, определенную в настоящем документе, предпочтительно P681R, и аминокислотную замену в положении D614, определенную в настоящем документе, предпочтительно D614G (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит аминокислотную замену в положении N501, определенную в настоящем документе, предпочтительно N501Y, и аминокислотную замену в положении E484, определенную в настоящем документе, предпочтительно E484K (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит аминокислотную замену в положении L452, определенную в настоящем документе, предпочтительно L452R, и аминокислотную замену в положении E484, определенную в настоящем документе, предпочтительно E484Q (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит, наряду с заменами, определенными выше (в положениях E484, N501, L452 и, возможно, P681), по меньшей мере одну, в частности, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дополнительных аминокислотных замен, вставок или делеций, выбранных из перечня 1А или перечня 1В.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит аминокислотную замену или делецию в положении Н69, определенную в настоящем документе, предпочтительно Н69del, и аминокислотную замену или делецию в положении V70, определенную в настоящем документе, предпочтительно V70del (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). В другом предпочтительном воплощении шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит делецию в обоих положениях Н69 и V70.

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере одну дополнительную аминокислотную замену или делецию, выбранную из следующих изолятов SARS-CoV-2: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

В предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит аминокислотные замены или делеции, выбранные из (относительно SEQ ID NO: 1):

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F (Ю.А. (Южная Африка), ВА.1\_v1);

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F (Ю.А., BA.1\_v0);

- K986P, V987P, A67V, T95I, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F (Ю.А., B.1.1.529);

- K986P, V987P, T19I, L24del, P25del, P26del, A27S, G142D, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, D405N, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, D796Y, Q954H, N969K (Ю.А., BA.2);

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F (Ю.А., BA.1\_v2);

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F (Ю.А., BA.1\_v3);

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, A701V, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F (Ю.А., BA.1\_v4);

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F (Ю.А., BA.1\_v5);

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V; (Ю.А.; B.1.351)

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V; (Ю.А.; B.1.351)

- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y и T1027I; (Бразилия; P1)

- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y, T1027I и V1176F; (Бразилия; P1)
- L452R, P681R и D614G; (B.1.617.1; Индия)
- L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H; (B.1.617.2; Индия)
- L452R, P681R, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N; (B.1.617.2; Индия)
- T19R, L452R, E484Q, D614G, P681R и D950N; (B.1.617.3; Индия)
- G75V, T76I, S247del, Y248del, L249del, T250del, P251del, G252del, D253del, L452Q, F490S, D614G и T859N; (C.37.1; Перу)
- T95I, Y145N, R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H и D950N; (B.1.1.621)
- T95I, Y144T, Y145S, ins145N, R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H и D950N; (B.1.1.621)
- H69del, V70del, Y144del, E484K, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A и D1118H; (B.1.1.7 – E484K)
- S13I, W152C, L452R и D614G; (B.1.429)
- L452R и D614G; (B.1.429)
- H69del; V70del; N439K; D614G; (B.1.258)
- T95I; E484K; D614G и A701V; (B.1.526)
- L5F, T95I, D253G, E484K, D614G и A701V; (B.1.526)
- L5F, T95I, D253G, S477N, D614G и Q957R; (B.1.526)
- F157L; V367F; Q613H и P681R (A.23.1)
- S254F; D614G; P681R и G769V (A.23.1)
- T478K; D614G; P681H и T732A (B.1.1.519; Мексика)
- P26S, H69del, V70del, V126A, Y144del, L242del, A243del, L244del, H245Y, S477N, E484K, D614G, P681H, T1027I и D1118H; (B.1.620; Африка)
- ins214TDR, Q414K, N450K, D614G и T716I; (B.1.214.2)
- S12F, H69del, V70del, W152R, R346S, L452R, D614G, Q677H и A899S; (C.36.3; Таиланд)
- E484K, D614G и V1176F; (P2)
- Q52R; A67V; H69del; V70del; F157del; R158del; E484K; D614G; Q677H и F888L; (B.1.525)
- Q52R; A67V; H69del; V70del; Y144del; E484K; D614G; Q677H и F888L; (B.1.525)

- A67V; H69del; V70del; Y144del; E484K; D614G; Q677H и F888L; (B.1.525)
- T19R; T95I; G142D, E156G, F157del; R158del; W258L; K417N; L452R; T478K; K558N, D614G; P681R и D950N; (AY.1)
- T19R; V70F; G142D, E156G, F157del; R158del; A222V, K417N; L452R; T478K; D614G; P681R и D950N; (AY.2)
- T19R; T95I; F157del; R158del; W258L; K417N; L452R; T478K; D614G; P681R и D950N или (AY.1)
- T19R; V70F; F157del; R158del; A222V; K417N; L452R; T478K; D614G; P681R и D950N; (AY.2)
- H69del, V70del и D614G;
- D614G и M1229I;
- A222V и D614G;
- S477N и D614G;
- N439K и D614G;
- H69del, V70del, Y453F, D614G и I692I;
- Y453F и D614G;
- D614G и I692V;
- H69del, V70del, A222V, Y453F, D614G и I692I;
- N501Y и D614G;
- K417N; E484K; N501Y и D614G; или
- E484K и D614G.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит следующие аминокислотные замены или делеции (относительно SEQ ID NO: 1):

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V;
- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V;
- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y и T1027I;
- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y, T1027I и V1176F;
- L452R, P681R и D614G;

- L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H; или
- L452R, P681R, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N.

В еще более предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит следующие аминокислотные замены или делеции (относительно SEQ ID NO: 1):

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V; или
- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V.

В других особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит следующие аминокислотные замены или делеции (относительно SEQ ID NO: 1):

- L452R, P681R и D614G;
- L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H;
- L452R, P681R, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N; или
- T19R, L452R, E484Q, D614G, P681R и D950N.

В еще более предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 1, 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588, 28917-28920, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 1, 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588 или 28917-28920. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588 или 28917-28920. Дополнительная информация относительно указанных аминокислотных последовательностей также представлена в таблице 1 и под идентификатором <223> в перечне последовательностей согласно ST25 для соответствующих SEQ ID NO последовательностей.

В некоторых воплощениях фрагмент шиповидного белка (S), определенный в настоящем документе, может кодироваться РНК согласно настоящему изобретению, где указанный фрагмент может быть укорочен с N-конца и не иметь N-концевых аминокислот в положениях от 1 до 100 полноразмерного белка варианта SARS-CoV-2 и/или указанный фрагмент может быть укорочен с C-конца и не иметь C-концевых аминокислот (aa) в положениях от 531 до aa 1273 полноразмерного белка варианта SARS-CoV-2. Такой «фрагмент шиповидного белка (S)» может дополнительно содержать аминокислотные замены (описанные в настоящем документе) и может дополнительно содержать по меньшей мере один гетерологичный пептидный или белковый элемент (описанный в настоящем документе). В предпочтительных воплощениях фрагмент шиповидного белка (S) может быть укорочен с C-конца, в результате чего он не содержит C-концевого трансмембранного домена (то есть не содержит aa 1212 - aa 1273 или не содержит aa 1148 - 1273 aa) (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

В других воплощениях кодируемый шиповидный белок (S), полученный из SARS-CoV-2, не содержит трансмембранного домена (TM) (положения аминокислот от aa 1212 до aa 1273 в референсной SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях кодируемый шиповидный белок (S), полученный из SARS-CoV-2, не содержит более длинной части трансмембранного домена (TMflex) (положения аминокислот от aa 1148 до aa 1273 в референсной SEQ ID NO: 1). Без ограничения какой-либо теорией, шиповидный белок (S), не содержащий трансмембранного домена (TM или TMflex), определенный в настоящем документе, может быть подходящим для вакцины, поскольку такой белок будет являться растворимым и не заякоренным в клеточной мембране. Следовательно, растворимый белок может продуцироваться (то есть транслироваться) в более высоких концентрациях при введении субъекту, что приводит к улучшенным иммунным ответам.

Без ограничения какой-либо теорией, домены RBD (от aa 319 до aa 541) и CND (от aa 329 до aa 529), указанные для положений аминокислот в SEQ ID NO:1, могут иметь решающее значение для иммуногенности. Обе области расположены во фрагменте S1 шиповидного белка. Соответственно, в контексте настоящего изобретения может быть подходящим, чтобы антигенный пептид или белок содержал или состоял из фрагмента S1 шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта. Соответственно, такой фрагмент S1 может содержать по

меньшей мере домен RBD и/или CND, как определено выше. В некоторых воплощениях домен CND шиповидного белка SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 27051-27086, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях домен CND шиповидного белка SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 27051-27086. В некоторых воплощениях домен CND шиповидного белка SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 27051-27086. Дополнительная информация относительно указанных аминокислотных последовательностей также представлена в таблице 1 и под идентификатором <223> в перечне последовательностей согласно ST25 для соответствующих SEQ ID NO последовательностей.

В предпочтительных воплощениях кодируемый по меньшей мере один антигенный пептид или белок содержит или состоит из рецептор-связывающего домена (RBD; от aa 319 до aa 541), где указанный RBD содержит или состоит из фрагмента шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта. В некоторых воплощениях домен RBD шиповидного белка SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 27007-27046, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях домен RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 27007-27046. В некоторых воплощениях домен RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 27007-27046. Дополнительная информация относительно указанных аминокислотных последовательностей также представлена в таблице 1 и под идентификатором <223> в перечне последовательностей согласно ST25 для соответствующих SEQ ID NO последовательностей.

В предпочтительных воплощениях кодируемый по меньшей мере один антигенный пептид или белок содержит или состоит из укороченного рецептор-



связывающего домена (truncRBD; от aa 334 до aa 528), где указанный RBD содержит или состоит из фрагмента шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта.

Такой «фрагмент шиповидного белка (S)» (RBD; от aa 319 до aa 541, или truncRBD, от aa 334 до aa 528) может дополнительно содержать аминокислотные замены (описанные в настоящем документе) и может дополнительно содержать по меньшей мере один гетерологичный пептидный или белковый элемент (описанный в настоящем документе).

В особенно предпочтительных воплощениях кодируемый по меньшей мере один антигенный пептид или белок содержит или состоит из шиповидного белка (S), где указанный шиповидный белок (S) содержит или состоит из фрагмента S1 шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта.

В предпочтительных воплощениях кодируемый по меньшей мере один антигенный пептид или белок содержит фрагмент S1 шиповидного белка и не содержит по меньшей мере 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% фрагмента S2 шиповидного белка (от aa 682 до aa 1273). Такие воплощения могут быть полезными, поскольку фрагмент S1 содержит подлежащие нейтрализации эпитопы.

Без ограничения какой-либо теорией, может являться подходящим, чтобы антигенный пептид или белок содержал или состоял из фрагмента S1 шиповидного белка и (по меньшей мере фрагмента) фрагмента S2 шиповидного белка, поскольку это может стимулировать образование иммуногенного шиповидного белка.

Соответственно, в особенно предпочтительных воплощениях кодируемый по меньшей мере один антигенный пептид или белок содержит или состоит из шиповидного белка (S), где указанный шиповидный белок (S) содержит или состоит из фрагмента S1 шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта и фрагмента S2 шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта.

В альтернативных предпочтительных воплощениях кодируемый по меньшей мере один антигенный пептид или белок содержит или состоит из полноразмерного шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта.

Термин «полноразмерный шиповидный белок» следует понимать как шиповидный белок, полученный из SARS-CoV-2, имеющий аминокислотную

последовательность, соответствующую по существу целому шиповидному белку. Соответственно, «полноразмерный шиповидный белок» может содержать аминокислоты от aa 1 до aa 1273 (эталонный белок: SEQ ID NO: 1). Соответственно, полноразмерный шиповидный белок, как правило, может содержать секреторный сигнальный пептид, фрагмент S1 шиповидного белка, фрагмент S2 шиповидного белка, рецептор-связывающий домен (RBD) и критический домен нейтрализации CND, а также трансмембранный домен. Следует отметить, что варианты, которые содержат определенные аминокислотные замены (например, для обеспечения стабилизации S-белка до слияния) или встречающиеся в природе аминокислотные делеции, также охватываются термином «полноразмерный шиповидный белок».

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок (S), который кодируется РНК согласно первому аспекту, выполнен с возможностью или адаптирован для стабилизации антигена в конформации до слияния. Конформация до слияния особенно полезна в контексте эффективной вакцины против коронавируса, поскольку несколько потенциальных эпитопов для нейтрализующих антител могут быть доступны только в указанной конформации белка до слияния. Кроме того, сохранение белка в конформации до слияния направлено на предотвращение иммунопатологических эффектов, таких как, например, усиление заболевания и/или антителозависимое усиление (ADE).

В предпочтительных воплощениях введение субъекту РНК (или композиции, или вакцины), кодирующей стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок, вызывает образование антител, нейтрализующих шиповидный белок, и не вызывает образования антител, усиливающих заболевание. В частности, введение субъекту нуклеиновой кислоты (или композиции, или вакцины), кодирующей стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок, не вызывает иммунопатологических эффектов, таких как, например, усиление заболевания и/или антителозависимое усиление (ADE).

Соответственно, в предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, который выбран или получен из шиповидного белка (S) SARS-CoV-2, где шиповидный белок (S) SARS-CoV-2 представляет собой стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (S\_stab). Соответственно, указанный стабилизированный в

конформации до слияния шиповидный белок содержит по меньшей мере одну мутацию, стабилизирующую конформацию до слияния.

Термин «конформация до слияния», используемый в настоящем документе, относится к структурной конформации, принимаемой эктодоменом S-белка SARS-CoV-2 после процессинга с образованием зрелого S-белка SARS-CoV-2 в секреторной системе и до инициации фузогенного события, которое приводит к переходу S SARS-CoV-2 в конформацию после слияния.

«Стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (S\_stab)», описанный в настоящем документе, содержит одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с нативной последовательностью S SARS-CoV-2, которые обеспечивают повышенное сохранение конформации до слияния по сравнению с тримерами эктодоменов S SARS-CoV-2, образующимися из соответствующей нативной последовательности S SARS-CoV-2. «Стабилизация» конформации до слияния посредством одной или более аминокислотных замен, делеций или вставок может представлять собой, например, энергетическую стабилизацию (например, снижение энергии конформации до слияния по сравнению с открытой конформацией после слияния) и/или кинетическую стабилизацию (например, снижение скорости перехода от конформации до слияния к конформации после слияния). Кроме того, стабилизация тримера эктодомена S SARS-CoV-2 в конформации до слияния может включать повышение устойчивости к денатурации по сравнению с соответствующей нативной последовательностью S SARS-CoV-2.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит одну или более аминокислотных замен, которые стабилизируют белок S в конформации до слияния, например, замены, которые стабилизируют мембранную дистальную часть белка S (включая N-концевую область) в конформации до слияния.

Стабилизация шиповидного белка коронавируса SARS-CoV-2 может быть достигнута путем замены по меньшей мере одной аминокислоты в положении K986 и/или V987 на аминокислоты, которые стабилизируют шиповидный белок в конформации до слияния (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

В предпочтительных воплощениях стабилизирующая конформацию до слияния мутация включает аминокислотную замену в положениях K986 и V987, где аминокислоты K986 и/или V987 заменены на аминокислоту, выбранную из A, I, L, M, F, V, G или P (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

Предпочтительно стабилизация конформации до слияния достигается введением двух последовательных замен на пролин в остатках K986 и V987 в шиповидном белке (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

Соответственно, в предпочтительных воплощениях стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (S\_stab) содержит по меньшей мере одну мутацию, стабилизирующую конформацию до слияния, где указанная по меньшей мере одна стабилизирующая конформацию до слияния мутация включает аминокислотные замены: K986P и V987P (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, представляет собой стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (S\_stab), содержащий по меньшей мере одну стабилизирующую конформацию до слияния мутацию K986P и V987P и дополнительно содержащий следующие аминокислотные замены или делеции (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1):

- E484K, N501Y *и, возможно*, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G, A701V;

- E484K, N501Y *и, возможно*, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G, A701V;

- N501Y, P681H *и, возможно*, H69del, V70del, Y144del, A570D, D614G, T716I, S982A, D1118H;

- N501Y, P681H, E484K *и, возможно*, H69del, V70del, Y144del, A570D, D614G, T716I, S982A, D1118H;

- E484K, N501Y *и, возможно*, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y, T1027I;

- E484K, N501Y *и, возможно*, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y, T1027I, V1176F;

- N501Y, P681H, E484K *и, возможно*, H69del, V70del, Y144del, A570D, D614G, T716I, S982A, D1118H;

- L452R *и, возможно*, S13I, W152C, D614G;

- L452R, D614D *и, возможно*, P681R;

- L452R, D614D, P681R *и, возможно*, E484Q, E154K, Q1071H;

- L452R, D614D, P681R *и, возможно*, T19R, L452R, D950N;

- L452R, D614D, P681R *и, возможно*, T19R, F157del, T478K, D950N;

- E484K *и, возможно*, Q52R, A67V, H69del, V70del, delY144, D614G, Q677H, F888L;
- E484K *и, возможно*, A67V, H69del, V70del, Y144del, D614G, Q677H, F888L;
- E484K *и, возможно*, L5F, T95I, D253G, D614G, A701V;
- P681R *и, возможно*, F157L, V367F, Q613H;
- P681R *и, возможно*, S254F, D614G, G769V;
- L452R P681R, *и, возможно*, D614G;
- L452R, E484Q, P681R *и, возможно*, E154K, D614G, Q1071H;
- L452R, P681R *и, возможно*, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G, D950N;
- E484K *и, возможно*, D614G, V1176F;
- L452Q *и, возможно*, G75V, T76I, R246del, S247del, Y248del, L249del, T250del, P251del, G252del, F490S, D614G, T859N;
- K417N *и, возможно*, P681R;
- K417N, P681R *и, возможно*, D614G;
- K417N, L452R, P681R *и, возможно*, D614G;
- K417N, T478K, P681R *и, возможно*, D614G;
- K417N, D950N, P681R *и, возможно*, D614G.
- K417N, D614G, P681R *и, возможно*, T478K;
- K417N, D614G, P681R *и, возможно*, L452R;
- K417N, D614G, P681R, L452R *и, возможно*, T478K;
- S247del, Y248del, L249del, T250del, P251del, G252del, D253del *и, возможно*, D614G;
- S247del, Y248del, L249del, T250del, P251del, G252del, D253del *и, возможно*, L452Q, D614G;
- H69del, V70del *и, возможно*, D614G;
- H69del, V70del, E484K *и, возможно*, D614G;
- H69del, V70del, N501Y *и, возможно*, D614G; или
- H69del, V70del, N501Y, E484K *и, возможно*, P681H.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, представляет собой стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (S\_stab) (или его фрагмент или вариант), содержащий по меньшей мере одну мутацию K986P и V987P, стабилизирующую конформацию до слияния, и дополнительно содержит следующие

аминокислотные замены или делеции (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1):

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V;
- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V;
- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y и T1027I;
- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y, T1027I, V1176F;
- L452R, P681R и D614G;
- L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H; или
- L452R, P681R, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N.

В особенно предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, представляет собой стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (S<sub>stab</sub>) (или его фрагмент или вариант), содержащий аминокислотные замены или делеции, выбранные из (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1):

- K986P, V987P, E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V; или
- K986P, V987P, E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V.

Следует подчеркнуть, что в контексте воплощений настоящего изобретения любой шиповидный белок коронавируса SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, может быть подвергнут мутации, как описано выше (на примере эталонного белка SEQ ID NO: 1), чтобы стабилизировать шиповидный белок в конформации до слияния.

В соответствии с различными воплощениями РНК согласно настоящему изобретению кодирует по меньшей мере один антигенный шиповидный белок SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, и дополнительно по меньшей мере один гетерологичный пептидный или белковый элемент.

Соответственно, указанный по меньшей мере один гетерологичный пептидный или белковый элемент может стимулировать или улучшать секрецию кодируемого

антигенного шиповидного белка SARS-CoV-2 (например, посредством секреторных сигнальных последовательностей), стимулировать или улучшать заякоривание кодируемого антигенного шиповидного белка SARS-CoV-2 в плазматической мембране (например, посредством трансмембранных элементов), стимулировать или улучшать образование антигенных комплексов (например, посредством доменов мультимеризации или элементов кластеризации антигена) или стимулировать или улучшать образование вирусоподобных частиц (образующая VLP последовательность). Кроме того, РНК согласно первому аспекту может дополнительно кодировать пептидные линкерные элементы, саморасщепляющиеся пептиды, последовательности иммунологических адъювантов или нацеленные на дендритные клетки последовательности.

Подходящие домены мультимеризации могут быть выбраны из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1116-1167 в источнике WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей. Подходящие трансмембранные элементы могут быть выбраны из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1228-1343 в источнике WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей. Подходящие образующие VLP последовательности могут быть выбраны из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1168-1227 патентной заявки WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей. Подходящие пептидные линкеры могут быть выбраны из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1509-1565 патентной заявки WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей. Подходящие саморасщепляющиеся пептиды могут быть выбраны из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1434-1508 патентной заявки WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей. Подходящие последовательности иммунологических адъювантов могут быть выбраны из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1360-1421 патентной заявки WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей. Подходящие нацеленные на дендритные клетки (DC) последовательности могут быть выбраны из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1344-1359 патентной заявки WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей.

Подходящие секреторные сигнальные пептиды могут быть выбраны из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1-1115 и SEQ ID NO: 1728 опубликованной патентной заявки PCT WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК, кодирующая по меньшей мере один антигенный шиповидный белок SARS-CoV-2, дополнительно кодирует по меньшей мере одну гетерологичную секреторную сигнальную последовательность, и/или элемент тримеризации, и/или элемент кластеризации антигена, и/или образующую VLP последовательность.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588, 28917-28920, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588 или 28917-28920. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588 или 28917-28920. Дополнительная информация относительно указанных аминокислотных последовательностей также представлена в таблице 1 и под идентификатором <223> в перечне последовательностей согласно ST25 для соответствующих SEQ ID NO последовательностей.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 27093-27095, 28552-28558, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок



SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 27093-27095, 28552-28558. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 27093-27095, 28552-28558.

В других предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 27095, 28552-28557, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 27095, 28552-28557. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 27095, 28552-28557.

В других предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 27095, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 27095. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 27095.

В других предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей или кодирующих аминокислоты последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 23090, 23091, 22960, 22961, 28540, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 23090, 23091, 22960, 22961, 28540. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 23090, 23091, 22960, 22961, 28540.

В других предпочтительных воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 27096, 28545, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 27096, 28545. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 27096, 28545.

В другом предпочтительном воплощении шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 22959, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 22959. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 22959.

В другом предпочтительном воплощении шиповидный белок SARS-CoV-2, кодируемый РНК согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей. Таким образом, в некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 по меньшей мере на 95% идентичен любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920. В некоторых воплощениях шиповидный белок SARS-CoV-2 идентичен любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920.

Предпочтительные антигенные пептиды или белки, полученные из SARS-CoV-2, определенные в настоящем документе, представлены в **Таблице 1**. Каждая строка в ней соответствует подходящей конструкции шиповидного белка SARS-CoV-2. В столбце **А Таблицы 1** приведено краткое описание подходящих конструкций антигена. В столбце

В **Таблицы 1** приведены SEQ ID NO белков (аминокислотных последовательностей) соответствующих антигенных конструкций. В столбце **С Таблицы 1** приведены SEQ ID NO соответствующих кодирующих последовательностей нуклеиновых кислот с оптимизированным содержанием G/C (opt1, gc). В столбце **D Таблицы 1** приведены SEQ ID NO соответствующих кодирующих последовательностей нуклеиновых кислот с модифицированным содержанием G/C (opt10, gc mod) (подробное описание «кодирующих последовательностей» см. в разделе «подходящие кодирующие последовательности»).

Следует отметить, что описание настоящего изобретения явным образом включает информацию, представленную под идентификатором <223> перечня последовательностей согласно ST25 в настоящей заявке. Предпочтительные конструкции РНК, содержащие кодирующие последовательности из **Таблицы 1**, например, последовательности мРНК, содержащие кодирующие последовательности из **Таблицы 1**, представлены в **Таблице 2**.

*Таблица 1: Предпочтительные конструкции SARS-CoV-2 (аминокислотные последовательности и кодирующие последовательности нуклеиновых кислот):*

Ст ро ка	A	B	C	D
1	Полноразмерный шиповидный белок; S - WT	1	136	
2	Стабилизированные шиповидные белки; S_stab_PP; последовательность РНК, кодирующая S-stab_PP, но с использованием кодонов дикого типа, представлена SEQ ID NO: 28916	10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959- 22964, 27087- 27109, 28540-	137, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089- 23148, 27110- 27201, 28589-	146, 23150- 23184, 27202- 27247

		28588	28637	
3	Рецептор-связывающий домен шиповидного белка; RBD	13243, 22917, 22923, 27007- 27046		
4	Критический домен нейтрализации шиповидного белка; CND	13310, 27047- 27086		
5	A222V_D614G S_stab_PP(K986P_V987P_A222V_D614G)	22740	22767	23151
6	N439K_D614G S_stab_PP(K986P_V987P_N439K_D614G)	22742	22769	23152
7	S477N_D614G S_stab_PP(K986P_V987P_S477N_D614G)	22744	22771	23153
8	N501Y_D614G S_stab_PP(K986P_V987P_N501Y_D614G)	22746	22773	23154
9	H69del_V70del_D614G S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_D614G)	22748	22775	23155
10	Y453F_D614G S_stab_PP(K986P_V987P_Y453F_D614G)	22750	22777	23156
11	I692V_D614G S_stab_PP(K986P_V987P_D614G_I692V)	22752	22779	23157
12	M1229I_D614G S_stab_PP(K986P_V987P_D614G_M1229I)	22754	22781	23158
13	MINK1 (w/oM1229I) S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_A222V_Y453 F_S477N_D614G_I692V)	22756	22783	23159
14	MINK2 S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y453F_D614 G_I692V_M1229I)	22758	22785	23160
15	B.1.1.7 (Великобритания) S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_N50 1Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	22959	23089	23161
16	minSA (B.1.351) S_stab_PP(K986P_V987P_K417N_E484K_N501Y_D614 G)	22960	23090	23162
17	fullSA (B.1.351) S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del _A243del_L244del_R246I_K417N_E484K_N501Y_D614 G_A701V)	22961	23091	23163

18	E484K S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_D614G)	22962	23092	23164
19	P.1 (Бразилия) S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_T20N_P26S_D138Y_R190S_K417T_E484K_N501Y_D614G_H655Y_T1027I)	22963	23093	23165
20	B.1.429 (Калифорния) S_stab_PP(K986P_V987P_S13I_W152C_L452R_D614G)	22964	23094	23166
21	B.1.1.7+E484K S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_E484K_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	27087	27110	27202
22	fullSAminusI246R S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	27088	27111	27203
23	B.1.525 (Нигерия) S_stab_PP(K986P_V987P_Q52R_A67V_H69del_V70del_Y144del_E484K_D614G_Q677H_F888L)	27089	27112	27204
24	B.1.525_v2 (Нигерия) S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_Y144del_E484K_D614G_Q677H_F888L)	27090	27113	27205
25	P.1+V1176F (Бразилия) S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_T20N_P26S_D138Y_R190S_K417T_E484K_N501Y_D614G_H655Y_T1027I_V1176F)	27091	27114	27206
26	P.2 (Бразилия) S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_D614G_V1176F)	27092	27115	27207
27	B.1.617 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_D614G_P681R)	27093	27116	27208
28	B.1.617.1 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484Q_D614G_P681R_Q1071H)	27094	27117	27209
29	B.1.617.2 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	27095	27118	27210
30	C.37.1 (Перу) S_stab_PP(K986P_V987P_G75V_T76I_R246del_S247del_Y248del_L249del_T250del_P251del_G252del_L452Q_F490S_D614G_T859N)	27096	27119	27211
31	B.1.258 (Чешская Республика) S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_N439K_D614G)	27097	27120	27212

32	B.1.526 (Нью-Йорк) S_stab_PP(K986P_V987P_L5F_T95I_D253G_E484K_D614G_A701V)	27098	27121	27213
33	B.1.526.2 (Нью-Йорк) S_stab_PP(K986P_V987P_L5F_T95I_D253G_S477N_D614G_Q957R)	27099	27122	27214
34	A.23.1_v1 (Руанда/Уганда) S_stab_PP(K986P_V987P_F157L_V367F_Q613H_P681R)	27100	27123	27215
35	A.23.1_v2 (Руанда/Уганда) S_stab_PP(K986P_V987P_S254F_D614G_P681R_G769V)	27101	27124	27216
36	B.1.620 (не установлено/Африка) S_stab_PP(K986P_V987P_P26S_H69del_V70del_V126A_Y144del_L242del_A243del_L244del_H245Y_S477N_E484K_D614G_P681H_T1027I_D1118H)	27102	27125	27217
37	B.1.621 (Колумбия) S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144T_Y145S_ins145N_R346K_E484K_N501Y_D614G_P681H_D950N)	27103	27126	27218
38	B.1.214.2 (не установлено) S_stab_PP(K986P_V987P_ins214TDR_Q414K_N450K_D614G_T716I)	27104	27127	27219
39	B.1.1.519 (Мексика) S_stab_PP(K986P_V987P_T478K_D614G_P681H_T732A)	27105	27128	27220
40	P.3 (Филиппины) S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_N501Y_D614G_P681H_E1092K_H1101Y_V1176F)	27106	27129	27221
41	B.1.616 (Франция) S_stab_PP(K986P_V987P_H66D_G142V_Y144del_Y145del_D215G_V483A_D614G_H655Y_G669S_Q949R_N1187D)	27107	27130	27222
42	v1 (Вьетнам) S_stab_PP(K986P_V987P_Y144del_L452R_T478K_P681R)	27108	27131	27223
43	v2 (Вьетнам) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_Y144del_Y145del_L452R_T478K_D614G_P681R)	27109	27132	27224
44	C.1.2 (Южная Африка 2) S_stab_PP(K986P_V987P_P9L_C136F_Y144del_R190S_D215G_L242del_A243del_Y449H_E484K_N501Y_D614G_H655Y_N679K_T716I_T859N)	28540	28589	

45	BA.1_v1 (Южная Африка 3) S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins2_14EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v1)	28541	28590	
46	S_stab_PP(K986P_BA.1_v0 (Южная Африка 3) S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins2_14EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_K417N_N440K_G446S_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v0)	28542	28591	
47	B.1.1.529 (Южная Африка 3) S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_T95I_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_B.1.1.529)	28543	28592	
48	BA.2 (Южная Африка 3) S_stab_PP(K986P_V987P_T19I_L24del_P25del_P26del_A27S_G142D_V213G_G339D_S371F_S373P_S375F_T376A_D405N_S477N_T478K_E484A_Q493R_Q498R_N501Y_Y505H_D614G_H655Y_N679K_P681H_D796Y_Q954H_N969K); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.2)	28544	28593	
49	C.37_v2 (Перу/Лима) S_stab_PP(K986P_V987P_G75V_T76I_R246del_S247del_Y248del_L249del_T250del_P251del_G252del_D253N_L452Q_F490S_D614G_T859N)	28545	28594	
50	B.1.621_v2 (Колумбия) S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144S_Y145N_R346K_E484K_N501Y_D614G_P681H_D950N)	28546	28595	
51	C.36.3 (Таиланд) S_stab_PP(K986P_V987P_S12F_H69del_V70del_W152R_R346S_L452R_D614G_Q677H_A899S)	28547	28596	
52	B.1.619 (Камерун) S_stab_PP(K986P_V987P_I210T_N440K_E484K_D614G_D936N_S939F_T1027I)	28548	28597	

53	R.1 (Кентукки) S_stab_PP(K986P_V987P_W152L_E484K_D614G_G769V)	28549	28598	
54	B.1.1.176 (Канада) S_stab_PP(K986P_V987P_T20I_R357K_D614G)	28550	28599	
55	AZ.3 S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144del_E484K_D614G_P681H_D796H)	28551	28600	
56	B.1.617.2_v2 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28552	28601	
57	AY.1 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28553	28602	
58	AY.2 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28554	28603	
59	AY.4_v1 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28555	28604	
60	AY.4_v2 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28556	28605	
61	AY.4.2 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28557	28606	
62	B.1.617.3 (Индия) S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484Q_D614G_P681R_D950N)	28558	28607	
63	B.1.617 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del)	28559	28608	
64	B.1.617.1 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484Q_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_Q1071H)	28560	28609	
65	B.1.617.2 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28561	28610	



66	B.1.617.2_v2 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_1_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28562	28611	
67	AY.1 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28563	28612	
68	AY.2 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28564	28613	
69	AY.4_v1 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28565	28614	
70	AY.4_v2 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28566	28615	
71	AY.4.2 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28567	28616	
72	B.1.617.3 (Индия)_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484Q_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28568	28617	
73	B.1.617 (Индия)_withE484K (с мутацией E484K) S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_E484K_D614G_P681R)	28569	28618	
74	B.1.617.1 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484K_D614G_P681R_Q1071H)	28570	28619	
75	B.1.617.2 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28571	28620	
76	B.1.617.2_v2 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_1_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28572	28621	
77	AY.1 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F	28573	28622	

	157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)			
78	AY.2 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28574	28623	
79	AY.4_v1 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28575	28624	
80	AY.4_v2 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28576	28625	
81	AY.4.2 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28577	28626	
82	B.1.617.3 (Индия)_withE484K S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484K_D614G_P681R_D950N)	28578	28627	
83	B.1.617 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del)	28579	28628	
84	B.1.617.1 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_Q1071H)	28580	28629	
85	B.1.617.2 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28581	28630	
86	B.1.617.2_v2 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28582	28631	
87	AY.1 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28583	28632	
88	AY.2 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28584	28633	

	K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)			
89	AY.4_v1 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28585	28634	
90	AY.4_v2 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28586	28635	
91	AY.4.2 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28587	28636	
92	B.1.617.3 (Индия)_withE484K_w/oFCS S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28588	28637	
93	BA.1_v2 (Южная Африка 3) S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins2_14EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_N440K_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v2)	28917	28921	
94	BA.1_v3 (Южная Африка 3) S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins2_14EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v3)	28918	28922	
95	BA.1_v4 (Южная Африка 3) S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins2_14EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_A701V_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v4)	28919	28923	

96	BA.1_v5 (Южная Африка 3) S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins2_14EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_G446S_S477N_T4_78K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T5_47K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N8_56K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v5)	28920	28924	
----	---	-------	-------	--

w/oFCS: удален сайт расщепления фурином

**Подходящие кодирующие последовательности:**

Согласно предпочтительным воплощениям РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, предпочтительно определенного выше, или его фрагментов и вариантов. В этом контексте любая кодирующая последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный белок - шиповидный белок SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, или его фрагменты и варианты, может рассматриваться как подходящая кодирующая последовательность и, следовательно, может быть включена в РНК согласно настоящему изобретению.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту может содержать или состоять из по меньшей мере одной кодирующей последовательности, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок из SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, предпочтительно кодирует любую из SEQ ID NO: 1, 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588, 28917-28920 или их фрагменты или варианты. Следует понимать, что на уровне нуклеиновой кислоты любая последовательность РНК, которая кодирует аминокислотную последовательность и является идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 116, 136, 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247, 28589-28637, 28916, 28921-28924 или их фрагментов или вариантов, может быть выбрана и, соответственно, может рассматриваться в качестве подходящей кодирующей последовательности согласно настоящему изобретению. В некоторых воплощениях последовательность РНК,

которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 116, 136, 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247, 28589-28637, 28916 или 28921-28924.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту может содержать или состоять из по меньшей мере одной кодирующей последовательности, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок из SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, предпочтительно кодирует любую из SEQ ID NO: 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588, 28917-28920 или их фрагменты или варианты. Следует понимать, что на уровне нуклеиновой кислоты любая последовательность РНК, которая кодирует аминокислотную последовательность и является идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 23095-23112, 27110-27247, 28589-28637, 28921-28924 или их фрагментов или вариантов, может быть выбрана и, соответственно, может рассматриваться в качестве подходящей кодирующей последовательности согласно настоящему изобретению. В некоторых воплощениях последовательность РНК, которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247 28589-28637 или 28921-28924.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту может содержать или состоять из по меньшей мере одной кодирующей последовательности, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок из SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, предпочтительно кодирует любую из SEQ ID NO: 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588, 28917-28920 или их фрагменты или варианты. Следует понимать, что на уровне нуклеиновой кислоты любая последовательность РНК, которая кодирует аминокислотную последовательность и является идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 137, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148,

27110-27201, 28589-28637, 28921-28924 или их фрагментов или вариантов, может быть выбрана и, соответственно, может рассматриваться в качестве подходящей кодирующей последовательности согласно настоящему изобретению. В некоторых воплощениях последовательность РНК, которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 137, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 27110-27201, 28589-28637 или 28921-28924.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту может содержать или состоять из по меньшей мере одной кодирующей последовательности, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок из SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, предпочтительно кодирует любую из SEQ ID NO: 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588, 28917-28920 или их фрагменты или варианты. Следует понимать, что на уровне нуклеиновой кислоты любая последовательность РНК, которая кодирует аминокислотную последовательность и является идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 146, 23150-23184, 27202-27247 или их фрагментов или вариантов, может быть выбрана и, соответственно, может рассматриваться в качестве подходящей кодирующей последовательности согласно настоящему изобретению. В некоторых воплощениях последовательность РНК, которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 146, 23150-23184 или 27202-27247.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит кодирующую последовательность, содержащую по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновых кислот, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных последовательностям в соответствии с SEQ ID NO: 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247, 28589-28637, 28921-28924, или фрагмент или вариант любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях последовательность РНК, которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781,

22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247, 28589-28637 или 28921-28924. Дополнительная информация относительно каждой из этих подходящих последовательностей нуклеиновых кислот также может быть получена из перечня последовательностей, в частности, из подробных сведений, представленных в нем под идентификатором <223>.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит кодирующую последовательность, содержащую по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновых кислот, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных последовательностям в соответствии с SEQ ID NO: 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23094, 27110-27132, 28589-28637 или 28921-28924, или фрагмент или вариант любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях последовательность РНК, которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23094, 27110-27132, 28589-28637 или 28921-28924.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит кодирующую последовательность, содержащую по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновых кислот, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных последовательностям в соответствии с SEQ ID NO: 23150-23166 или 27202-27224, или фрагмент или вариант любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях последовательность РНК, которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 23150-23166 или 27202-27224.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит кодирующую последовательность, содержащую по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновых кислот, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных последовательностям в соответствии с SEQ ID NO: 23150-23166, 27202-27224, 23114-23130 или 27156-27178, или фрагмент или вариант любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях последовательность РНК,

которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 23114-23130 или 27156-27178.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит кодирующую последовательность, содержащую по меньшей мере одну из последовательностей нуклеиновых кислот, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных последовательностям в соответствии с SEQ ID NO: 23150-23166, 27202-27224, 23167-23184 или 27225-27247, или фрагмент или вариант любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях последовательность РНК, которая кодирует шиповидный белок SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична любой из SEQ ID NO: 23167-23184 или 27225-27247.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту представляет собой искусственную РНК.

Термин «искусственная РНК», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения РНК, которая не встречается в природе. Другими словами, под искусственной РНК можно понимать неприродную молекулу РНК. Такие молекулы РНК могут быть неприродными в связи с их особой последовательностью (например, кодирующая последовательность с модифицированным содержанием G/C, UTR) и/или вследствие других модификаций, например, структурных модификаций нуклеотидов. Как правило, искусственная РНК может быть сконструирована и/или получена с помощью генной инженерии с целью соответствия желаемой искусственной последовательности нуклеотидов. В этом контексте искусственная РНК представляет собой последовательность, которая не может встретиться в природе, то есть последовательность, которая отличается от последовательности дикого типа/встречающейся в природе последовательности по меньшей мере на один нуклеотид. Термин «искусственная РНК» не ограничивается значением «одна отдельная молекула РНК», под ним понимается совокупность по существу идентичных молекул РНК. Соответственно, он может относиться к множеству по существу идентичных молекул РНК.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту представляет собой модифицированную и/или стабилизированную РНК, предпочтительно модифицированную и/или стабилизированную искусственную РНК.



Таким образом, в соответствии с предпочтительными воплощениями РНК согласно настоящему изобретению может быть представлена в виде «стабилизированной искусственной РНК» или «стабилизированной кодирующей РНК», то есть РНК, демонстрирующей повышенную устойчивость к деградации *in vivo*, и/или РНК, демонстрирующей повышенную стабильность *in vivo*, и/или РНК, демонстрирующей улучшенную способность к трансляции *in vivo*. Далее описаны конкретные подходящие в этом контексте модификации/способы адаптации, которые подходят для «стабилизации» РНК. Предпочтительно РНК согласно настоящему изобретению может быть представлена в виде «стабилизированной РНК» или «стабилизированной кодирующей РНК».

На такую стабилизацию может влиять обеспечение «высушенной РНК» и/или «очищенной РНК», как дополнительно указано ниже. В качестве альтернативы или в дополнение к этому на такую стабилизацию может влиять, например, модифицированный фосфатный остов РНК согласно настоящему изобретению. Модификация остова применительно к настоящему изобретению представляет собой модификацию, при которой химически модифицированы фосфаты остова нуклеотидов, содержащихся в нуклеиновой кислоте. Нуклеотиды, которые могут быть применены в этом отношении, содержат, например, фосфоротиоат-модифицированный фосфатный остов, где предпочтительно по меньшей мере один из атомов кислорода фосфата, содержащихся в фосфатном остове, заменен на атом серы. Стабилизированные РНК могут дополнительно включать, например: неионные аналоги фосфатов, такие как, например, алкил- и арилфосфонаты, в которых заряженный кислород фосфоната заменен на алкильную или арильную группу, или сложные фосфодизэфиры и сложные алкилфосфотриэфиры, в которых заряженная кислородсодержащая группа находится в алкилированной форме. Такие модификации остова, как правило, включают, без каких-либо ограничений, модификации из группы, состоящей из метилфосфонатов, фосфорамидатов и фосфоротиоатов (например, цитидин-5'-О-(1-тиофосфат)).

Далее описаны подходящие модификации, обеспечивающие возможность «стабилизации» РНК согласно настоящему изобретению.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность с модифицированными кодонами.

В предпочтительных воплощениях по меньшей мере одна кодирующая последовательность РНК представляет собой кодирующую последовательность с

модифицированными кодонами, где аминокислотная последовательность, кодируемая указанной по меньшей мере одной кодирующей последовательностью с модифицированными кодонами, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой соответствующей кодирующей последовательностью дикого типа или референсной кодирующей последовательностью.

Термин «кодирующая последовательность с модифицированными кодонами» относится к кодирующим последовательностям, которые отличаются по меньшей мере на один кодон (триплеты нуклеотидов, кодирующие одну аминокислоту) при сравнении с соответствующей кодирующей последовательностью дикого типа или референсной кодирующей последовательностью. Соответственно, кодирующая последовательность с модифицированными кодонами в контексте настоящего изобретения может демонстрировать повышенную устойчивость к деградации *in vivo*, и/или повышенную стабильность *in vivo*, и/или улучшенную способность к трансляции *in vivo*. В случае модификаций кодонов в самом широком смысле используется вырожденность генетического кода, вследствие которой несколько кодонов могут кодировать одну и ту же аминокислоту и могут быть использованы взаимозаменяемо для оптимизации/модификации кодирующей последовательности для применения *in vivo*.

Термин «эталонная кодирующая последовательность» относится к кодирующей последовательности, которая была исходной последовательностью, подлежащей модификации и/или оптимизации.

В предпочтительных воплощениях по меньшей мере одна кодирующая последовательность РНК представляет собой кодирующую последовательность с модифицированными кодонами, где кодирующая последовательность с модифицированными кодонами выбрана из кодирующей последовательности с максимизированным содержанием С, кодирующей последовательности с максимизированным индексом адаптации кодонов (CAI), кодирующей последовательности, адаптированной по частоте использования кодонов человека, кодирующей последовательности с модифицированным содержанием G/C и кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C или любой их комбинации.

В предпочтительных воплощениях по меньшей мере одна кодирующая последовательность РНК имеет содержание G/C, составляющее по меньшей мере примерно 50%, 55% или 60%. В конкретных воплощениях по меньшей мере одна кодирующая последовательность РНК компонента А имеет содержание G/C, составляющее по меньшей мере примерно 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% или 70%.

При трансфекции в клетки-хозяева млекопитающих РНК, содержащая кодирующую последовательность с модифицированными кодонами, сохраняет стабильность в течение 12-18 часов или более 18 часов, например, 24, 36, 48, 60, 72 или более 72 часов, и способна экспрессироваться клеткой-хозяином млекопитающего (например, мышечной клеткой).

При трансфекции в клетки-хозяева млекопитающих РНК, содержащая кодирующую последовательность с модифицированными кодонами, подвергается трансляции с получением белка, где количество белка по меньшей мере сравнимо, или предпочтительно по меньшей мере на 10% больше, или по меньшей мере на 20% больше, или по меньшей мере на 30% больше, или по меньшей мере на 40% больше, или по меньшей мере на 50% больше, или по меньшей мере на 100% больше, или по меньшей мере на 200% или более больше количества белка, получаемого при трансляции природной последовательности, или последовательности дикого типа, или референсной кодирующей последовательности, трансфицированной в клетки-хозяева млекопитающих.

В некоторых воплощениях РНК может быть модифицирована, при этом содержание С по меньшей мере в одной кодирующей последовательности может быть повышено, предпочтительно максимизировано, по сравнению с содержанием С в соответствующей кодирующей последовательности дикого типа или референсной кодирующей последовательности (в настоящем документе называется «кодирующей последовательностью с максимизированным содержанием С»). Получение последовательностей нуклеиновых кислот с максимизированным содержанием С может быть соответствующим образом осуществлено с применением способа модификации согласно WO2015/062738. В этом контексте изобретение согласно WO2015/062738 включено в настоящий документ посредством ссылки.

В предпочтительных воплощениях РНК может быть модифицирована, при этом содержание G/C по меньшей мере в одной кодирующей последовательности может

быть оптимизировано по сравнению с содержанием G/C в соответствующей кодирующей последовательности дикого типа или референсной кодирующей последовательности (в настоящем документе называется «кодирующей последовательностью с оптимизированным содержанием G/C»). «Оптимизированная» в этом контексте относится к кодирующей последовательности, в которой содержание G/C предпочтительно увеличено до по существу максимально возможного содержания G/C. Получение последовательностей РНК с оптимизированным содержанием G/C может быть осуществлено с применением способа согласно WO2002/098443. В этом контексте изобретение согласно WO2002/098443 в его полном объеме включено в настоящее изобретение. Во всем объеме настоящего описания, включая идентификатор <223> перечня последовательностей, кодирующие последовательности с оптимизированным содержанием G/C обозначены аббревиатурами «opt1» или «gc».

В предпочтительных воплощениях РНК может быть модифицирована, при этом кодоны по меньшей мере в одной кодирующей последовательности могут быть адаптированы по частоте использования кодонов человека (в настоящем документе называется «кодирующей последовательностью, адаптированной по частоте использования кодонов человека»). Кодоны, кодирующие одну и ту же аминокислоту, встречаются у человека с различной частотой. Соответственно, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты предпочтительно модифицируют таким образом, чтобы частота кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту, соответствовала встречающейся в природе частоте этого кодона в соответствии с частотой использования кодонов человека. Например, в случае аминокислоты Ala кодирующая последовательность дикого типа или эталонная кодирующая последовательность предпочтительно адаптирована таким образом, что кодон «GCC» используется с частотой 0,40, кодон «GCT» используется с частотой 0,28, кодон «GCA» используется с частотой 0,22, и кодон «GCG» используется с частотой 0,10 и так далее. Соответственно, такую процедуру (приведенную в качестве примера для Ala) применяют для каждой аминокислоты, кодируемой кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, с получением кодирующих последовательностей, адаптированных по частоте использования кодонов человека. Во всем объеме настоящего описания, включая идентификатор <223> перечня последовательностей, кодирующие последовательности, адаптированные по частоте использования кодонов человека, обозначены аббревиатурами «opt3» или «human».

В некоторых воплощениях РНК может быть модифицирована, при этом содержание G/C по меньшей мере в одной кодирующей последовательности может быть модифицировано по сравнению с содержанием G/C в соответствующей кодирующей последовательности дикого типа или референсной кодирующей последовательности (в настоящем документе называется «кодирующей последовательностью с модифицированным содержанием G/C»). В этом контексте термины «оптимизация содержания G/C» или «модификация содержания G/C» относятся к нуклеиновой кислоте, которая содержит модифицированное, предпочтительно повышенное количество гуанозиновых и/или цитозиновых нуклеотидов по сравнению с кодирующей последовательностью дикого типа или референсной кодирующей последовательностью. Такое повышенное количество может быть достигнуто путем замены кодонов, содержащих аденозиновые или тимидиновые нуклеотиды, на кодоны, содержащие гуанозиновые или цитозиновые нуклеотиды. В качестве преимущества последовательности нуклеиновых кислот, имеющие повышенное содержание G/C, являются более стабильными или демонстрируют лучшую экспрессию, чем последовательности, имеющие повышенное содержание A/U. Предпочтительно содержание G/C в кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты повышено по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, предпочтительно по меньшей мере на 40% по сравнению с содержанием G/C в кодирующей последовательности соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа или референсной последовательности нуклеиновой кислоты (в настоящем документе обозначены как «opt 10» или «gc mod»). Например, содержание G/C в кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты предпочтительно повышено по меньшей мере на 10%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% или 25% относительно содержания G/C в SEQ ID NO: 28916.

В некоторых воплощениях РНК может быть модифицирована, при этом индекс адаптации кодонов (CAI) может быть повышен или предпочтительно максимизирован по меньшей мере в одной кодирующей последовательности (в настоящем документе называется «кодирующей последовательностью с максимизированным CAI»). Предпочтительно, чтобы все кодоны последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа или референсной последовательности нуклеиновой кислоты, которые относительно редко встречаются, например, у человека, были заменены на соответствующий кодон, который часто встречается, например, у человека, где часто

встречающийся кодон кодирует ту же аминокислоту, что и относительно редко встречающийся кодон. Соответственно, наиболее часто встречающиеся кодоны используются для каждой аминокислоты кодируемого белка. Соответственно, РНК содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, где индекс адаптации кодонов (CAI) по меньшей мере одной кодирующей последовательности составляет по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9 или по меньшей мере 0,95. Наиболее предпочтительно индекс адаптации кодонов (CAI) по меньшей мере одной кодирующей последовательности составляет 1 (CAI=1). Например, в случае аминокислоты Ala, кодирующая последовательность дикого типа или эталонная кодирующая последовательность может быть адаптирована таким образом, что для указанной аминокислоты всегда используется наиболее часто встречающийся у человека кодон «GCC». Соответственно, такая процедура (приведенная в качестве примера для Ala) может быть применена для каждой аминокислоты, кодируемой кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, с получением кодирующих последовательностей с максимальным CAI.

В особенно предпочтительных воплощениях по меньшей мере одна кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой кодирующую последовательность с модифицированными кодонами, где кодирующая последовательность с модифицированными кодонами представляет собой кодирующую последовательность с оптимизированным содержанием G/C.

В особенно предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, содержащую или состоящую из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C, кодирующей антиген SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты с оптимизированным содержанием G/C, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 137, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 27110-27201, 28589-28637, 28921-28924, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В особенно предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, содержащую или состоящую из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием

G/C, кодирующей антиген SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты с оптимизированным содержанием G/C, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 23150-23184, 27202-27247, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В еще более предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, содержащую или состоящую из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C, кодирующей антиген SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты с модифицированными кодонами, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23090, 23108, 23126, 23144, 23162, 23180, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 28589 (B.1.315; C.1.2), или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 23090, 23108, 23126, 23144, 23162, 23180, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181 или 28589. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 23090-23091, 23162-23163 или 28589.

В еще более предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, содержащую или состоящую из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C, кодирующей антиген SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты с модифицированными кодонами, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27116, 27139, 27162, 27185, 27208, 27231, 27117, 27140, 27163, 27186, 27209, 27232, 27118, 27141, 27164, 27187, 27210, 27233, 28601-28607 (B.1.617; B.1.617.1; B.1.617.2; AY.1; AY.2; AY.4; AY.4.2; B.1.617.3), или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по

меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 27116, 27139, 27162, 27185, 27208, 27231, 27117, 27140, 27163, 27186, 27209, 27232, 27118, 27141, 27164, 27187, 27210, 27233 или 28601-28607. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 27116-27118 27208-27210 или 28601-28607.

В еще более предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, содержащую или состоящую из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C, кодирующей антиген SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты с модифицированными кодонами, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27118, 27141, 27164, 27187, 27210, 27233 или 28601-28606 (B.1.617.2; AY.1; AY.2; AY.4; AY.4.2), или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 27118, 27141, 27164, 27187, 27210, 27233 или 28601-28606. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 27118, 27210 или 28601-28606.

В еще более предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, содержащую или состоящую из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C, кодирующей антиген SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты с модифицированными кодонами, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27118, 27141, 27164, 27187, 27210 или 27233 (B.1.617.2), или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 27118, 27141, 27164, 27187, 27210 или 27233. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая



последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 27118 или 27210.

В других предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, содержащую или состоящую из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C, кодирующей антиген SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты с модифицированными кодонами, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28590-28593, 28921-28924 (B.1.1.529, Омикрон), или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 28590-28593. В некоторых аспектах по меньшей мере одна кодирующая последовательность, кодирующая антиген SARS-CoV-2, по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 28590-28593, 28921-28924.

#### **UTR:**

В предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную нетранслируемую область (UTR). В некоторых аспектах РНК согласно указанным воплощениям не содержит 3' UTR, содержащей последовательность SEQ ID NO: 268. В некоторых аспектах РНК согласно указанным воплощениям содержит 3' UTR, содержащую последовательность SEQ ID NO: 268.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит кодирующую белок область («кодирующую последовательность», или «cds») и 5'-UTR и/или 3'-UTR. Примечательно, что UTR могут содержать регуляторные элементы последовательности, которые определяют цикл обновления, стабильность и локализацию нуклеиновой кислоты, например, РНК. Более того, UTR могут содержать элементы последовательности, которые усиливают трансляцию. В контексте медицинского применения трансляция РНК с получением по меньшей мере одного

пептида или белка имеет первостепенное значение для терапевтической эффективности. Определенные комбинации 3'-UTR и/или 5'-UTR могут усиливать экспрессию функционально связанных кодирующих последовательностей, которые кодируют пептиды или белки согласно настоящему изобретению. Молекулы РНК, содержащие указанные комбинации UTR, в качестве преимущества обеспечивают быструю и временную экспрессию антигенных пептидов или белков после введения субъекту, предпочтительно после внутримышечного введения. Соответственно, РНК, содержащая определенные комбинации 3'-UTR и/или 5'-UTR, представленные в настоящем документе, является особенно подходящей для введения в виде вакцины, в частности, подходящей для введения в мышцу, дерму или эпидермис субъекта.

Соответственно, РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну гетерологичную 5'-UTR и/или по меньшей мере одну гетерологичную 3'-UTR. Указанные гетерологичные 5'-UTR или 3'-UTR могут быть получены из встречающихся в природе генов или могут быть синтетически сконструированы. В предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, определенную в настоящем документе, функционально связанную по меньшей мере с одной (гетерологичной) 3'-UTR и/или по меньшей мере с одной (гетерологичной) 5'-UTR.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную 3'-UTR, где РНК не содержит 3'-UTR, содержащей последовательность SEQ ID NO: 268. Предпочтительно РНК содержит 3'-UTR, которая может быть получена из гена, который относится к РНК с увеличенным периодом полужизни (то есть которая обеспечивает стабильную РНК).

В некоторых воплощениях 3'-UTR содержит один или более из сигнала полиаденилирования, сайта связывания белков, влияющих на стабильность нуклеиновой кислоты или ее расположение в клетке, или одну или более микроРНК или сайты связывания микроРНК.

МикроРНК (или миРНК) представляют собой некодирующие РНК длиной 19-25 нуклеотидов, которые связываются с 3'-UTR молекул нуклеиновой кислоты и осуществляют отрицательную регуляцию экспрессии генов либо путем снижения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты, либо путем ингибирования трансляции. Например, известно, что микроРНК регулируют РНК и, следовательно, экспрессию белков, например, в печени (miR-122), сердце (miR-1d, miR-149), эндотелиальных

клетках (miR-17-92, miR-126), жировой ткани (let-7, miR-30c), почках (miR-192, miR-194, miR-204), миелоидных клетках (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), мышцах (miR-133, miR-206, miR-208) и эпителиальных клетках легких (let-7, miR-133, miR-126). РНК может содержать одну или более последовательностей-мишеней микроРНК, последовательностей микроРНК или затравочных последовательностей микроРНК. Такие последовательности могут, например, соответствовать любой известной микроРНК, такой как микроРНК, описанные в источниках US2005/0261218 и US2005/0059005.

Соответственно, микроРНК или сайты связывания микроРНК, определенные выше, могут быть удалены из 3'-UTR или введены в 3'-UTR, чтобы адаптировать экспрессию РНК к желаемым типам клеток или тканям (например, мышечным клеткам).

В предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную 3'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 3'-UTR гена, выбранного из PSMB3, ALB7, CASP1, COX6B1, GNAS, NDUFA1 и RPS9, или из гомолога, фрагмента или варианта любого из этих генов. В некоторых воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную 3'-UTR, где по меньшей мере одна гетерологичная 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена, выбранного из PSMB3, ALB7, CASP1, COX6B1, GNAS, NDUFA1 и RPS9, или из гомолога, фрагмента или варианта любого из этих генов, предпочтительно в соответствии с последовательностями нуклеиновых кислот, идентичными или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными SEQ ID NO: 253-266, 22902-22905, 22876-22895, 26996-26999, 28528-28539, или фрагмент или вариант любой из указанных последовательностей. Особенно предпочтительные последовательности нуклеиновых кислот в этом контексте могут быть получены из опубликованной заявки РСТ WO2019/077001A1, в частности, пункта 9 формулы изобретения WO2019/077001A1. Соответствующие последовательности 3'-UTR по п. 9 WO2019/077001A1 включены в настоящий документ посредством ссылки (например, SEQ ID NO: 23-34 согласно WO2019/077001A1 или их фрагменты или варианты).

В других воплощениях РНК содержит 3'-UTR, полученную из гена RPS9. Указанная 3'-UTR, полученная из гена RPS9, может содержать или состоять из

последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 263 или 264, 22894, 22895, 22904, 22905, или ее фрагмента или варианта.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит 3'-UTR, полученную из гена PSMB3. Указанная 3'-UTR, полученная из гена PSMB3, может содержать или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 253 или 254, 22892, 22893, 22902, 22903, 26996-26999, 28528-28539, или ее фрагмента или варианта.

В других воплощениях РНК содержит 3'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 22876-22891, 28526, 28527, или ее фрагмента или варианта.

В других воплощениях РНК может содержать 3'-UTR, описанную в источнике WO2016/107877, изобретение WO2016/107877 в отношении последовательностей 3'-UTR включено в настоящий документ посредством ссылки. Подходящими 3'-UTR являются SEQ ID NO: 1-24 и SEQ ID NO: 49-318 согласно WO2016/107877 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В других воплощениях нуклеиновая кислота содержит 3'-UTR, описанную в источнике WO2017/036580, изобретение WO2017/036580 в отношении последовательностей 3'-UTR включено в настоящий документ посредством ссылки. Подходящими 3'-UTR являются SEQ ID NO: 152-204 согласно WO2017/036580 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В других воплощениях нуклеиновая кислота содержит 3'-UTR, описанную в источнике WO2016/022914, изобретение WO2016/022914 в отношении последовательностей 3'-UTR включено в настоящий документ посредством ссылки. Особенно предпочтительными 3'-UTR являются последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 20-36 согласно WO2016/022914 или фрагменты или варианты этих последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную 5'-UTR.

Термины «5'-нетранслируемая область», или «5'-UTR», или «элемент 5'-UTR» известны и понятны среднему специалисту в данной области техники и предназначены, например, для обозначения части молекулы РНК, расположенной с 5'-конца (то есть предшествующей) кодирующей последовательности и не транслируемой с получением белка. 5'-UTR может представлять собой часть нуклеиновой кислоты, расположенную с 5'-конца кодирующей последовательности. Как правило, 5'-UTR начинается с сайта инициации транскрипции и заканчивается перед иницирующим кодоном кодирующей последовательности. 5'-UTR может содержать элементы для контроля экспрессии генов, также называемые регуляторными элементами. Такие регуляторные элементы могут представлять собой, например, сайты связывания рибосом, сайты связывания микроРНК и так далее. 5'-UTR может подвергаться посттранскрипционной модификации, например, путем ферментативного или посттранскрипционного добавления 5'-кэп-структуры (например, для мРНК).

Предпочтительно РНК содержит 5'-UTR, которая может быть получена из гена, который относится к РНК с увеличенным периодом полужизни (то есть которая обеспечивает стабильную РНК).

В некоторых воплощениях 5'-UTR содержит один или более сайтов связывания белков, влияющих на стабильность РНК или расположение РНК в клетке, или одну или более микроРНК или сайты связывания микроРНК (определенные выше).

Соответственно, микроРНК или сайты связывания микроРНК, определенные выше, могут быть удалены из 5'-UTR или введены в 5'-UTR, чтобы адаптировать экспрессию нуклеиновой кислоты к желаемым типам клеток или тканям (например, мышечным клеткам).

В предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную 5'-UTR, где по меньшей мере одна гетерологичная 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR гена, выбранного из HSD17B4, RPL32, ASAH1, ATP5A1, MP68, NDUFA4, NOSIP, RPL31, SLC7A3, TUBB4B и UBQLN2 или из гомолога, фрагмента или варианта любого из этих генов, в соответствии с последовательностями нуклеиновых кислот, идентичными или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными SEQ ID NO: 231-252, 22870-22875, или фрагмент или вариант любой из указанных последовательностей. Особенно предпочтительные последовательности нуклеиновых кислот в этом контексте могут быть выбраны из

опубликованной заявки РСТ WO2019/077001A1, в частности, пункта 9 формулы изобретения WO2019/077001A1. Соответствующие последовательности 5'-UTR по п. 9 WO2019/077001A1 включены в настоящий документ посредством ссылки (например, SEQ ID NO: 1-20 согласно WO2019/077001A1 или их фрагменты или варианты).

В предпочтительных воплощениях РНК содержит 5'-UTR, полученную из гена RPL31, где указанная 5'-UTR, полученная из гена RPL31, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 243, 244, 22872, 22873, или ее фрагмента или варианта.

В других воплощениях РНК содержит 5'-UTR, полученную из гена SLC7A3, где указанная 5'-UTR, полученная из гена SLC7A3, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 245, 246, 22874, 22875, или ее фрагмента или варианта.

В особенно предпочтительных воплощениях РНК содержит 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, где указанная 5'-UTR, полученная из гена HSD17B4, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 231, 232, 22870, 22871, или ее фрагмента или варианта.

В других воплощениях РНК содержит 5'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 22848-22867, 28522-28525, или ее фрагмента или варианта.

В других воплощениях РНК содержит 5'-UTR, описанную в источнике WO2013/143700, изобретение WO2013/143700 в отношении последовательностей 5'-UTR включено в настоящий документ посредством ссылки. Особенно предпочтительными 5'-UTR являются последовательности нуклеиновых кислот, полученные из SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 согласно WO2013/143700, или фрагменты или варианты этих последовательностей. В других воплощениях нуклеиновая кислота содержит 5'-UTR, описанную в источнике WO2016/107877, изобретение WO2016/107877 в отношении

последовательностей 5'-UTR включено в настоящий документ посредством ссылки. Особенно предпочтительными 5'-UTR являются последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 25-30 и SEQ ID NO: 319-382 согласно WO2016/107877 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В других воплощениях нуклеиновая кислота содержит 5'-UTR, описанную в источнике WO2017/036580, изобретение WO2017/036580 в отношении последовательностей 5'-UTR включено в настоящий документ посредством ссылки. Особенно предпочтительными 5'-UTR являются последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 1-151 согласно WO2017/036580 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В других воплощениях нуклеиновая кислота содержит 5'-UTR, описанную в источнике WO2016/022914, изобретение WO2016/022914 в отношении последовательностей 5'-UTR включено в настоящий документ посредством ссылки. Особенно предпочтительными 5'-UTR являются последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 3-19 согласно WO2016/022914 или фрагменты или варианты этих последовательностей.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, указанную в настоящем документе, которая кодирует по меньшей мере один антигенный белок, определенный в настоящем документе, предпочтительно полученный из SARS-CoV-2, функционально связанную с 3'-UTR и/или 5'-UTR, выбранными из следующих комбинаций 5'UTR/3'UTR («также называемых конструкциями UTR»):

a-1 (HSD17B4/PSMB3), a-2 (NDUFA4/PSMB3), a-3 (SLC7A3/PSMB3), a-4 (NOSIP/PSMB3), a-5 (MP68/PSMB3), b-1 (UBQLN2/RPS9), b-2 (ASAHI/RPS9), b-3 (HSD17B4/RPS9), b-4 (HSD17B4/CASP1), b-5 (NOSIP/COX6B1), c-1 (NDUFA4/RPS9), c-2 (NOSIP/NDUFA1), c-3 (NDUFA4/COX6B1), c-4 (NDUFA4 /NDUFA1), c-5 (ATP5A1/PSMB3), d-1 (Rpl31/PSMB3), d-2 (ATP5A1/CASP1), d-3 (SLC7A3/GNAS), d-4 (HSD17B4/NDUFA1), d-5 (Slc7a3/Ndufa1), e-1 (TUBB4B/RPS9), e-2 (RPL31/RPS9), e-3 (MP68/RPS9), e-4 (NOSIP/RPS9), e-5 (ATP5A1/RPS9), e-6 (ATP5A1/COX6B1), f-1 (ATP5A1/GNAS), f-2 (ATP5A1/NDUFA1), f-3 (HSD17B4/COX6B1), f-4 (HSD17B4/GNAS), f-5 (MP68/COX6B1), g-1 (MP68/NDUFA1), g-2 (NDUFA4/CASP1), g-3 (NDUFA4/GNAS), g-4 (NOSIP/CASP1), g-5 (RPL31/CASP1), h-1 (RPL31/COX6B1), h-2 (RPL31/GNAS), h-3 (RPL31/NDUFA1), h-4 (Slc7a3/CASP1), h-5 (SLC7A3/COX6B1), i-1 (SLC7A3/RPS9), i-2 (RPL32/ALB7), i-2 (RPL32/ALB7).

В особенно предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, указанную в настоящем документе, которая кодирует по меньшей мере один антигенный белок, полученный из SARS-CoV-2, где указанная кодирующая последовательность функционально связана с 5'-UTR HSD17B4 и 3'-UTR PSMB3 (HSD17B4/PSMB3 (конструкция UTR a-1)).

Авторами настоящего изобретения было показано, что это воплощение особенно полезно для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2. В этом контексте было показано, что даже одной вакцинации достаточно для обеспечения титров вируснейтрализующих антител.

В других предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, указанную в настоящем документе, которая кодирует по меньшей мере один антигенный белок, определенный в настоящем документе, предпочтительно полученный из коронавируса SARS-CoV-2 (nCoV-2019), где указанная кодирующая последовательность функционально связана с 5'-UTR SLC7A3 и 3'-UTR PSMB3 (SLC7A3/PSMB3 (конструкция UTR a-3)).

В других предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, указанную в настоящем документе, которая кодирует по меньшей мере один антигенный белок, определенный в настоящем документе, предпочтительно полученный из коронавируса SARS-CoV-2 (nCoV-2019), где указанная кодирующая последовательность функционально связана с 5'-UTR RPL31 и 3'-UTR RPS9 (RPL31/RPS9 (конструкция UTR e-2)).

В некоторых воплощениях РНК может быть моноцистронной, бицистронной или мультицистронной.

Термин «моноцистронная» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения нуклеиновой кислоты, которая содержит только одну кодирующую последовательность. Термины «бицистронная» или «мультицистронная», используемые в настоящем документе, известны и понятны среднему специалисту в данной области техники и предназначены, например, для обозначения нуклеиновой кислоты, которая может содержать две (бицистронная) или более (мультицистронная) кодирующие последовательности.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно первому аспекту является моноцистронной.



В других воплощениях РНК является моноцистронной, и кодирующая последовательность указанной нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере два различных антигенных пептида или белка, полученных из SARS-CoV-2. Соответственно, указанная кодирующая последовательность может кодировать по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь и более антигенных пептидов или белков, полученных из SARS-CoV-2, соединенных с помощью аминокислотной линкерной последовательности или без нее, где указанная линкерная последовательность может включать жесткие линкеры, гибкие линкеры, расщепляемые линкеры или их комбинацию. Такие конструкции в настоящем документе названы «мультиантигенными конструкциями».

В других воплощениях РНК может являться бицистронной или мультицистронной и содержит по меньшей мере две кодирующие последовательности, где по меньшей мере две кодирующие последовательности кодируют два или более различных антигенных пептида или белка, полученных из SARS-CoV-2. Соответственно, кодирующие последовательности в бицистронной или мультицистронной нуклеиновой кислоте соответствующим образом кодируют различные антигенные белки или пептиды, определенные в настоящем документе, или их иммуногенные фрагменты или иммуногенные варианты. Предпочтительно кодирующие последовательности в указанных бицистронных или мультицистронных конструкциях могут быть разделены по меньшей мере одной последовательностью IRES (внутреннего участка посадки рибосомы). Таким образом, термин «кодирующая два или более антигенных пептида или белка» может означать, не ограничиваясь этим, что бицистронная или мультицистронная нуклеиновая кислота кодирует, например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или более (предпочтительно различных) антигенных пептидов или белков различных изолятов SARS-CoV-2. В качестве альтернативы, бицистронная или мультицистронная нуклеиновая кислота может кодировать, например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или более (предпочтительно различных) антигенных пептидов или белков, полученных из одного и того же SARS-CoV-2. В этом контексте подходящие последовательности IRES могут быть выбраны из перечня последовательностей нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 1566-1662 патентной заявки WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей. В этом контексте изобретение согласно

WO2017/081082 в отношении последовательностей IRES включено в настоящий документ посредством ссылки.

Следует понимать, что в контексте настоящего изобретения определенные комбинации кодирующих последовательностей могут быть образованы любой комбинацией конструкций моноцистронной, бицистронной и мультицистронной РНК и/или мультиантигенных конструкций с получением набора нуклеиновых кислот, кодирующих несколько антигенных пептидов или белков, определенных в настоящем документе.

В предпочтительных воплощениях содержание A/U (A/T) в окружении сайта связывания рибосомы РНК может быть повышено по сравнению с содержанием A/U (A/T) в окружении сайта связывания рибосомы соответствующей ей РНК дикого типа или референсной РНК. Эта модификация (повышенное содержание A/U (A/T) в окружении сайта связывания рибосомы) увеличивает эффективность связывания рибосомы с РНК. Эффективное связывание рибосом с сайтом связывания рибосомы, в свою очередь, приводит к эффективной трансляции РНК.

Соответственно, в особенно предпочтительном воплощении РНК содержит сайт связывания рибосомы, также называемый «последовательностью Козак», идентичный или по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% идентичный любой из последовательностей SEQ ID NO: 180, 181, 22845-22847 или их фрагментов или вариантов.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну поли(N)-последовательность, например, по меньшей мере одну поли(A)-последовательность, по меньшей мере одну поли(U)-последовательность, по меньшей мере одну поли(C)-последовательность или их комбинации.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну поли(A)-последовательность.

Термины «поли(A)-последовательность», «поли(A)-хвост» или «3'-поли(A)-хвост», используемые в настоящем документе, известны и понятны среднему специалисту в данной области техники и предназначены, например, для обозначения последовательности аденозиновых нуклеотидов, как правило, расположенной с 3'-конца линейной РНК (или в кольцевой РНК), имеющей длину до примерно 1000 аденозиновых нуклеотидов. Предпочтительно указанная поли(A)-последовательность является по существу гомополимерной, например, поли(A) последовательность из,

например, 100 аденозиновых нуклеотидов по существу имеет длину 100 нуклеотидов. В других воплощениях поли(А)-последовательность прерывается по меньшей мере одним нуклеотидом, отличным от аденозинового нуклеотида, например, поли(А)-последовательность из, например, 100 аденозиновых нуклеотидов может иметь длину более 100 нуклеотидов (включая 100 аденозиновых нуклеотидов и, кроме того, указанный по меньшей мере один нуклеотид - или участок из нуклеотидов - отличный от аденозинового нуклеотида).

Поли(А)-последовательность может содержать от примерно 10 до примерно 500 аденозиновых нуклеотидов, от примерно 10 до примерно 200 аденозиновых нуклеотидов, от примерно 40 до примерно 200 аденозиновых нуклеотидов или от примерно 40 до примерно 150 аденозиновых нуклеотидов. Соответственно, длина поли(А)-последовательности может составлять по меньшей мере примерно или даже более чем примерно 10, 50, 64, 75, 100, 200, 300, 400 или 500 аденозиновых нуклеотидов. В некоторых воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну поли(А)-последовательность, содержащую от 30 до 200 аденозиновых нуклеотидов, где 3'-концевой нуклеотид указанной РНК представляет собой аденозин.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну поли(А)-последовательность, содержащую от примерно 30 до примерно 200 аденозиновых нуклеотидов. В особенно предпочтительных воплощениях поли(А)-последовательность содержит примерно 64 аденозиновых нуклеотида (A64). В особенно предпочтительных воплощениях поли(А)-последовательность содержит примерно 100 аденозиновых нуклеотидов (A100). В других воплощениях поли(А)-последовательность содержит примерно 150 аденозиновых нуклеотидов.

В других воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 аденозиновых нуклеотидов, где указанная поли(А)-последовательность прерывается неаденозиновыми нуклеотидами, предпочтительно 10 неаденозиновыми нуклеотидами (A30-N10-A70).

Поли(А)-последовательность, определенная в настоящем документе, может быть расположена непосредственно на 3'-конце РНК, предпочтительно непосредственно на 3'-конце РНК.

В предпочтительных воплощениях 3'-концевой нуклеотид (то есть последний 3'-концевой нуклеотид в полинуклеотидной цепи) представляет собой 3'-концевой нуклеотид А по меньшей мере одной поли(А)-последовательности. Термин «расположенная непосредственно на 3'-конце» следует понимать как расположенную точно на 3'-конце, другими словами, 3'-конец нуклеиновой кислоты состоит из поли(А)-последовательности, оканчивающейся нуклеотидом А.

Авторами настоящего изобретения было показано, что это воплощение особенно полезно для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2. В этом контексте было показано, что даже одной вакцинации достаточно для обеспечения титров вируснейтрализующих антител.

В особенно предпочтительном воплощении последовательность РНК содержит поли(А)-последовательность по меньшей мере из 70 аденозиновых нуклеотидов, где 3'-концевой нуклеотид представляет собой аденозиновый нуклеотид.

В этом контексте было показано, что аденозиновый нуклеотид в качестве концевого нуклеотида снижает индукцию IFN-альфа РНК-вакциной. Это особенно важно, поскольку считается, что индукция IFN-альфа является основным фактором индукции лихорадки у вакцинированных субъектов, чего, безусловно, следует избегать.

В предпочтительных воплощениях поли(А)-последовательность РНК получают с матрицы ДНК во время транскрипции РНК *in vitro*. В других воплощениях последовательность поли(А) получают *in vitro* обычными методами химического синтеза без обязательной транскрипции с матрицы ДНК. В других воплощениях поли(А)-последовательности получают путем ферментативного полиаденилирования РНК (после транскрипции РНК *in vitro*) с применением коммерчески доступных наборов для полиаденилирования и соответствующих протоколов, известных в данной области техники, или, в качестве альтернативы, с помощью иммобилизованных поли(А)-полимераз, например, с применением способов и средств, описанных в источнике WO2016/174271, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых воплощениях РНК содержит поли(А)-последовательность, полученную путем ферментативного полиаденилирования, где большинство молекул РНК содержат от примерно 100 (+/-20) до примерно 500 (+/-50), предпочтительно примерно 250 (+/-20) аденозиновых нуклеотидов.

В других воплощениях РНК содержит поли(А)-последовательность, полученную с матричной ДНК, и по меньшей мере одну дополнительную поли(А)-последовательность, полученную путем ферментативного полиаденилирования, например, как описано в источнике WO2016/091391, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В других воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну поли(С)-последовательность.

Термин «поли(С)-последовательность», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения последовательности цитозиновых нуклеотидов, состоящей из примерно 200 цитозиновых нуклеотидов. В предпочтительных воплощениях поли(С)-последовательность содержит от примерно 10 до примерно 200 цитозиновых нуклеотидов, от примерно 10 до примерно 100 цитозиновых нуклеотидов, от примерно 20 до примерно 70 цитозиновых нуклеотидов, от примерно 20 до примерно 60 цитозиновых нуклеотидов или от примерно 10 до примерно 40 цитозиновых нуклеотидов. В особенно предпочтительном воплощении поли(С)-последовательность содержит примерно 30 цитозиновых нуклеотидов.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну гистоновую структуру «стебель-петля» (hSL).

Термин «гистоновая структура стебель-петля» (сокращенно «hSL», например, в перечне последовательностей) предназначен для обозначения последовательностей нуклеиновых кислот, которые образуют вторичную структуру «стебель-петля», преимущественно встречающуюся в мРНК гистонов.

Гистоновые последовательности/структуры «стебель-петля» могут быть подходящим образом выбраны из гистоновых последовательностей «стебель-петля», описанных в источнике WO2012/019780, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки, изобретение, относящееся к гистоновым последовательностям «стебель-петля»/гистоновым структурам «стебель-петля», включено в настоящий документ посредством ссылки. Гистоновая последовательность «стебель-петля», которая может быть применена в настоящем изобретении, предпочтительно может быть получена из формул (I) или (II), представленных в источнике WO2012/019780. Согласно другому предпочтительному воплощению РНК содержит по меньшей мере одну гистоновую последовательность «стебель-петля»,

полученную из по меньшей мере одной из конкретных формул (Ia) или (IIa), представленных в патентной заявке WO2012/019780.

В предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну гистоновую структуру «стебель-петля», где указанная гистоновая структура «стебель-петля» (hSL) содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 178 или 179, или ее фрагментов или вариантов.

В других воплощениях РНК не содержит гистоновой структуры «стебель-петля», определенной в настоящем документе.

В различных воплощениях РНК содержит 3'-концевой элемент последовательности. Указанный 3'-концевой элемент последовательности содержит поли(А)-последовательность и, возможно, гистоновую последовательность стебель-петля. Соответственно, РНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один 3'-концевой элемент последовательности, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 254, 22893, 22903, 26997, 26999, 28529, 28531, 28533, 28535, 28537, 28539, или ее фрагмента или варианта.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит 3'-концевой элемент последовательности. Указанный 3'-концевой элемент последовательности содержит поли(А)-последовательность. Соответственно, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один 3'-концевой элемент последовательности, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 254, 22903, 26999, 28531, 28525, 28539, или ее фрагмента или варианта.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит 3'-концевой элемент последовательности. Указанный 3'-концевой элемент последовательности содержит поли(А)-последовательность и гистоновую последовательность стебель-петля. Соответственно, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один 3'-концевой элемент последовательности, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей

мере на 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 254, 22893, 26997, 28529, 28533, 28537, или ее фрагмента или варианта.

В различных воплощениях РНК может содержать 5'-концевой элемент последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 176, 177 или 22840-22844 или их фрагмент или вариант.

В других воплощениях РНК может содержать 5'-концевой элемент последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 176, 177 или 22840-22844 или их фрагмент или вариант. Такой 5'-концевой элемент последовательности содержит, например, сайт связывания РНК-полимеразы T7. Кроме того, первый нуклеотид указанной 5'-концевой начальной последовательности может предпочтительно включать 2'-О-метилирование, например, 2'-О-метилированный гуанозин или 2'-О-метилированный аденозин.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную 5'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 5'-UTR HSD17B4, и по меньшей мере одну гетерологичную 3'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 3'-UTR PSMB3. В некоторых воплощениях 5'-UTR из HSD17B4 по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98% и до 99% идентична SEQ ID NO: 232. В некоторых воплощениях 3'-UTR из PSMB3 по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98% и до 99% идентична SEQ ID NO: 254. В особенно предпочтительных воплощениях РНК содержит, от 5'-конца к 3'-концу: (1) структуру 5'-cap1; (2) 5'-UTR, полученную из 5'-UTR гена HSD17B4, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 232; (3) по меньшей мере одну кодирующую последовательность (кодирующую шиповидный антиген SARS-CoV согласно воплощениям); (4) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 254; (5) возможно, гистоновую последовательность «стебель-петля»; и (6) поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов А, где 3'-концевой нуклеотид указанной РНК представляет собой аденозин.

Предпочтительно РНК содержит от примерно 50 до примерно 20000 нуклеотидов, или от примерно 500 до примерно 10000 нуклеотидов, или от примерно 1000 до примерно 10000 нуклеотидов, или предпочтительно от примерно 1000 до

примерно 5000 нуклеотидов, или еще более предпочтительно от примерно 2000 до примерно 5000 нуклеотидов.

Согласно особенно предпочтительным воплощениям РНК представляет собой кодирующую РНК. В предпочтительных воплощениях кодирующая РНК может быть выбрана из мРНК, (кодирующей) самореплицирующейся РНК, (кодирующей) кольцевой РНК, (кодирующей) вирусной РНК или (кодирующего) РНК-репликона.

В других воплощениях кодирующая РНК представляет собой кольцевую РНК. Под используемыми в настоящем документе терминами «кольцевая РНК» или «кРНК» следует понимать кольцевые полинуклеотидные конструкции, которые кодируют по меньшей мере один антигенный пептид или белок, определенный в настоящем документе. Предпочтительно такая кРНК представляет собой молекулу одноцепочечной РНК. В предпочтительных воплощениях указанная кРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антигенный белок из коронавируса SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант.

В других воплощениях кодирующая РНК представляет собой РНК-репликон. Термин «РНК-репликон» известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения оптимизированной самореплицирующейся РНК. Такие конструкции могут включать элементы репликазы, полученные, например, из альфавирусов (например, SFV, SIN, VEE или RRV) и замену структурных белков вируса на целевую нуклеиновую кислоту (то есть кодирующую последовательность, которая кодирует антигенный пептид или белок коронавируса SARS-CoV-2). В качестве альтернативы, репликаза может быть обеспечена независимой конструкцией кодирующей РНК или конструкцией кодирующей ДНК. После репликазы может находиться субгеномный промотор, который контролирует репликацию РНК-репликона.

В особенно предпочтительных воплощениях по меньшей мере одна нуклеиновая кислота не является РНК-репликоном или самореплицирующейся РНК.

В особенно предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению представляет собой мРНК.

Предпочтительно мРНК не содержит элемент репликазы (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую репликазу).



Термины «РНК» и «мРНК» известны и понятны среднему специалисту в данной области техники и предназначены, например, для обозначения молекулы рибонуклеиновой кислоты, то есть полимера, состоящего из нуклеотидов. Эти нуклеотиды обычно представляют собой момеры аденозинмонофосфата, уридинмонофосфата, гуанозинмонофосфата и цитидинмонофосфата, которые соединены друг с другом вдоль так называемого остова. Остов образован фосфодиэфирными связями между сахаром, то есть рибозой, первого мономера и фосфатным фрагментом второго, соседнего мономера. Конкретная последовательность мономеров называется последовательностью РНК. мРНК (матричная РНК) обеспечивает кодирующую последовательность нуклеотидов, которая может подлежать трансляции с получением аминокислотной последовательности конкретного пептида или белка.

В контексте настоящего изобретения РНК, предпочтительно мРНК, обеспечивает по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует антигенный белок из шиповидного белка SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, и подвергается трансляции с получением (функционального) антигена после введения (например, после введения субъекту, например, субъекту-человеку).

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, является подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, предпочтительно вакцины против SARS-CoV-2, действующей против по меньшей мере одного из следующих изолятов SARS-CoV-2: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

В особенно предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, является подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, предпочтительно вакцины против SARS-CoV-2, действующей против В.1.351 (Южная Африка) или В.1.1.529

(Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5).

Соответственно, РНК может быть модифицирована путем добавления 5'-кэп-структуры, которая предпочтительно стабилизирует РНК, и/или усиливает экспрессию кодируемого антигена, и/или снижает стимуляцию врожденной иммунной системы (после введения субъекту). 5'-кэп-структура особенно важна в воплощениях, где РНК представляет собой линейную кодирующую РНК, например, линейную мРНК или линейный кодирующий РНК-репликон.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях РНК, в частности, мРНК, содержит 5'-кэп-структуру, предпочтительно структуру cap0, cap1, cap2, модифицированную структуру cap0 или модифицированную структуру cap1.

Термин «5'-кэп-структура», используемый в настоящем документе, известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения 5'-модифицированного нуклеотида, в частности, гуанинового нуклеотида, расположенного на 5'-конце РНК, например, мРНК. Предпочтительно 5'-кэп-структура соединена с РНК посредством 5'-5'-трифосфатной связи.

5'-кэп-структуры, которые могут являться подходящими в контексте настоящего изобретения, представляют собой cap0 (метилирование первого азотистого основания, например, m7GpppN), cap1 (дополнительное метилирование рибозы соседнего с m7GpppN нуклеотида), cap2 (дополнительное метилирование рибозы 2-го нуклеотида после m7GpppN), cap3 (дополнительное метилирование рибозы 3-го нуклеотида после m7GpppN), cap4 (дополнительное метилирование рибозы 4-го нуклеотида после m7GpppN), ARCA (аналог кэпа, встраивающийся в прямой ориентации), модифицированный ARCA (например, фосфоротиоат-модифицированный ARCA), инозин, N1-метилгуанозин, 2'-фторгуанозин, 7-деазагуанозин, 8-оксогуанозин, 2-аминогуанозин, LNA-гуанозин и 2-азидогуанозин.

5'-кэп-структура (cap0 или cap1) может быть получена при химическом синтезе РНК или при транскрипции РНК *in vitro* (котранскрипционное кэпирование) с применением аналогов кэпа.

Термин «аналог кэпа», используемый в настоящем документе, известен и понятен среднему специалисту в данной области техники и предназначен, например, для обозначения неполимеризуемого динуклеотида или тринуклеотида, который выполняет функцию кэпа, заключающуюся в том, что он облегчает трансляцию или

локализацию и/или предупреждает деградацию молекулы нуклеиновой кислоты, в частности, молекулы РНК, при включении его с 5'-конца молекулы нуклеиновой кислоты. Неполимеризуемый означает, что аналог кэпа будет включен только с 5'-конца, потому что он не имеет 5'-трифосфата и, следовательно, не может обеспечивать удлинение в 3'-направлении с помощью зависимой от матрицы полимеразы, в частности, с помощью зависимой от матрицы РНК-полимеразы. Примеры аналогов кэпа включают, но не ограничиваются указанным, химическую структуру, выбранную из группы, состоящей из m7GpppG, m7GpppA, m7GpppC; неметилированных аналогов кэпа (например, GpppG); диметилированных аналогов кэпа (например, m2,7GpppG), триметилированных аналогов кэпа (например, m2,2,7GpppG), диметилированных симметричных аналогов кэпа (например, m7Gpppm7G) или аналогов кэпа, встраивающихся в прямой ориентации (например, ARCA; m7,2'OmeGpppG, m7,2'dGpppG, m7,3'OmeGpppG, m7,3'dGpppG и их тетрафосфатные производные). Другие аналоги кэпа были описаны ранее (WO2008/016473, WO2008/157688, WO2009/149253, WO2011/015347 и WO2013/059475). Другие подходящие аналоги кэпа в этом контексте описаны в источниках WO2017/066793, WO2017/066781, WO2017/066791, WO2017/066789, WO2017/053297, WO2017/066782, WO2018/075827 и WO2017/066797, при этом изобретения, относящиеся к аналогам кэпа, включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых воплощениях модифицированную структуру cap1 получают с применением тринуклеотидного аналога кэпа, как описано в источниках WO2017/053297, WO2017/066793, WO2017/066781, WO2017/066791, WO2017/066789, WO2017/066782, WO2018/075827 и WO2017/066797, полное содержание указанных выше заявок РСТ включено в настоящий документ посредством ссылки. В частности, любые кэп-структуры, которые могут быть получены из структуры, описанной в пунктах формулы изобретения 1-5 WO2017/053297, могут быть подходящим образом применены для котранскрипционного получения модифицированной структуры cap1. Кроме того, любые кэп-структуры, которые могут быть получены из структуры, определенной в пункте 1 или пункте 21 формулы изобретения WO2018/075827, могут быть подходящим образом применены для котранскрипционного получения модифицированной структуры cap1.

В предпочтительных воплощениях РНК, в частности, мРНК, содержит структуру cap1.

В предпочтительных воплощениях 5'-кэп-структура может быть соответствующим образом добавлена котранскрипционно с применением тринуклеотидного аналога кэпа, определенного в настоящем документе, в ходе реакции транскрипции РНК *in vitro*, как определено в настоящем документе.

В предпочтительных воплощениях структуру сар1 кодирующей РНК согласно настоящему изобретению получают с помощью котранскрипционного кэпирования с применением тринуклеотидных аналогов кэпа m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG или m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG. Предпочтительным аналогом сар1 в этом контексте является m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG.

В других предпочтительных воплощениях структуру сар1 РНК согласно настоящему изобретению получают с помощью котранскрипционного кэпирования с применением тринуклеотидного аналога кэпа 3'OMe-m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG.

В других воплощениях структуру сар0 РНК согласно настоящему изобретению получают с помощью котранскрипционного кэпирования с применением аналога кэпа 3'OMe-m7G(5')ppp(5')G.

В других воплощениях 5'-кэп-структуру получают посредством ферментативного кэпирования с помощью кэпирующих ферментов (например, кэпирующих ферментов вируса осповакцины и/или кэп-зависимых 2'-О-метилтрансфераз) с получением структур сар0, сар1 или сар2. 5'-кэп-структура (сар0 или сар1) может быть добавлена с помощью иммобилизованных кэпирующих ферментов и/или кэп-зависимых 2'-О-метилтрансфераз с применением способов и средств, раскрытых в источнике WO2016/193226, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В предпочтительных воплощениях примерно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% (видов) РНК содержат структуру сар1, согласно данным анализа кэпирования. В предпочтительных воплощениях менее примерно 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% (видов) РНК не содержат структуры сар1, согласно данным анализа кэпирования. В других предпочтительных воплощениях примерно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% (видов) РНК содержат структуру сар0, согласно данным анализа кэпирования. В предпочтительных воплощениях менее примерно 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% (видов) РНК не содержат структуры сар0, согласно данным анализа кэпирования.

Термин «вид РНК» не ограничивается значением «одна отдельная молекула», под ним понимается совокупность по существу идентичных молекул РНК.

Соответственно, он может относиться к множеству по существу идентичных (кодирующих) молекул РНК.

Для определения наличия/отсутствия структуры cap0 или cap1 может быть применен анализ кэпирования, описанный в опубликованной заявке РСТ WO2015/101416, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки; в частности, описанный в пунктах 27-46 опубликованной заявки РСТ WO2015/101416. Другие способы анализа кэпирования, которые могут быть применены для определения наличия/отсутствия структуры cap0 или cap1 РНК, описаны в источнике РСТ/EP2018/08667 или опубликованных заявках согласно РСТ WO2014/152673 и WO2014/152659, полное содержание упомянутых выше заявок РСТ включено в настоящий документ посредством ссылки.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит кэп-структуру m7G(5')ppp(5')(2'OMeA). В таких воплощениях кодирующая РНК содержит 5'-концевой кэп m7G и дополнительное метилирование рибозы соседнего нуклеотида m7GpppN, в этом случае 2'-О-метилованного аденозина. Предпочтительно примерно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% (видов) РНК содержат такую структуру cap1, согласно данным анализа кэпирования.

В других предпочтительных воплощениях РНК содержит кэп-структуру m7G(5')ppp(5')(2'OMeG). В таких воплощениях кодирующая РНК содержит 5'-концевой кэп m7G и дополнительное метилирование рибозы соседнего нуклеотида, в этом случае 2'-О-метилованного гуанозина. Предпочтительно примерно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% (видов) кодирующей РНК содержат такую структуру cap1, согласно данным анализа кэпирования.

Соответственно, первый нуклеотид указанной последовательности РНК или мРНК, то есть нуклеотид, следующий за структурой m7G(5')ppp, может представлять собой 2'-О-метилованный гуанозин или 2'-О-метилованный аденозин.

Согласно некоторым воплощениям РНК представляет собой модифицированную РНК, где модификация относится к химическим модификациям, включающим модификации остова, а также модификации сахара или модификации основания.

Модифицированная РНК может содержать аналоги/модификации нуклеотидов, например, модификации остова, модификации сахара или модификации основания. Модификация остова в контексте настоящего изобретения представляет собой модификацию, при которой фосфаты остова нуклеотидов РНК химически

модифицированы. Модификация сахара в контексте настоящего изобретения представляет собой химическую модификацию сахара нуклеотидов РНК. Кроме того, модификация основания в контексте настоящего изобретения представляет собой химическую модификацию фрагмента основания нуклеотидов РНК. В этом контексте аналоги или модификации нуклеотидов предпочтительно выбраны из аналогов нуклеотидов, которые применимы для транскрипции и/или трансляции.

В особенно предпочтительных воплощениях аналоги/модификации нуклеотидов, которые могут быть включены в модифицированную РНК, описанную в настоящем документе, предпочтительно выбраны из 2-амино-6-хлорпуририбозид-5'-трифосфата, 2-аминопуририбозид-5'-трифосфата; 2-аминоаденозин-5'-трифосфата, 2'-амино-2'-дезоксцитидинтрифосфата, 2-тиоцитидин-5'-трифосфата, 2-тиоуридин-5'-трифосфата, 2'-фтортимидин-5'-трифосфата, 2'-О-метилюридин-5'-трифосфата, 4-тиоуридин-5'-трифосфата, 5-аминоаллилцитидин-5'-трифосфата, 5-аминоаллилуридин-5'-трифосфата, 5-бромцитидин-5'-трифосфата, 5-бромурин-5'-трифосфата, 5-бром-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата, 5-бром-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 5-иодцитидин-5'-трифосфата, 5-иод-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата, 5-иодуридин-5'-трифосфата, 5-иод-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 5-метилцитидин-5'-трифосфата, 5-метилуридин-5'-трифосфата, 5-пропинил-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата, 5-пропинил-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 6-азацитидин-5'-трифосфата, 6-азауридин-5'-трифосфата, 6-хлорпуририбозид-5'-трифосфата, 7-дезааденозин-5'-трифосфата, 7-дезагуанозин-5'-трифосфата, 8-азааденозин-5'-трифосфата, 8-азидоаденозин-5'-трифосфата, бензимидазолрибозид-5'-трифосфата, N1-метиладенозин-5'-трифосфата, N1-метилгуанозин-5'-трифосфата, N6-метиладенозин-5'-трифосфата, O6-метилгуанозин-5'-трифосфата, псевдоуридин-5'-трифосфата или пурамицин-5'-трифосфата, ксантозин-5'-трифосфата. Особое предпочтение отдается нуклеотидам для модификации оснований, выбранным из группы нуклеотидов с модифицированными основаниями, состоящей из 5-метилцитидин-5'-трифосфата, 7-дезагуанозин-5'-трифосфата, 5-бромцитидин-5'-трифосфата и псевдоуридин-5'-трифосфата, пиридин-4-онрибонуклеозида, 5-азауридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 2-тиопсевдоуридина, 5-гидроксиуридина, 3-метилуридина, 5-карбоксиметилуридина, 1-карбоксиметилпсевдоуридина, 5-пропинилуридина, 1-пропинилпсевдоуридина, 5-тауринометилуридина, 1-тауринометилпсевдоуридина, 5-тауринометил-2-тиоуридина, 1-тауринометил-4-тиоуридина, 5-метилуридина, 1-

метилпсевдоуридина, 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 1-метил-1-деазапсевдоуридина, 2-тио-1-метил-1-деазапсевдоуридина, дигидроуридина, дигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-метоксиуридина, 2-метокси-4-тиоуридина, 4-метоксипсевдоуридина и 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 5-азацитидина, псевдоизоцитидина, 3-метилцитидина, N4-ацетилцитидина, 5-формилцитидина, N4-метилцитидина, 5-гидроксиметилцитидина, 1-метилпсевдоизоцитидина, пирролоцитидина, пирролопсевдоизоцитидина, 2-тиоцитидина, 2-тио-5-метилцитидина, 4-тиопсевдоизоцитидина, 4-тио-1-метилпсевдоизоцитидина, 4-тио-1-метил-1-деазапсевдоизоцитидина, 1-метил-1-деазапсевдоизоцитидина, зебуларина, 5-азазебуларина, 5-метилзебуларина, 5-аза-2-тиозебуларина, 2-тиозебуларина, 2-метоксицитидина, 2-метокси-5-метилцитидина, 4-метоксипсевдоизоцитидина и 4-метокси-1-метилпсевдоизоцитидина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина, 7-дезааденина, 7-деза-8-азааденина, 7-деза-2-аминопурина, 7-деза-8-аза-2-аминопурина, 7-деза-2,6-диаминопурина, 7-деза-8-аза-2,6-диаминопурина, 1-метиладенозина, N6-метиладенозина, N6-изопентениладенозина, N6-(цис-гидроксиизопентенил)-аденозина, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)-аденозина, N6-глицинилкарбамоиладенозина, N6-треонилкарбамоиладенозина, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозина, N6,N6-диметиладенозина, 7-метиладенина, 2-метилтиоаденина и 2-метоксиаденина, инозина, 1-метилюинозина, виозина, вибутозина, 7-дезагуанозина, 7-деза-8-азагуанозина, 6-тиогуанозина, 6-тио-7-дезагуанозина, 6-тио-7-деза-8-азагуанозина, 7-метилгуанозина, 6-тио-7-метилгуанозина, 7-метилюинозина, 6-метоксигуанозина, 1-метилгуанозина, N2-метилгуанозина, N2,N2-диметилгуанозина, 8-оксогуанозина, 7-метил-8-оксогуанозина, 1-метил-6-тиогуанозина, N2-метил-6-тиогуанозина и N2,N2-диметил-6-тиогуанозина, 5'-О-(1-тиофосфат)-аденозина, 5'-О-(1-тиофосфат)-цитидина, 5'-О-(1-тиофосфат)-гуанозина, 5'-О-(1-тиофосфат)-уридина, 5'-О-(1-тиофосфат)-псевдоуридина, 6-азацитидина, 2-тиоцитидина, альфа-тиоцитидина, псевдоизоцитидина, 5-аминоаллилуридина, 5-иодуридина, N1-метилпсевдоуридина, 5,6-дигидроуридина, альфа-тиоуридина, 4-тиоуридина, 6-азауридина, 5-гидроксиуридина, дезокситимидина, 5-метилуридина, пирролоцитидина, инозина, альфа-тиогуанозина, 6-метилгуанозина, 5-метилцитидина, 8-оксогуанозина, 7-дезагуанозина, N1-метиладенозина, 2-амино-6-хлорпурина, N6-метил-2-аминопурина, псевдоизоцитидина, 6-хлорпурина, N6-метиладенозина, альфа-тиоаденозина, 8-азидоаденозина, 7-дезааденозина.

В некоторых воплощениях по меньшей мере один модифицированный нуклеотид выбран из псевдоуридина, N1-метилпсевдоуридина, N1-этилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 5-метилуридина, 2-тио-1-метил-1-дезапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина, 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метоксиуридина и 2'-О-метилуридина.

В некоторых воплощениях 100% урацила в кодирующей последовательности, определенной в настоящем документе, имеют химическую модификацию, предпочтительно химическая модификация находится в положении 5 урацила.

Особенно предпочтительными в контексте настоящего изобретения являются псевдоурин ( $\psi$ ), N1-метилпсевдоурин ( $m1\psi$ ), 5-метилцитозин и 5-метоксиурин.

Однако в некоторых воплощениях РНК согласно настоящему изобретению не содержит замещенных N1-метилпсевдоуридином ( $m1\Psi$ ) положений. В других аспектах РНК согласно указанным воплощениям не содержит замещенных псевдоуридином ( $\psi$ ), N1-метилпсевдоуридином ( $m1\psi$ ), 5-метилцитозином и 5-метоксиуридином положений. В других воплощениях РНК согласно настоящему изобретению содержит кодирующую последовательность, состоящую только из нуклеотидов G, C, A и U.

Включение модифицированных нуклеотидов, таких как псевдоурин ( $\psi$ ), N1-метилпсевдоурин ( $m1\psi$ ), 5-метилцитозин и/или 5-метоксиурин, в кодирующую последовательность РНК может обеспечивать преимущество, заключающееся в том, что нежелательные врожденные иммунные ответы (после введения кодирующей РНК или вакцины) могут быть скорректированы или уменьшены (при необходимости).

В некоторых воплощениях РНК содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует антигенный белок SARS-CoV-2, определенный в настоящем документе, где указанная кодирующая последовательность содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из псевдоуридина ( $\psi$ ) и N1-метилпсевдоуридина ( $m1\psi$ ), предпочтительно при этом все урациловые нуклеотиды заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые ( $m1\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК не содержит замещенных N1-метилпсевдоуридином ( $m1\Psi$ ) положений. В других воплощениях РНК не содержит



замещенных псевдоуридином ( $\psi$ ), N1-метилпсевдоуридином ( $m1\psi$ ), 5-метилцитозином и 5-метоксиуридином положений.

В предпочтительных воплощениях РНК содержит кодирующую последовательность, которая состоит только из нуклеотидов G, C, A и U и, следовательно, не содержит модифицированных нуклеотидов (за исключением 5'-концевой кэп-структуры, например, cap1).

Конструкции нуклеиновых кислот, предпочтительно мРНК, подходящие для вакцины против коронавируса

В различных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит, предпочтительно в направлении от 5'-конца к 3'-концу, следующие элементы:

- А) 5'-кэп-структуру, предпочтительно указанную в настоящем документе;
- В) 5'-концевой элемент инициации, предпочтительно указанный в настоящем документе;
- С) возможно, 5'-UTR, предпочтительно указанную в настоящем документе;
- Д) сайт связывания рибосомы, предпочтительно указанный в настоящем документе;
- Е) по меньшей мере одну кодирующую последовательность, предпочтительно указанную в настоящем документе;
- Ф) 3'-UTR, предпочтительно указанную в настоящем документе;
- Г) возможно, поли(А)-последовательность, предпочтительно указанную в настоящем документе;
- Н) возможно, поли(С)-последовательность, предпочтительно указанную в настоящем документе;
- И) возможно, гистоновую структуру стебель-петля, предпочтительно указанную в настоящем документе;
- Ж) возможно, 3'-концевой элемент последовательности, предпочтительно указанный в настоящем документе.

В особенно предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, содержит следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

- А) структуру cap1, определенную в настоящем документе;
- В) 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO:231 или 232;

С) кодирующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 116, 136, 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247, 28589-28637, 28916, 28921-28924 или их фрагментов или вариантов.

Д) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 253 или 254;

Е) гистоновую структуру «стебель-петля», выбранную из SEQ ID NO: 178 или 179;

Ф) поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов А, предпочтительно представляющую собой 3'-конец.

В других предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, содержит следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

А) структуру cap1, определенную в настоящем документе;

В) 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO:231 или 232;

С) кодирующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 116, 136, 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247, 28589-28637, 28916, 28921-28924 или их фрагментов или вариантов.

Д) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 253 или 254;

Ф) поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов А, предпочтительно представляющую собой 3'-конец.

В особенно предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, содержит следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

А) структуру cap1, определенную в настоящем документе;

В) 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO:231 или 232;

С) кодирующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27118, 27141, 27164, 27187, 27210, 27233, 28601-28606 или их фрагментов или вариантов;

D) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 253 или 254;

E) гистоновую структуру «стебель-петля», выбранную из SEQ ID NO: 178 или 179;

F) поли(A)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов A, предпочтительно представляющую собой 3'-конец.

В других предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, содержит следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

A) структуру cap1, определенную в настоящем документе;

B) 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO:231 или 232;

C) кодирующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27118, 27141, 27164, 27187, 27210, 27233, 28601-28606 или их фрагментов или вариантов;

D) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 253 или 254;

F) поли(A)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов A, предпочтительно представляющую собой 3'-конец.

В особенно предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, содержит следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

A) структуру cap1, определенную в настоящем документе;

B) 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO:231 или 232;

C) кодирующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27118, 27141, 27164, 27187, 27210, 27233 или их фрагментов или вариантов;

D) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 253 или 254;

E) гистоновую структуру «стебель-петля», выбранную из SEQ ID NO: 178 или 179;

F) поли(A)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов A, предпочтительно представляющую собой 3'-конец.

В других предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, содержит следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

- А) структуру cap1, определенную в настоящем документе;
- В) 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO:231 или 232;
- С) кодирующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27118, 27141, 27164, 27187, 27210, 27233 или их фрагментов или вариантов;
- Д) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 253 или 254;
- Е) поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов А, предпочтительно представляющую собой 3'-конец.

В особенно предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, содержит следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

- А) структуру cap1, определенную в настоящем документе;
- В) 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO:231 или 232;
- С) кодирующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28590-28593, 28921-28924 или их фрагментов или вариантов;
- Д) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 253 или 254;
- Е) гистоновую структуру «стебель-петля», выбранную из SEQ ID NO: 178 или 179;
- Е) поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов А, предпочтительно представляющую собой 3'-конец.

В других предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, содержит следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

- А) структуру cap1, определенную в настоящем документе;
- В) 5'-UTR, полученную из гена HSD17B4, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO:231 или 232;

С) кодирующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28590-28593, 28921-28924 или их фрагментов или вариантов;

Д) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, определенную в настоящем документе, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 253 или 254;

Е) поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов А, предпочтительно представляющую собой 3'-конец.

Предпочтительные последовательности РНК, предпочтительно последовательности мРНК согласно настоящему изобретению, представлены в Таблице 2. Каждая строка в ней представляет конкретную подходящую конструкцию SARS-CoV-2 согласно настоящему изобретению, где описание конструкции остова SARS-CoV-2 указано в столбце А (ст. А) Таблицы 2, а соответствующие последовательности РНК, в частности, последовательности мРНК, содержащие предпочтительные кодирующие последовательности, представлены в столбцах С-Г (ст. С-Г). В Таблице 2а представлены последовательности РНК с HSD17B4/PSMB3-hSL-A100 (а-1). В Таблице 2b - с HSD17B4/PSMB3-A100 (а-1).

**Таблица 2а: Конструкции нуклеиновых кислот, предпочтительно мРНК, подходящие для вакцины**

Ст. А	Ст. В	Ст. С	Ст. D	Ст. Е	Ст. F	Ст. G
S_stab_PP(K986P_V987P_D614G)	22792, 28737	23536	23554	23572	23590	23608
S_stab_PP(K986P_V987P_A222V_D614G)	22794, 28738	23537	23555	23573	23591	23609
S_stab_PP(K986P_V987P_N439K_D614G)	22796, 28739	23538	23556	23574	23592	23610
S_stab_PP(K986P_V987P_S477N_D614G)	22798, 28740	23539	23557	23575	23593	23611
S_stab_PP(K986P_V987P_N501Y_D614G)	22800, 28741	23540	23558	23576	23594	23612
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_D614G)	22802, 28742	23541	23559	23577	23595	23613
S_stab_PP(K986P_V987P_Y453F_D614G)	22804, 28743	23542	23560	23578	23596	23614
S_stab_PP(K986P_V987P_D614G_I692V)	22806, 28744	23543	23561	23579	23597	23615
S_stab_PP(K986P_V987P_D614G_M122I)	22808, 28745	23544	23562	23580	23598	23616
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del)	22810,	23545	23563	23581	23599	23617

el_A222V_Y453F_S477N_D614G_I692V )	28746					
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y453F_D614G_I692V_M1229I)	22812, 28747	23546	23564	23582	23600	23618
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	23529, 28748	23547	23565	23583	23601	23619
S_stab_PP(K986P_V987P_K417N_E484K_N501Y_D614G)	23530, 28749	23548	23566	23584	23602	23620
S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_R246I_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	23531, 28750	23549	23567	23585	23603	23621
S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_D614G)	23532, 28751	23550	23568	23586	23604	23622
S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_T20N_P26S_D138Y_R190S_K417T_E484K_N501Y_D614G_H655Y_T1027I)	23533, 28752	23551	23569	23587	23605	23623
S_stab_PP(K986P_V987P_S13I_W152C_L452R_D614G)	23534, 28753	23552	23570	23588	23606	23624
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_E484K_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	27386, 28754	27409	27432	27455	27478	27501
S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	27387, 28755	27410	27433	27456	27479	27502
S_stab_PP(K986P_V987P_Q52R_A67V_H69del_V70del_Y144del_E484K_D614G_Q677H_F888L)	27388, 28756	27411	27434	27457	27480	27503
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_Y144del_E484K_D614G_Q677H_F888L)	27389, 28757	27412	27435	27458	27481	27504
S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_T20N_P26S_D138Y_R190S_K417T_E484K_N501Y_D614G_H655Y_T1027I_V1176F)	27390, 28758	27413	27436	27459	27482	27505
S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_D614G_V1176F)	27391, 28759	27414	27437	27460	27483	27506
S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_D614G_P681R)	27392, 28760	27415	27438	27461	27484	27507
S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484Q_D614G_P681R_Q1071H)	27393, 28761	27416	27439	27462	27485	27508
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del)	27394, 28762	27417	27440	27463	27486	27509

_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28762					
S_stab_PP(K986P_V987P_G75V_T76I_R246del_S247del_Y248del_L249del_T250del_P251del_G252del_L452Q_F490S_D614G_T859N)	27395, 28763	27418	27441	27464	27487	27510
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_N439K_D614G)	27396, 28764	27419	27442	27465	27488	27511
S_stab_PP(K986P_V987P_L5F_T95I_D253G_E484K_D614G_A701V)	27397, 28765	27420	27443	27466	27489	27512
S_stab_PP(K986P_V987P_L5F_T95I_D253G_S477N_D614G_Q957R)	27398, 28766	27421	27444	27467	27490	27513
S_stab_PP(K986P_V987P_F157L_V367F_Q613H_P681R)	27399, 28767	27422	27445	27468	27491	27514
S_stab_PP(K986P_V987P_S254F_D614G_P681R_G769V)	27400, 28768	27423	27446	27469	27492	27515
S_stab_PP(K986P_V987P_P26S_H69del_V70del_V126A_Y144del_L242del_A243del_L244del_H245Y_S477N_E484K_D614G_P681H_T1027I_D1118H)	27401, 28769	27424	27447	27470	27493	27516
S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144T_Y145S_ins145N_R346K_E484K_N501Y_D614G_P681H_D950N)	27402, 28770	27425	27448	27471	27494	27517
S_stab_PP(K986P_V987P_ins214TDR_Q414K_N450K_D614G_T716I)	27403, 28771	27426	27449	27472	27495	27518
S_stab_PP(K986P_V987P_T478K_D614G_P681H_T732A)	27404, 28772	27427	27450	27473	27496	27519
S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_N501Y_D614G_P681H_E1092K_H1101Y_V1176F)	27405, 28773	27428	27451	27474	27497	27520
S_stab_PP(K986P_V987P_H66D_G142V_Y144del_Y145del_D215G_V483A_D614G_H655Y_G669S_Q949R_N1187D)	27406, 28774	27429	27452	27475	27498	27521
S_stab_PP(K986P_V987P_Y144del_L452R_T478K_P681R)	27407, 28775	27430	27453	27476	27499	27522
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_Y144del_Y145del_L452R_T478K_D614G_P681R)	27408, 28776	27431	27454	27477	27500	27523
S_stab_PP(K986P_V987P_P9L_C136F_Y144del_R190S_D215G_L242del_A243del_Y449H_E484K_N501Y_D614G_H655Y_N679K_T716I_T859N)	28638, 28777					

S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v1)	28639, 28778					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_K417N_N440K_G446S_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v0)	28640, 28779					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_T95I_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_B.1.1.529)	28641, 28780					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19I_L24del_P25del_P26del_A27S_G142D_V213G_G339D_S371F_S373P_S375F_T376A_D405N_S477N_T478K_E484A_Q493R_Q498R_N501Y_Y505H_D614G_H655Y_N679K_P681H_D796Y_Q954H_N969K); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.2)	28642, 28781					
S_stab_PP(K986P_V987P_G75V_T76I_R246del_S247del_Y248del_L249del_T250del_P251del_G252del_D253N_L452Q_F490S_D614G_T859N)	28643, 28782					
S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144S_Y145N_R346K_E484K_N501Y_D614G_P681H_D950N)	28644, 28783					



S_stab_PP(K986P_V987P_S12F_H69del_V70del_W152R_R346S_L452R_D614G_Q677H_A899S)	28645, 28784					
S_stab_PP(K986P_V987P_I210T_N440K_E484K_D614G_D936N_S939F_T1027I)	28646, 28785					
S_stab_PP(K986P_V987P_W152L_E484K_D614G_G769V)	28647, 28786					
S_stab_PP(K986P_V987P_T20I_R357K_D614G)	28648, 28787					
S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144del_E484K_D614G_P681H_D796H)	28649, 28788					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28650, 28789					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28651, 28790					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28652, 28791					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28653, 28792					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28654, 28793					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28655, 28794					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484Q_D614G_P681R_D950N)	28656, 28795					
S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del)	28657, 28796					
S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484Q_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_Q1071H)	28658, 28797					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R)	28659, 28798					

_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)						
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28660, 28799					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28661, 28800					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28662, 28801					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28663, 28802					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28664, 28803					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28665, 28804					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484Q_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28666, 28805					
S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_E484K_D614G_P681R)	28667, 28806					
S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484K_D614G_P681R_Q1071H)	28668, 28807					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28669, 28808					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28670, 28809					

S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28671, 28810					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28672, 28811					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28673, 28812					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28674, 28813					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28675, 28814					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484K_D614G_P681R_D950N)	28676, 28815					
S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del)	28677, 28816					
S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_Q1071H)	28678, 28817					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28679, 28818					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28680, 28819					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28681, 28820					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28682, 28821					

G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)						
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28683, 28822					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28684, 28823					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28685, 28824					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28686, 28825					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_N440K_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v2)	28925, 28933					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v3)	28926, 28934					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_A701V_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F);	28927, 28935					

6K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v4)						
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_G446S_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v5)	28928, 28936					

***Таблица 2б: Конструкции нуклеиновых кислот, предпочтительно мРНК, подходящие для вакцины против коронавируса***

<b>Ст. А</b>	<b>Ст. В</b>	<b>Ст. С</b>	<b>Ст. D</b>	<b>Ст. Е</b>	<b>Ст. F</b>	<b>Ст. G</b>
S_stab_PP(K986P_V987P_D614G)	24838, 28827	24856	24874	24892	24910	24928
S_stab_PP(K986P_V987P_A222V_D614G)	24839, 28828	24857	24875	24893	24911	24929
S_stab_PP(K986P_V987P_N439K_D614G)	24840, 28829	24858	24876	24894	24912	24930
S_stab_PP(K986P_V987P_S477N_D614G)	24841, 28830	24859	24877	24895	24913	24931
S_stab_PP(K986P_V987P_N501Y_D614G)	24842, 28831	24860	24878	24896	24914	24932
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_D614G)	24843, 28832	24861	24879	24897	24915	24933
S_stab_PP(K986P_V987P_Y453F_D614G)	24844, 28833	24862	24880	24898	24916	24934
S_stab_PP(K986P_V987P_D614G_I692V)	24845, 28834	24863	24881	24899	24917	24935
S_stab_PP(K986P_V987P_D614G_M1229I)	24846, 28835	24864	24882	24900	24918	24936
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_A222V_Y453F_S477N_D614G_I692V)	24847, 28836	24865	24883	24901	24919	24937

2V)						
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y453F_D614G_I692V_M1229I)	24848, 28837	24866	24884	24902	24920	24938
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	24849, 28838	24867	24885	24903	24921	24939
S_stab_PP(K986P_V987P_K417N_E484K_N501Y_D614G)	24850, 28839	24868	24886	24904	24922	24940
S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_R246I_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	24851, 28840	24869	24887	24905	24923	24941
S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_D614G)	24852, 28841	24870	24888	24906	24924	24942
S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_T20N_P26S_D138Y_R190S_K417T_E484K_N501Y_D614G_H655Y_T1027I)	24853, 28842	24871	24889	24907	24925	24943
S_stab_PP(K986P_V987P_S13I_W152C_L452R_D614G)	24854, 28843	24872	24890	24908	24926	24944
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_E484K_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	27524, 28844	27547	27570	27593	27616	27639
S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	27525, 28845	27548	27571	27594	27617	27640
S_stab_PP(K986P_V987P_Q52R_A67V_H69del_V70del_Y144del_E484K_D614G_Q677H_F888L)	27526, 28846	27549	27572	27595	27618	27641
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_Y144del_E484K_D614G_Q677H_F888L)	27527, 28847	27550	27573	27596	27619	27642
S_stab_PP(K986P_V987P_L18F_T20N_	27528,	27551	27574	27597	27620	27643

P26S_D138Y_R190S_K417T_E484K_N 501Y_D614G_H655Y_T1027I_V1176F)	28848					
S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_D61 4G_V1176F)	27529, 28849	27552	27575	27598	27621	27644
S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_D614 G_P681R)	27530, 28850	27553	27576	27599	27622	27645
S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452 R_E484Q_D614G_P681R_Q1071H)	27531, 28851	27554	27577	27600	27623	27646
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157d el_R158del_L452R_T478K_D614G_P6 81R_D950N)	27532, 28852	27555	27578	27601	27624	27647
S_stab_PP(K986P_V987P_G75V_T76I_ R246del_S247del_Y248del_L249del_T2 50del_P251del_G252del_L452Q_F490S _D614G_T859N)	27533, 28853	27556	27579	27602	27625	27648
S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70 del_N439K_D614G)	27534, 28854	27557	27580	27603	27626	27649
S_stab_PP(K986P_V987P_L5F_T95I_D 253G_E484K_D614G_A701V)	27535, 28855	27558	27581	27604	27627	27650
S_stab_PP(K986P_V987P_L5F_T95I_D 253G_S477N_D614G_Q957R)	27536, 28856	27559	27582	27605	27628	27651
S_stab_PP(K986P_V987P_F157L_V367 F_Q613H_P681R)	27537, 28857	27560	27583	27606	27629	27652
S_stab_PP(K986P_V987P_S254F_D614 G_P681R_G769V)	27538, 28858	27561	27584	27607	27630	27653
S_stab_PP(K986P_V987P_P26S_H69de l_V70del_V126A_Y144del_L242del_A2 43del_L244del_H245Y_S477N_E484K_ D614G_P681H_T1027I_D1118H)	27539, 28859	27562	27585	27608	27631	27654
S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144T _Y145S_ins145N_R346K_E484K_N501 Y_D614G_P681H_D950N)	27540, 28860	27563	27586	27609	27632	27655

S_stab_PP(K986P_V987P_ins214TDR_Q414K_N450K_D614G_T716I)	27541, 28861	27564	27587	27610	27633	27656
S_stab_PP(K986P_V987P_T478K_D614G_P681H_T732A)	27542, 28862	27565	27588	27611	27634	27657
S_stab_PP(K986P_V987P_E484K_N501Y_D614G_P681H_E1092K_H1101Y_V1176F)	27543, 28863	27566	27589	27612	27635	27658
S_stab_PP(K986P_V987P_H66D_G142V_Y144del_Y145del_D215G_V483A_D614G_H655Y_G669S_Q949R_N1187D)	27544, 28864	27567	27590	27613	27636	27659
S_stab_PP(K986P_V987P_Y144del_L452R_T478K_P681R)	27545, 28865	27568	27591	27614	27637	27660
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_Y144del_Y145del_L452R_T478K_D614G_P681R)	27546, 28866	27569	27592	27615	27638	27661
S_stab_PP(K986P_V987P_P9L_C136F_Y144del_R190S_D215G_L242del_A243del_Y449H_E484K_N501Y_D614G_H655Y_N679K_T716I_T859N)	28687, 28867					
S S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v1)	28688, 28868					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F)	28689, 28869					



4del_Y145del_N211del_L212I_ins214E PE_G339D_S371L_S373P_S375F_K41 7N_N440K_G446S_S477N_T478K_E48 4A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y5 05H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P 681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_ N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v0)						
S_stab_PP(K986P_V987P_ A67V_T95I_G339D_S371L_S373P_S37 5F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G49 6S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D6 14G_H655Y_N679K_P681H_D796Y_N 856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_B.1.1.529)	28690, 28870					
S_stab_PP(K986P_V987P_ T19I_L24del_P25del_P26del_A27S_G1 42D_V213G_G339D_S371F_S373P_S3 75F_T376A_D405N_S477N_T478K_E4 84A_Q493R_Q498R_N501Y_Y505H_D 614G_H655Y_N679K_P681H_D796Y_ Q954H_N969K); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.2)	28691, 28871					
S_stab_PP(K986P_V987P_G75V_T76I_ R246del_S247del_Y248del_L249del_T2 50del_P251del_G252del_D253N_L452 Q_F490S_D614G_T859N)	28692, 28872					
S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144S _Y145N_R346K_E484K_N501Y_D614 G_P681H_D950N)	28693, 28873					
S_stab_PP(K986P_V987P_S12F_H69de l_V70del_W152R_R346S_L452R_D614 G_Q677H_A899S)	28694, 28874					

S_stab_PP(K986P_V987P_I210T_N440 K_E484K_D614G_D936N_S939F_T102 7I)	28695, 28875					
S_stab_PP(K986P_V987P_W152L_E48 4K_D614G_G769V)	28696, 28876					
S_stab_PP(K986P_V987P_T20I_R357K _D614G)	28697, 28877					
S_stab_PP(K986P_V987P_T95I_Y144d el_E484K_D614G_P681H_D796H)	28698, 28878					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142 D_E156G_F157del_R158del_L452R_T4 78K_D614G_P681R_D950N)	28699, 28879					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_ G142D_E156G_F157del_R158del_W25 8L_K417N_L452R_T478K_D614G_P68 1R_D950N)	28700, 28880					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F _G142D_E156G_F157del_R158del_A22 2V_K417N_L452R_T478K_D614G_P6 81R_D950N)	28701, 28881					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_ G142D_E156G_F157del_R158del_L452 R_T478K_D614G_P681R_D950N)	28702, 28882					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156 G_F157del_R158del_L452R_T478K_D 614G_P681R_D950N)	28703, 28883					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_ G142D_Y145H_E156G_F157del_R158d el_A222V_L452R_T478K_D614G_P68 1R_D950N)	28704, 28884					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452 R_E484Q_D614G_P681R_D950N)	28705, 28885					

S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del)	28706, 28886					
S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484Q_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_Q1071H)	28707, 28887					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28708, 28888					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28709, 28889					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28710, 28890					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28711, 28891					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28712, 28892					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28713, 28893					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28714, 28894					

G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28894					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484Q_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28715, 28895					
S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_E484K_D614G_P681R)	28716, 28896					
S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484K_D614G_P681R_Q1071H)	28717, 28897					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28718, 28898					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28719, 28899					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28720, 28900					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28721, 28901					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28722, 28902					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28723, 28903					

S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_Y145H_E156G_F157del_R158del_A222V_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_D950N)	28724, 28904					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452R_E484K_D614G_P681R_D950N)	28725, 28905					
S_stab_PP(K986P_V987P_L452R_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del)	28726, 28906					
S_stab_PP(K986P_V987P_E154K_L452R_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_Q1071H)	28727, 28907					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28728, 28908					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28729, 28909					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_W258L_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28730, 28910					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_V70F_G142D_E156G_F157del_R158del_A222V_K417N_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682del_R683del_A684del_R685del_D950N)	28731, 28911					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_G142D_E156G_F157del_R158del_L452R_T478K_E484K_D614G_P681R_R682	28732, 28912					

del_R683del_A684del_R685del_D950N )						
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_E156 G_F157del_R158del_L452R_T478K_E4 84K_D614G_P681R_R682del_R683del_ A684del_R685del_D950N)	28733, 28913					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_T95I_ G142D_Y145H_E156G_F157del_R158d el_A222V_L452R_T478K_E484K_D61 4G_P681R_R682del_R683del_A684del_ R685del_D950N)	28734, 28914					
S_stab_PP(K986P_V987P_T19R_L452 R_E484K_D614G_P681R_R682del_R6 83del_A684del_R685del_D950N)	28735, 28915					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69d el_V70del_T95I_G142D_V143del_Y14 4del_Y145del_N211del_L212I_ins214E PE_G339D_S371L_S373P_S375F_N44 0K_ S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_ Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G _H655Y_N679K_P681H_N764K_D796 Y_N856K_Q954H_N969K_L981F);S_st ab_PP(K986P_V987P_BA.1_v2)	28929, 28937					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69d el_V70del_T95I_G142D_V143del_Y14 4del_Y145del_N211del_L212I_ins214E PE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477 N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q49 8R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H6 55Y_N679K_P681H_D796Y_N856K_Q 954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v3)	28930, 28938					

S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N701V_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v4)	28931, 28939					
S_stab_PP(K986P_V987P_A67V_H69del_V70del_T95I_G142D_V143del_Y144del_Y145del_N211del_L212I_ins214EPE_G339D_S371L_S373P_S375F_G446S_S477N_T478K_E484A_Q493R_G496S_Q498R_N501Y_Y505H_T547K_D614G_H655Y_N679K_P681H_N764K_D796Y_N856K_Q954H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V987P_BA.1_v5)	28932, 28940					

В некоторых воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 148, 149, 151, 162, 163, 165, 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 22819, 22821, 22823, 22825, 22827, 22829, 22831, 22833, 22835, 22837, 22839, 23309-23368, 23370-23404, 23529-23588, 23590-23624, 24837-24944, 27248-27907, 28638-28915, 28925-28940, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые (m1 $\psi$ ) нуклеотиды.

В некоторых воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%

или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO, представленных в столбцах B-G Таблицы 2a или Таблицы 2b, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые (m1 $\psi$ ) нуклеотиды.

В некоторых воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27256, 27279, 27302, 27325, 27348, 27371, 27394, 27417, 27440, 27463, 27486, 27509, 27532, 27555, 27578, 27601, 27624, 27647, 27688, 27729, 27770, 27811, 27852, 27893, 28650-28655, 28699-28704, 28762, 28789-28794, 28852, 28879-28884, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые (m1 $\psi$ ) нуклеотиды.

В некоторых воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27256, 27279, 27302, 27325, 27348, 27371, 27394, 27417, 27440, 27463, 27486, 27509, 27532, 27555, 27578, 27601, 27624, 27647, 27688, 27729, 27770, 27811, 27852, 27893, 28762, 28852, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые (m1 $\psi$ ) нуклеотиды.

В некоторых воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28639-28642, 28778-28781, 28688-28691, 28868-28871, 28925-



28940, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. В некоторых воплощениях по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые (m1 $\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23529-23534, 27386-27408, 23535-23552, 27409-27431, 23590-23606, 27478-27500, 28736-28776, 28638-28686, 28777-28825, 28925-28928, 28933-28936, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей. Дополнительная информация относительно соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот представлена под идентификатором <223> соответствующей SEQ ID NO в перечне последовательностей, а также в Таблице 2 (см., в частности, столбцы B-G).

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, 28650-28655, 28789-28794, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной

из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28639-28642, 28778-28781, 28925-28928, 28933-28936, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24837-24854, 27524-27546, 24855-24872, 27547-27569, 24909-24926, 27616-27638, 28827-28866, 28687-28735, 28867-28915, 28929-28932, 28937-28940, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, 28699-28704, 28879-28884, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28688-28691, 28868-28871, 28929-28932, 28937-28940, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23529-23534, 27386-27408, 23535-23552, 27409-27431,

23590-23606, 27478-27500, 28736-28776, 28638-28686, 28777-28825, 28925-28928, 28933-28936, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей, где по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые ( $m1\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, 28650-28655, 28789-28794, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей, где по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые ( $m1\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей, где по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые ( $m1\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28639-28642, 28778-28781, 28925-28928, 28933-28936, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей, где по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые ( $m1\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24837-24854, 27524-27546, 24855-24872, 27547-27569, 24909-24926, 27616-27638, 28827-28866, 28687-28735, 28867-28915, 28929-28932, 28937-28940, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей, где по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые (m1 $\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, 28699-28704, 28879-28884, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей, где по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые (m1 $\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей, где по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые (m1 $\psi$ ) нуклеотиды.

В предпочтительных воплощениях РНК, предпочтительно мРНК, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28688-28691, 28868-28871, 28929-28932, 28937-

28940, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей, где по меньшей мере один, предпочтительно все урациловые нуклеотиды в указанных последовательностях РНК заменены на псевдоуридиновые ( $\psi$ ) нуклеотиды и/или N1-метилпсевдоуридиновые ( $m1\psi$ ) нуклеотиды.

В конкретных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению может быть получена с применением любого способа, известного в данной области техники, включая химический синтез, такой как, например, твердофазный синтез РНК, а также способы *in vitro*, такие как реакции транскрипции РНК *in vitro*. Соответственно, в предпочтительном воплощении РНК получают путем транскрипции РНК *in vitro*.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой РНК, полученную путем транскрипции *in vitro*.

Термины «транскрипция РНК *in vitro*» или «транскрипция *in vitro*» относятся к процессу, при котором РНК синтезируют в бесклеточной системе (*in vitro*). РНК может быть получена путем ДНК-зависимой транскрипции *in vitro* соответствующей ДНК-матрицы, которая согласно настоящему изобретению представляет собой линеаризованную плазмидную ДНК-матрицу или амплифицированную с помощью ПЦР ДНК-матрицу. Промотор для регулирования транскрипции РНК *in vitro* может представлять собой любой промотор для любой ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Конкретными примерами ДНК-зависимых РНК-полимераз являются РНК-полимеразы T7, T3, SP6 или Syn5. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения ДНК-матрицу линеаризуют с помощью подходящего фермента рестрикции перед проведением транскрипции РНК *in vitro*.

Реагенты, применяемые для транскрипции РНК *in vitro*, как правило, включают: ДНК-матрицу (линеаризованную плазмидную ДНК или продукт ПЦР) с промоторной последовательностью, обладающей высокой аффинностью связывания с соответствующей РНК-полимеразой, такой как РНК-полимеразы, кодируемые бактериофагами (T7, T3, SP6 или Syn5); рибонуклеотидтрифосфаты (NTP) для четырех оснований (аденин, цитозин, гуанин и урацил); возможно, аналог кэпа, определенный в настоящем документе; возможно, дополнительно модифицированные нуклеотиды, определенные в настоящем документе; ДНК-зависимую РНК-полимеразу, способную связываться с промоторной последовательностью в ДНК-матрице (например, РНК-полимеразу T7, T3, SP6 или Syn5); возможно, ингибитор рибонуклеазы (РНКазы) для

инактивации любой потенциально присутствующей в виде примеси РНКазы; возможно, пирофосфатазу для расщепления пирофосфата, который может ингибировать транскрипцию РНК *in vitro*;  $MgCl_2$ , который обеспечивает ионы  $Mg^{2+}$ , выполняющие функцию кофактора полимеразы; буфер (TRIS или HEPES) для поддержания подходящего значения pH, который также может содержать антиоксиданты (например, DTT) и/или полиамины, такие как спермидин, в оптимальных концентрациях, например, буферную систему, содержащую TRIS-цитрат, описанную в источнике WO2017/109161.

В предпочтительных воплощениях структуру cap1 РНК согласно настоящему изобретению получают с помощью котранскрипционного кэпирования с применением тринуклеотидных аналогов кэпа  $m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG$  или  $m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG$ . Предпочтительным аналогом cap1, который может быть подходящим образом применен для получения кодирующей РНК согласно настоящему изобретению, является  $m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG$ .

В особенно предпочтительном воплощении структуру cap1 РНК согласно настоящему изобретению получают с помощью котранскрипционного кэпирования с применением тринуклеотидного аналога кэпа  $3'OMe-m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG$ .

В других воплощениях структуру cap0 РНК согласно настоящему изобретению получают с помощью котранскрипционного кэпирования с применением аналога кэпа  $3'OMe-m7G(5')ppp(5')G$ .

В дополнительных воплощениях смесь нуклеотидов, применяемая при транскрипции РНК *in vitro*, может дополнительно содержать модифицированные нуклеотиды, определенные в настоящем документе. В этом контексте предпочтительные модифицированные нуклеотиды могут быть выбраны из псевдоуридина ( $\psi$ ), N1-метилпсевдоуридина ( $m1\psi$ ), 5-метилцитозина и 5-метоксиуридина. В конкретных воплощениях урациловые нуклеотиды в смеси нуклеотидов заменены (частично или полностью) на псевдоурин ( $\psi$ ) и/или N1-метилпсевдоурин ( $m1\psi$ ) с получением модифицированной РНК.

В предпочтительных воплощениях смесь нуклеотидов, применяемая при транскрипции РНК *in vitro*, не содержит модифицированных нуклеотидов, определенных в настоящем документе. В предпочтительных воплощениях смесь нуклеотидов, применяемая при транскрипции РНК *in vitro*, содержит только

нуклеотиды G, C, A и U и, возможно, аналог кэпа, определенный в настоящем документе.

В предпочтительных воплощениях смесь нуклеотидов (то есть доля каждого нуклеотида в смеси), применяемая для реакций транскрипции РНК *in vitro*, может быть оптимизирована для данной последовательности РНК, предпочтительно, как описано в источнике WO2015/188933, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В этом контексте транскрипцию *in vitro* проводили в присутствии оптимизированной для последовательности смеси нуклеотидов и, возможно, аналога кэпа, предпочтительно при этом оптимизированная для последовательности смесь нуклеотидов не содержала химически модифицированных нуклеотидов.

В этом контексте оптимизированная для последовательности смесь нуклеозидтрифосфатов (NTP) представляет собой смесь нуклеозидтрифосфатов (NTP) для применения в реакции транскрипции *in vitro* молекулы РНК с заданной последовательностью, состоящую из четырех нуклеозидтрифосфатов (NTP): GTP, ATP, CTP и UTP, где доля каждого из четырех нуклеозидтрифосфатов (NTP) в оптимизированной для последовательности смеси нуклеозидтрифосфатов (NTP) соответствует доле соответствующего нуклеотида в указанной молекуле РНК. Если рибонуклеотид отсутствует в молекуле РНК, соответствующий нуклеозидтрифосфат также отсутствует в оптимизированной для последовательности смеси нуклеозидтрифосфатов (NTP).

В воплощениях, в которых необходимо получить более одной различных РНК, определенных в настоящем документе, например, когда необходимо получить 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более различных РНК (см. второй аспект), могут быть подходящим образом применены процедуры, описанные в источнике WO2017/109134.

В контексте получения вакцин на основе РНК может потребоваться обеспечить нуклеиновые кислоты, соответствующие требованиям GMP, например, РНК, соответствующую требованиям GMP. РНК, соответствующая требованиям GMP, может быть получена с применением способа производства, одобренного регулирующими органами. Соответственно, в особенно предпочтительном воплощении получение РНК осуществляется в соответствии с действующей надлежащей производственной практикой (GMP) с осуществлением различных стадий контроля качества на уровне ДНК (матрицы) и РНК, предпочтительно в соответствии с WO2016/180430. В

предпочтительных воплощениях РНК согласно настоящему изобретению представляет собой РНК, соответствующую требованиям GMP, в частности, мРНК, соответствующую требованиям GMP. Соответственно, РНК для вакцины предпочтительно представляет собой РНК, соответствующую требованиям GMP.

Полученные продукты РНК предпочтительно очищают с помощью PureMessenger® (CureVac, Тюбинген, Германия; RP-HPLC (обращенно-фазовая жидкостная хроматография) в соответствии с WO2008/077592), и/или тангенциальной проточной фильтрации (как описано в источнике WO2016/193206), и/или очистки на смоле oligo d(T) (см. WO2016/180430).

В другом предпочтительном воплощении РНК подвергают лиофильной сушке (например, в соответствии с WO2016/165831 или WO2011/069586, полное содержание обеих указанных заявок РСТ включено в настоящий документ посредством ссылки) с получением термостабильной высушенной РНК (порошка). РНК также может быть высушена с помощью распылительной сушки или распылительной сушки вымораживанием (например, согласно WO2016/184575 или WO2016/184576) с получением термостабильной РНК (порошка), определенной в настоящем документе. Соответственно, в контексте производства и очистки нуклеиновой кислоты, в частности, РНК, изобретения WO2017/109161, WO2015/188933, WO2016/180430, WO2008/077592, WO2016/193206, WO2016/165831, WO2011/069586, WO2016/184575 и WO2016/184576 включены в настоящий документ посредством ссылки.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях РНК представляет собой высушенную РНК.

Термин «высушенная РНК», используемый в настоящем документе, следует понимать как РНК, которая подвергнута лиофильной сушке, или распылительной сушке, или распылительной сушке вымораживанием, как определено выше, с получением термостабильной высушенной РНК (порошка).

В предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению представляет собой очищенную нуклеиновую кислоту, в частности, очищенную РНК.

Термин «очищенная нуклеиновая кислота», используемый в настоящем документе, следует понимать как нуклеиновую кислоту, которая после определенных стадий очистки имеет более высокую степень чистоты, чем исходный материал. Типичные примеси, которые по существу отсутствуют в очищенной нуклеиновой



кислоте, включают пептиды или белки, спермидин, BSA (бычий сывороточный альбумин), прерванные последовательности нуклеиновых кислот, фрагменты нуклеиновых кислот, свободные нуклеотиды, бактериальные примеси или примеси, полученные в результате процедур очистки. Соответственно, в этом отношении желательно, чтобы «степень чистоты нуклеиновой кислоты» была как можно более близка к 100%. В отношении степени чистоты нуклеиновой кислоты также желательно, чтобы количество полноразмерной нуклеиновой кислоты было как можно более близко к 100%. Соответственно, «очищенная нуклеиновая кислота» в настоящем документе имеет степень чистоты более 75%, 80%, 85%, более конкретно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, и наиболее предпочтительно 99% или более. Степень чистоты может быть определена, например, с помощью аналитической HPLC, где приведенные выше проценты соответствуют отношению между площадью пика целевой нуклеиновой кислоты и общей площадью всех пиков, отражающей присутствие побочных продуктов. В качестве альтернативы, степень чистоты может быть определена, например, с помощью аналитического электрофореза в агарозном геле или капиллярного гель-электрофореза.

В предпочтительных воплощениях нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению представляет собой очищенную РНК.

Термин «очищенная РНК» или «очищенная мРНК», используемый в настоящем документе, следует понимать как РНК, которая после определенных стадий очистки (например, HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография), TFF (тонкопленочный фильтр), очистки на смоле Oligo d(T), стадий осаждения) имеет более высокую степень чистоты, чем исходный материал (например, РНК, полученная путем транскрипции *in vitro*). Типичные примеси, которые по существу отсутствуют в очищенной РНК, включают пептиды или белки (например, ферменты, присутствие которых обусловлено проведением ДНК-зависимой транскрипции РНК *in vitro*, например, РНК-полимеразы, РНКазы, пирофосфатазы, эндонуклеазы рестрикции, ДНКазы), спермидин, BSA, прерванные последовательности РНК, фрагменты РНК (короткие фрагменты двухцепочечной РНК, прерванные последовательности и так далее), свободные нуклеотиды (модифицированные нуклеотиды, обычные NTP, аналог кэпа), фрагменты матричной ДНК, компоненты буфера (HEPES, TRIS, MgCl<sub>2</sub>) и так далее. Другие потенциальные примеси, присутствие которых может быть обусловлено, например, проведением процедур ферментации, включают бактериальные примеси

(микробиологическая нагрузка, бактериальная ДНК) или примеси, присутствие которых обусловлено процедурами очистки (органические растворители и так далее). Соответственно, в этом отношении желательно, чтобы «степень чистоты РНК» была как можно более близка к 100%. В отношении степени чистоты РНК также желательно, чтобы количество полноразмерных РНК-транскриптов было как можно более близко к 100%. Соответственно, «очищенная РНК» в настоящем документе имеет степень чистоты более 75%, 80%, 85%, более конкретно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, и наиболее предпочтительно 99% или более. Степень чистоты может быть определена, например, с помощью аналитической HPLC, где приведенные выше проценты соответствуют отношению между площадью пика целевой РНК и общей площадью всех пиков, отражающей присутствие побочных продуктов. В качестве альтернативы, степень чистоты может быть определена, например, с помощью аналитического электрофореза в агарозном геле или капиллярного гель-электрофореза.

В особенно предпочтительных воплощениях РНК очищают с помощью RP-HPLC и/или TFF с удалением двухцепочечной РНК, некэпированной РНК и/или фрагментов РНК.

Образование двухцепочечной РНК в качестве побочного продукта, например, во время транскрипции РНК *in vitro*, может привести к индукции врожденного иммунного ответа, в частности, IFN-альфа, который является основным фактором, вызывающим лихорадку у вакцинированных субъектов, что, безусловно, является нежелательным побочным эффектом. Для обнаружения и определения размера видов дцРНК в смеси нуклеиновых кислот применяют современные методики иммуноблоттинга дцРНК (например, посредством дот-блоттинга, серологически специфичной электронной микроскопии (SSEM) или ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ)).

Соответственно, РНК согласно настоящему изобретению очищают с помощью RP-HPLC и/или TFF, как описано в настоящем документе, с уменьшением количества дцРНК.

Предпочтительно РНК согласно настоящему изобретению очищают с помощью RP-HPLC, предпочтительно с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления (RP-HPLC) на колонке с макропористым сорбентом на основе стирола/дивинилбензола (например, размер частиц 30 мкм, размер пор 4000 Å (0,4 мкм)) и дополнительно с помощью кассетного фильтра с мембраной на основе целлюлозы, имеющего отсечение по молекулярной массе примерно 100 кДа.

В этом контексте особенно предпочтительно, чтобы очищенная РНК была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF, что обеспечивает примерно на 5%, 10% или 20% меньше побочных продуктов в виде двухцепочечной РНК по сравнению с РНК, которая не была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF. Соответственно, РНК согласно настоящему изобретению содержит примерно на 5%, 10% или 20% меньше побочных продуктов в виде двухцепочечной РНК, чем РНК, которая не была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF.

В качестве альтернативы, очищенная РНК, которая была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF, содержит примерно на 5%, 10% или 20% меньше побочных продуктов в виде двухцепочечной РНК, чем РНК, которая была очищена с помощью очистки на смоле Oligo dT, осаждения, фильтрации и/или анионообменной хроматографии. Соответственно, очищенная с помощью RP-HPLC и/или TFF РНК согласно настоящему изобретению содержит примерно на 5%, 10% или 20% меньше побочных продуктов в виде двухцепочечной РНК, чем РНК, которая была очищена с помощью очистки на смоле Oligo dT, осаждения, фильтрации и /или АЕХ.

В воплощениях для получения и очистки нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть применено автоматизированное устройство для проведения транскрипции РНК *in vitro*. Такое устройство также может быть применено для получения композиции или вакцины (см. аспекты 2 и 3). Предпочтительно может быть подходящим образом применено устройство, описанное в источнике WO2020/002598 (полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки), в частности, устройство, описанное в пунктах формулы изобретения 1-59 и/или 68-76 WO2020/002598 (и на фигурах 1-18).

Описанные в настоящем документе способы предпочтительно могут относиться к способу получения композиции или вакцины на основе РНК, более подробно описанному ниже.

### **Композиция, фармацевтическая композиция**

**Второй аспект** относится к композиции, содержащей по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту.

При этом, воплощения, относящиеся к композиции согласно второму аспекту, также могут быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения вакцины согласно третьему аспекту. Также воплощения, относящиеся к вакцине согласно третьему аспекту, равным образом могут быть истолкованы и поняты как подходящие

воплощения композиции согласно второму аспекту (содержащей по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту). Кроме того, признаки и воплощения, описанные в контексте первого аспекта (РНК согласно настоящему изобретению), должны быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения композиции согласно второму аспекту.

В предпочтительных воплощениях композиция содержит по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, который представляет собой шиповидный белок SARS-CoV-2 или получен из него, или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант.

В предпочтительных воплощениях композиция содержит по меньшей мере одну РНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из шиповидного белка SARS-CoV-2, или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, согласно первому аспекту, где указанную композицию предпочтительно следует вводить внутримышечно или внутрикожно.

Предпочтительно внутримышечное или внутрикожное введение композиции приводит к экспрессии конструкции кодируемого шиповидного белка SARS-CoV-2 у субъекта. В предпочтительных воплощениях введение композиции приводит к трансляции РНК и продукции кодируемого шиповидного белка SARS-CoV-2 у субъекта.

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту является подходящей для вакцины, в частности, подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, предпочтительно вакцины против SARS-CoV-2, действующей против по меньшей мере одного из следующих изолятов SARS-CoV-2: С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), P.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), P.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), P.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

В особенно предпочтительных воплощениях композиция согласно второму аспекту является подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, действующей против В.1.351 (Бета, Южная Африка).

В особенно предпочтительных воплощениях композиция согласно второму аспекту является подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, действующей против В.1.617.2, AY.1, AY.2, AY.4 или AY.4.2.

В особенно предпочтительных воплощениях композиция согласно второму аспекту является подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, действующей против В.1.617.2.

В особенно предпочтительных воплощениях композиция согласно второму аспекту является подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, действующей против В.1.1.529, В.1.1.529.1/BA.1 (Омикрон) и/или В.1.1.529.2/BA.2.

В особенно предпочтительных воплощениях композиция согласно второму аспекту является подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, действующей против BA.1\_v1, BA.1\_v0, В.1.1.529, BA.2, BA.1\_v2, BA.1\_v3, BA.1\_v4 и/или BA.1\_v5.

В особенно предпочтительных воплощениях композиция согласно второму аспекту является подходящей для вакцины против SARS-CoV-2, действующей против В.1.1.529 и В.1.617.2.

В контексте настоящего изобретения термин «композиция» относится к любому типу композиции, в которую могут быть включены указанные ингредиенты (например, РНК, кодирующая по меньшей мере один антигенный пептид или белок, выбранный или полученный из SARS-CoV-2, например, в сочетании с носителем на липидной основе), возможно, совместно с любыми дополнительными компонентами, обычно совместно с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Композиция может представлять собой сухую композицию, такую как порошок или гранулы, или твердую стандартную форму, такую как лиофилизованная форма. В качестве альтернативы, композиция может быть представлена в жидкой форме, и каждый компонент может быть независимо включен в растворенной или диспергированной (например, суспендированной или эмульгированной) форме.

В предпочтительном воплощении второго аспекта композиция содержит по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту и, возможно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый эксципиент», используемый в настоящем документе, предпочтительно включает жидкую или нежидкую основу композиции для введения. Если композиция представлена в жидкой форме, носитель может представлять собой воду, например, апиrogenную воду; изотонический солевой раствор или буферные (водные) растворы, то есть фосфатные, цитратные и так далее буферные растворы. Может быть применена вода или предпочтительно буфер, более предпочтительно водный буфер, содержащий натриевую соль, предпочтительно по меньшей мере 50 мМ натриевой соли, кальциевую соль, предпочтительно по меньшей мере 0,01 мМ кальциевой соли и, возможно, калиевую соль, предпочтительно по меньшей мере 3 мМ калиевой соли. Согласно предпочтительным воплощениям соли натрия, кальция и, возможно, калия могут присутствовать в форме их галогенидов, например хлоридов, иодидов или бромидов, в форме их гидроксидов, карбонатов, гидрокарбонатов или сульфатов и так далее. Примеры солей натрия включают NaCl, NaI, NaBr, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, примеры возможных солей калия включают KCl, KI, KBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и примеры солей кальция включают CaCl<sub>2</sub>, CaI<sub>2</sub>, CaBr<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>.

Кроме того, в буфере могут присутствовать органические анионы упомянутых выше катионов. Соответственно, в воплощениях композиция нуклеиновой кислоты может содержать фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты с применением одного или более фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов, например, для повышения стабильности, усиления трансфекции клеток, обеспечения пролонгированного или отсроченного эффекта, усиления трансляции кодируемого белка коронавируса *in vivo* и/или изменения профиля высвобождения кодируемого белка коронавируса *in vivo*. Помимо общепринятых эксципиентов, таких как любые возможные растворители, дисперсионные среды, разбавители или другие жидкие переносящие среды, диспергирующие или суспендирующие добавки, поверхностно-активные агенты, изотонические агенты, загущающие или эмульгирующие агенты, консерванты, эксципиенты согласно настоящему изобретению могут включать, без ограничения, липидоиды, липосомы, липидные наночастицы, полимеры, липоплексы, наночастицы типа ядро-оболочка, пептиды, белки, клетки, трансфицированные полинуклеотидами, гиалуронидазу, миметики наночастиц и их комбинации. В воплощениях также могут быть применены один или более совместимых твердых или жидких наполнителей, или разбавителей, или

инкапсулирующих соединений, которые подходят для введения субъекту. Термин «совместимый», используемый в настоящем документе, означает, что компоненты композиции могут быть смешаны по меньшей мере с одной нуклеиновой кислотой и, возможно, множеством нуклеиновых кислот в композиции таким образом, что не происходит взаимодействия, которое будет существенно снижать биологическую активность или фармацевтическую эффективность композиции в типичных условиях применения (например, при внутримышечном или внутрикожном введении). Фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты должны иметь достаточно высокую чистоту и достаточно низкую токсичность, чтобы являться подходящими для введения субъекту, подлежащему воздействию. Соединения, которые могут быть применены в качестве фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов, могут представлять собой сахара, такие как, например, лактоза, глюкоза, трегалоза, манноза и сахароза; крахмалы, такие как, например, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; декстрозу; целлюлозу и ее производные, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза, ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; талловый жир; твердые скользкие вещества, такие как, например, стеариновая кислота, стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие как, например, арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао; многоатомные спирты, такие как, например, полипропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгиновую кислоту.

Указанный по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент композиции предпочтительно может быть выбран таким образом, чтобы являться подходящим для внутримышечной или внутрикожной доставки/введения указанной композиции. Соответственно, композиция предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию, в подходящем случае композицию для внутримышечного введения.

Субъекты, которым предполагается введение композиций, предпочтительно фармацевтической композиции, включают, но не ограничиваются ими, людей и/или других приматов; млекопитающих, включая имеющих экономическое значение млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, мыши и/или крысы; и/или птицы, включая имеющих экономическое значение птиц, таких как домашняя птица, куры, утки, гуси и/или индейки.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть надлежащим образом стерильными и/или апирогенными.

Поливалентные композиции согласно настоящему изобретению:

В воплощениях композиция (например, поливалентная композиция), определенная в настоящем документе, может содержать множество или по меньшей мере более одного из видов РНК, определенных в контексте первого аспекта настоящего изобретения. Предпочтительно композиция, определенная в настоящем документе, может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных видов РНК, каждый из которых определен в контексте первого аспекта.

В воплощениях композиция (например, поливалентная композиция) содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более различных видов РНК, определенных в контексте первого аспекта, каждый из которых кодирует по меньшей мере один отличный от других шиповидный белок SARS-CoV-2 (определенный в контексте первого аспекта).

В этом контексте также предпочтительно, чтобы различные шиповидные белки SARS-CoV-2 или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки имели изменения аминокислот в шиповидном белке, включающие:

- K986, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F;

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F;

- K986P, V987P, A67V, T95I, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F;

- K986P, V987P, T19I, L24del, P25del, P26del, A27S, G142D, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, D405N, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, D796Y, Q954H и N969K;

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, N440K, S477N, T478K,



E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F;

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F;

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, A701V, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F;

- K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F;

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V;

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V;

- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y и T1027I;

- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y, T1027I и V1176F;

- L452R, P681R и D614G;

- L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H; или

- L452R, P681R, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N.

В этом контексте еще более предпочтительно, чтобы различные шиповидные белки SARS-CoV-2 или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки имели изменения аминокислот в шиповидном белке, включающие:

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V; или

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V.

В этом контексте еще более предпочтительно, чтобы различные шиповидные белки SARS-CoV-2 или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки имели изменения аминокислот в шиповидном белке, включающие:

по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок, имеющий следующие изменения аминокислот в шиповидном белке:

K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F; и

по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок, имеющий следующие изменения аминокислот в шиповидном белке:

L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H; или

L452R, P681R, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N.

В предпочтительных воплощениях композиция (например, поливалентная композиция) содержит 2, 3, 4 или 5 видов РНК, где указанные виды РНК содержат или состоят из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23529-23534, 27386-27408, 23535-23552, 27409-27431, 23590-23606, 27478-27500, 28736-28776, 28638-28686, 28777-28825, 28925-28928, 28933-28936, и, возможно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, где каждый из 2, 3, 4 или 5 видов нуклеиновых кислот кодирует отличный от других шиповидный белок SARS-CoV-2.

В предпочтительных воплощениях композиция (например, поливалентная композиция) содержит 2, 3, 4 или 5 видов РНК, где указанные виды РНК содержат или состоят из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24837-24854, 27524-27546, 24855-24872, 27547-27569, 24909-24926, 27616-27638, 28827-28866, 28687-28735, 28867-28915, 28937-28940,

и, возможно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, где каждый из 2, 3, 4 или 5 видов нуклеиновых кислот кодирует отличный от других шиповидный белок SARS-CoV-2.

Далее представлены особенно предпочтительные воплощения поливалентной композиции.

В предпочтительных воплощениях поливалентная композиция содержит один вид РНК, содержащий кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 10, где поливалентная композиция дополнительно содержит по меньшей мере 2, 3, 4 дополнительных вида РНК, выбранных из

1) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27108-27109; и/или

2) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22960-22961, 28540; и/или

3) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27093-27095, 28552-28558; и/или

4) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27096, 28545; и/или

5) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по

меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22959; и/или

б) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27095, 28552-28558; и/или

7) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27095; и/или

8) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920.

В предпочтительных воплощениях поливалентная композиция содержит один вид РНК, содержащий кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27093-27095, 28552-28558, где поливалентная композиция дополнительно содержит по меньшей мере 2, 3, 4 дополнительных вида РНК, выбранных из

1) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27108-27109; и/или

2) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22960-22961, 28540; и/или

3) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 10; и/или

4) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27096, 28545; и/или

5) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22959; и/или

6) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920.

В предпочтительных воплощениях поливалентная композиция содержит один вид РНК, содержащий кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27095, 28552-28558, где поливалентная композиция дополнительно содержит по меньшей мере 2, 3, 4 дополнительных вида РНК, выбранных из

1) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27108-27109; и/или

2) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22960-22961, 28540; и/или

3) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 10; и/или

4) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27096, 28545; и/или

5) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22959; и/или

6) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920.

В предпочтительных воплощениях поливалентная композиция содержит один вид РНК, содержащий кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27095, где поливалентная композиция дополнительно содержит по меньшей мере 2, 3, 4 дополнительных вида РНК, выбранных из

1) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27108-27109; и/или

2) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22960-22961, 28540; и/или

3) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 10; и/или

4) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27096, 28545; и/или

5) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22959; и/или

6) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920.

В предпочтительных воплощениях поливалентная композиция содержит один вид РНК, содержащий кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22960-22961, 28540, где поливалентная композиция дополнительно содержит по меньшей мере 2, 3, 4 дополнительных вида РНК, выбранных из

1) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27108-27109; и/или

2) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 10; и/или

3) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27093-27095, 28552-28558; и/или

4) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27096, 28545; и/или

5) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22959; и/или

б) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27095, 28552-28558; и/или

7) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27095; и/или

8) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,



95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920.

В предпочтительных воплощениях поливалентная композиция содержит один вид РНК, содержащий кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920, где поливалентная композиция дополнительно содержит по меньшей мере 2, 3, 4 дополнительных вида РНК, выбранных из

1) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27108-27109; и/или

2) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 10; и/или

3) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27093-27095, 28552-28558; и/или

4) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27096, 28545; и/или

5) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22959; и/или

6) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27095, 28552-28558; и/или

7) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27095; и/или

8) одного вида РНК, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22960-22961, 28540.

В предпочтительных воплощениях композиция, предпочтительно поливалентная композиция, является подходящей для вакцины против С.1.2 (Южная Африка), В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), С.36.3 (Таиланд), В.1.619 (Камерун), R.1 (Кентукки, США), В.1.1.176 (Канада), AZ.3, AY.1 (Индия), AY.2 (Индия), AY.4 (Индия), AY.4.2 (Дельта плюс, Индия), В.1.617.3 (Индия), В.1.351 (Бета, Южная Африка), В.1.1.7 (Альфа, Великобритания), Р.1 (Гамма, Бразилия), В.1.427/В.1.429 (Эпсилон, Калифорния, США), В.1.525 (Эта, Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Йота, Нью-Йорк, США), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Каппа, Индия), В.1.617.2 (Дельта, Индия), Р.2 (Дзета, Бразилия), С37.1 (Лямбда, Перу), Р.3 (Тета, Филиппины) и/или В.1.621 (Мю, Колумбия).

В воплощениях РНК, содержащуюся в композиции, обеспечивают в количестве от примерно 100 нг до примерно 500 мкг, в количестве от примерно 1 мкг до примерно 200 мкг, в количестве от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг, в количестве от примерно 5 мкг до примерно 100 мкг, предпочтительно в количестве от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг, в частности, в количестве примерно 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг, 10 мкг, 11 мкг, 12 мкг, 13 мкг, 14 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 55 мкг, 60 мкг, 65 мкг, 70 мкг, 75 мкг, 80 мкг, 85 мкг, 90 мкг, 95 мкг или 100 мкг.

В случае, если композиция содержит множество или по меньшей мере более одного из видов РНК, определенных в настоящем документе (поливалентная композиция), количество РНК для каждого вида РНК обеспечивают в количестве от примерно 100 нг до примерно 500 мкг, в количестве от примерно 1 мкг до примерно 200 мкг, в количестве от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг, в количестве от примерно 5 мкг до примерно 100 мкг, предпочтительно в количестве от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг, в частности, в количестве примерно 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг, 10 мкг, 11 мкг, 12 мкг, 13 мкг, 14 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 55 мкг, 60 мкг, 65 мкг, 70 мкг, 75 мкг, 80 мкг, 85 мкг, 90 мкг, 95 мкг или 100 мкг.

В некоторых воплощениях количество РНК для каждого вида РНК по существу одинаково по массе. В других воплощениях количество РНК для каждого вида РНК выбирают эквимольным.

*Комплексообразование:*

В предпочтительном воплощении второго аспекта по меньшей мере одна РНК, предпочтительно по меньшей мере одна мРНК находится в комплексе или ассоциирована с дополнительным соединением с получением композиции с составом в виде комплекса. Состав в виде комплекса может выполнять функцию трансфекционного агента. Композиция с составом в виде комплекса может также выполнять функцию защиты РНК и/или мРНК от деградации.

В предпочтительном воплощении второго аспекта по меньшей мере одна РНК, предпочтительно по меньшей мере одна мРНК, и, возможно, по меньшей мере одна дополнительная РНК находится в комплексе или ассоциирована, или по меньшей мере частично находится в комплексе или частично ассоциирована с одним или более катионным или поликатионным соединением, предпочтительно катионным или поликатионным полимером, катионным или поликатионным полисахаридом, катионным или поликатионным липидом, катионным или поликатионным белком, катионным или поликатионным пептидом или любыми их комбинациями.

Термин «катионное или поликатионное соединение», используемый в настоящем документе, будет известен и понятен специалисту в данной области техники и, например, предназначен для обозначения заряженной молекулы, которая является положительно заряженной при значении рН в диапазоне от примерно 1 до 9, при значении рН в диапазоне от примерно 3 до 8, при значении рН в диапазоне от примерно

4 до 8, при значении рН в диапазоне от примерно 5 до 8, более предпочтительно при значении рН в диапазоне от примерно 6 до 8, даже более предпочтительно при значении рН в диапазоне от примерно 7 до 8, наиболее предпочтительно при физиологическом значении рН, например, в диапазоне от примерно 7,2 до примерно 7,5. Соответственно, катионный компонент, например, катионный пептид, катионный белок, катионный полимер, катионный полисахарид, катионный липид, может представлять собой любое положительно заряженное соединение или полимер, который положительно заряжен в физиологических условиях. «Катионный или поликатионный пептид или белок» может содержать по меньшей мере одну положительно заряженную аминокислоту или более одной положительно заряженной аминокислоты, например, выбранной из Arg, His, Lys или Orn. Соответственно, «поликатионные» компоненты также входят в объем соединений, проявляющих более одного положительного заряда в данных условиях.

Катионные или поликатионные соединения, особенно предпочтительные в указанном контексте, могут быть выбраны из следующего списка катионных или поликатионных пептидов или белков их фрагментов: протамин, нуклеолин, спермин или спермидин или другие катионные пептиды или белки, такие как поли-L-лизин (PLL), полиаргинин, основные полипептиды, пептиды, проникающие в клетку (CPP), включая ВИЧ-связывающие пептиды, Tat HIV-1 (HIV), пептиды-производные Tat, пенетратин, пептиды, производные или аналоги VP22, VP22 HSV (Herpes simplex), MAP, KALA или домены трансдукции белка (PTD), PpT620, богатые пролином пептиды, богатые аргинином пептиды, богатые лизином пептиды, MPG-пептид (-ы), Per-1, L-олигомеры, кальцитониновые пептид (-ы), пептиды, полученные из Antennapedia, pAntp, pIsl, FGF, лактоферрин, транспортан, буфорин-2, Vac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, пептиды, полученные из hCT, SAP или гистоны. Более предпочтительно нуклеиновая кислота (например, ДНК или РНК), например, кодирующая РНК, предпочтительно мРНК, образует комплекс с одним или более поликатионами, предпочтительно с протамином или олигофектамином, наиболее предпочтительно с протамином.

Другие предпочтительные катионные или поликатионные соединения, которые могут быть применены в качестве агента для трансфекции или комплексообразования, могут включать катионные полисахариды, например, хитозан, полибрэн и так далее; катионные липиды, например, DOTMA, DMRIE, ди-C14-амидин, DOTIM, SAINT, DC-

Chol, BGTC, СТАР, DOPC, DODAP, DOPE: диолеилфосфатидилэтаноламин, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS, DIMRI, DOTAP, DC-6-14, CLIP1, CLIP6, CLIP9, олигофектамин; или катионные или поликатионные полимеры, например, модифицированные полиаминокислоты, такие как полимеры бета-аминокислот или обращенные полиамиды и так далее, модифицированные полиэтилены, такие как PVP и так далее, модифицированные акрилаты, такие как pDMAEMA и так далее, модифицированные амидоамины, такие как pAMAM и так далее, модифицированные полибетааминоэфир (PBAE), такие как полимеры 1,4-бутандиолдиакрилат-со-5-амино-1-пентанола, модифицированные диамином по концам, и так далее, дендримеры, такие как полипропиламиновые дендримеры или дендримеры на основе pAMAM, и так далее, полиимин (-ы), такие как PEI, поли(пропиленимин) и так далее, полиаллиламин, полимеры на основе сахарной цепи, такие как полимеры на основе циклодекстрина, полимеры на основе декстрана и так далее, полимеры на основе силановой основы, такие как сополимеры PMOXA-PDMS и так далее, блок-полимеры, состоящие из комбинации одного или более катионных блоков (например, выбранных из катионного полимера, как указано выше) и одного или более гидрофильных или гидрофобных блоков (например, полиэтиленгликоля); и так далее.

В соответствии с различными воплощениями композиция согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну РНК, предпочтительно по меньшей мере одну мРНК, определенную в контексте первого аспекта, и полимерный носитель.

Термин «полимерный носитель», используемый в настоящем документе, будет известен и понятен специалисту в данной области техники, и, например, он предназначен для обозначения соединения, которое облегчает транспорт и/или комплексообразование другого соединения (например, транспортируемой нуклеиновой кислоты). Полимерный носитель обычно представляет собой носитель, образованный из полимера. Полимерный носитель может быть связан со своим транспортируемым объектом (например, ДНК или РНК) посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия. В основе полимера могут находиться различные субъединицы, примером является сополимер.

Подходящие полимерные носители в этом контексте могут включать, например, полиакрилаты, полиалкилцианоакрилаты, полилактид, сополимеры полилактида и полигликолида, поликапролактоны, декстран, альбумин, желатин, альгинат, коллаген, хитозан, циклодекстрины, протамин, пегилированный протамин, пегилированный PLL

и полиэтиленимин (PEI), дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP), диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат (DTBP), поли(этиленимин)бискарбамат (PEIC), поли(L-лизин) (PLL), модифицированный гистидином PLL, поли(N-винилпирролидон) (PVP), поли(пропиленимин) (PPI), поли(амидоамин) (PAMAM), поли(амидоэтиленимин) (SS-PAEI), триэтилететрамин (TETA), поли( $\beta$ -аминоэфир), поли(4-гидрокси-L-проиновый эфир) (PHP), поли(аллиламин), поли( $\alpha$ -[4-аминобутил]-L-гликолевую кислоту (PAGA), поли(D,L-молочную-со-гликолевую кислоту (PLGA), поли(N-этил-4-винилпиридиния бромид), поли(фосфазен)ы (PPZ), поли(фосфоэфир)ы (PPE), поли(фосфорамидат)ы (PPA), поли(N-2-гидроксипропилметакриламид) (pHPMA), поли(2-(диметиламино)этилметакрилат) (pDMAEMA), поли(2-аминоэтилпропиленфосфат) PPE\_EA), галактозилированный хитозан, N-додецилированный хитозан, гистон, коллаген и декстран-спермин. В одном из воплощений полимер может представлять собой инертный полимер, такой как, но не ограничиваясь им, PEG. В одном из воплощений полимер может представлять собой катионный полимер, такой как, но не ограничиваясь ими, PEI, PLL, TETA, поли(аллиламин), поли(N-этил-4-винилпиридинийбромид), pHPMA и pDMAEMA. В одном из воплощений полимер может представлять собой биоразлагаемый PEI, такой как, но не ограничиваясь ими, DSP, DTBP и PEIC. В одном из воплощений полимер может быть биоразлагаемым, таким как, но не ограничиваясь ими, модифицированный гистином PLL, SS-PAEI, поли( $\beta$ -аминоэфир), PHP, PAGA, PLGA, PPZ, PPE, PPA и PPE-EA.

*Инкапсуляция/комплексообразование в липидных наночастицах (LNP):*

В предпочтительных воплощениях второго аспекта по меньшей мере одна РНК, предпочтительно по меньшей мере одна мРНК и, возможно, по меньшей мере одна дополнительная РНК находятся в комплексе, инкапсулированы, частично инкапсулированы или ассоциированы с одним или более липидами (например, катионными липидами и /или нейтральными липидами), тем самым образуя носители на липидной основе, такие как липосомы, липидные наночастицы (LNP), липоплексы и/или нанолипосомы.

Липосомы, липидные наночастицы (LNP), липоплексы и/или нанолипосомы: включенная РНК может быть полностью или частично расположена во внутреннем пространстве липосом, липидных наночастиц (LNP), липоплексов и/или нанолипосом, внутри липидного слоя/мембраны или ассоциирована с внешней поверхностью липидного слоя/мембраны.

Включение РНК в липосомы/LNP также упоминается в настоящем документе как «инкапсуляция», при которой РНК полностью содержится во внутреннем пространстве липосом, липидных наночастиц (LNP), липоплексов и/или нанолипосом. Целью включения РНК в липосомы, липидные наночастицы (LNP), липоплексы и/или нанолипосомы является защита РНК от окружающей среды, которая может содержать ферменты или химические вещества или условия, разрушающие нуклеиновую кислоту, и/или системы или рецепторы, вызывающие быстрое выведение нуклеиновой кислоты. Более того, включение РНК в липосомы, липидные наночастицы (LNP), липоплексы и/или нанолипосомы может способствовать всасыванию РНК и, следовательно, может усиливать терапевтический эффект РНК, кодирующей антигенные шиповидные белки SARS-CoV-2. Соответственно, включение по меньшей мере одной РНК в липосомы, липидные наночастицы (LNP), липоплексы и/или нанолипосомы может быть особенно подходящим для вакцины против SARS-CoV-2, например, для внутримышечного и/или внутрикожного введения.

В этом контексте термины «в комплексе» или «ассоциированный» относятся к по существу стабильной комбинации РНК с одним или более липидами в более крупных комплексах или ассоциации без ковалентного связывания.

Термин «липидная наночастица», также обозначаемый как «LNP», не ограничивается какой-либо конкретной морфологией и включает любую морфологию, возникающую при объединении катионного липида и, возможно, одного или более дополнительных липидов, например, в водной среде и/или в присутствии РНК. Например, липосома, липидный комплекс, липоплекс и тому подобное входят в объем липидных наночастиц (LNP).

Липосомы, липидные наночастицы (LNP), липоплексы и/или нанолипосомы могут быть разных размеров, например, могут представлять собой, но не ограничиваясь ими, многослойную везикулу (MLV), которая может иметь диаметр в сотни нанометров и может содержать серию концентрических бислоев, разделенных узкими водными компартментами, малую однослойную везикулу (SUV), которая может иметь диаметр менее 50 нм, и большую однослойную везикулу (LUV), которая может иметь диаметр от 50 до 500 нм.

LNP согласно настоящему изобретению соответственно охарактеризованы как микроскопические везикулы, имеющие внутреннее водное пространство, отделенное от внешней среды мембраной из одного или более двойных слоев. Двухслойные

мембраны LNP обычно образованы амфифильными молекулами, такими как липиды синтетического или природного происхождения, которые содержат пространственно разделенные гидрофильные и гидрофобные домены. Двухслойные мембраны липосом также могут быть образованы амфифильными полимерами и поверхностно-активными веществами (примерами являются полимеросомы, ниосомы и так далее). В контексте настоящего изобретения LNP обычно служит для транспорта по меньшей мере одной РНК в ткань-мишень.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях второго аспекта по меньшей мере одна РНК образует комплекс с одним или более чем одним липидом, образуя, таким образом, липидные наночастицы (LNP). Предпочтительно указанные LNP особенно подходят для внутримышечного и/или внутрикожного введения. LNP, как правило, содержат катионный липид и один или более эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, заряженных липидов, стероидов и конъюгированных с полимером липидов (например, пегилированного липида). По меньшей мере одна РНК может быть инкапсулирована в липидной части LNP или в водном пространстве, окруженном частью или всей липидной составляющей LNP. РНК или ее часть также могут быть ассоциированы и могут образовывать комплекс с LNP. LNP может содержать любой липид, способный образовывать частицу, к которой присоединена РНК или в которую инкапсулированы один или более видов РНК. Предпочтительно LNP, содержащая РНК, содержит один или более катионных липидов и один или более стабилизирующих липидов. Стабилизирующие липиды включают нейтральные липиды и пегилированные липиды.

Предпочтительно LNP согласно настоящему изобретению содержит

- (1) по меньшей мере один катионный липид;
- (2) по меньшей мере один нейтральный липид;
- (3) по меньшей мере один стероид или аналог стероида, предпочтительно холестерин; и
- (4) по меньшей мере один конъюгированный с полимером липид, предпочтительно PEG-липид;

где (1)-(4) находятся в мольном отношении примерно 20-60% катионного липида, 5-25% нейтрального липида, 25-55% стерола и 0,5-15% конъюгированного с полимером липида.



Катионный липид LNP может быть катионируемым, то есть он становится протонированным, когда pH снижается ниже pK ионизируемой группы липида, но становится все более нейтральным при более высоких значениях pH. При значениях pH ниже pK липид может связываться с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами. В некоторых воплощениях катионный липид включает цвиттер-ионный липид, который приобретает положительный заряд при снижении pH.

Такие липиды включают, но не ограничиваются ими, DSDMA, N,N-диолеил-N,N-диметиламмония хлорид (DODAC), N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония бромид (DDAB), 1,2-диолеоилтриметиламмонийпропан хлорид (DOTAP) (также известный как N-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид и соль-хлорид 1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропана), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), ckk-E12, ckk, 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дииллиноленилокси-N,N-диметиламинопропан ( $\gamma$ -DLinDMA), 98N12-5, 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолейокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), соль-хлорид 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), ICE (на основе имидазола), HGT5000, HGT5001, DMDMA, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, XTC (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан) HGT4003, соль-хлорид 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N,N-дилиноиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин)),

1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (C12-200), 2,2-дилинолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолан (DLin-K-C2-DMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA), NC98-5 (4,7,13-трис(3-оксо-3-(ундециламино)пропил)-N1,N16-диундецил-4,7,10,13-тетраазагексадекан-1,16-диамид), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (DLin-M-C3-DMA), 3-(((6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-илокси)-N,N-диметилпропан-1-амин (эфир MC3), 4-(((6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-илокси)-N,N-диметилбутан-1-амин (эфир MC4), LIPOFECTIN<sup>®</sup> (коммерчески доступные катионные липосомы, содержащие DOTMA и 1,2-диолеоил-sn-3-фосфоэтаноламин (DOPE), от GIBCO/BRL, Гранд Айленд, Нью-Йорк); LIPOFECTAMINE<sup>®</sup> (коммерчески доступные катионные липосомы, содержащие N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-(2-(сперминкарбоксамидо)этил)-N,N-диметиламмония трифторацетат (DOSPA) и (DOPE), от GIBCO/BRL); и TRANSFECTAM<sup>®</sup> (коммерчески доступные катионные липиды, содержащие диоктадециламидоглицилкарбокиспермин (DOGS) в этаноле от Promega Corp., Мэдисон, Висконсин) или любую комбинацию любого из вышеперечисленного. Другие подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению включают липиды, описанные в международных патентных публикациях WO2010/053572 (и, в частности, CI 2-200, описанные в абзаце [00225]) и WO2012/170930, обе из которых включены в настоящее описание посредством ссылки, HGT4003, HGT5000, HGTS001, HGT5001, HGT5002 (см. US2015/0140070A1).

В воплощениях катионный липид может представлять собой аминолипид.

Иллюстративные аминолипиды включают, но не ограничиваются ими, 1,2-дилинолейокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолейокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), соль-хлорид 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), соль-хлорид 1,2-дилинолеоил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ), 3-(N,N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилоксо-3-(2-

N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA) и 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA), 2,2-дилинолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолан (DLin-KC2-DMA); дилинолеил-метил-4-диметиламинобутират (DLin-MC3-DMA); MC3 (US20100324120).

В воплощениях катионный липид может представлять собой аминоспиртовой липидоид.

Аминоспиртовые липидоиды, которые могут быть применены в настоящем изобретении, могут быть получены способами, описанными в патенте США № 8450298, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Подходящими (ионизируемыми) липидами также могут быть соединения, раскрытые в таблицах 1, 2 и 3 и определенные в пп. 1-24 формулы изобретения WO 2017/075531A1, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

В другом воплощении подходящие липиды также могут представлять собой соединения, раскрытые в WO2015/074085A1 (то есть от ATX-001 до ATX-032, или соединения, указанные в пп. 1-26 формулы изобретения), заявках на патент США №№ 61/905724 и 15/614499 или патентах США №№ 9593077 и 9567296, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки.

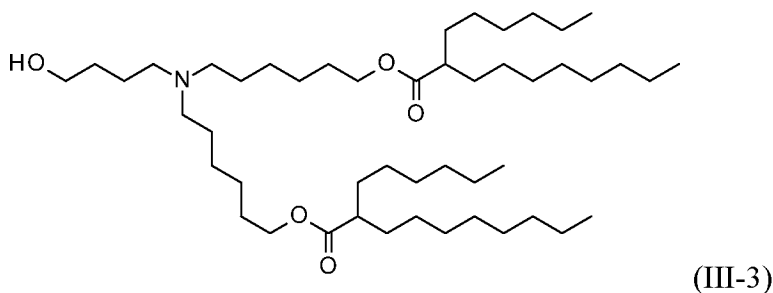
В других воплощениях подходящие катионные липиды также могут представлять собой соединения, раскрытые в публикации WO2017/117530A1 (то есть липиды 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или соединения, указанные в формуле изобретения), полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

В предпочтительных воплощениях ионизируемые или катионные липиды также могут быть выбраны из липидов, раскрытых в WO2018/078053A1 (то есть липидов, полученных из формул I, II и III в WO2018/078053A1, или липидов, указанных в пп. 1-12 формулы изобретения WO2018/078053A1), таким образом содержание WO2018/078053A1 полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В этом контексте липиды, описанные в таблице 7 WO2018/078053A1 (например, липиды, полученные из формул с I-1 по I-41), и липиды, раскрытые в таблице 8 WO2018/078053A1 (например, липиды, полученные из формул с II-1 по II-36), могут быть подходящим образом применены в контексте изобретения. Соответственно, формулы с I-1 по I-41 и с II-1 по II-36 из WO 2018/078053A1, а также конкретное раскрытие, относящееся к ним, включены в настоящий документ посредством ссылки.

В предпочтительных воплощениях катионные липиды могут быть получены из формулы III опубликованной патентной заявки РСТ WO2018/078053A1. Соответственно, формула III из WO 2018/078053A1 и конкретное раскрытие, относящееся к ней, включены в настоящий документ посредством ссылки.

В особенно предпочтительных воплощениях по меньшей мере одна РНК, предпочтительно по меньшей мере одна мРНК композиции образует комплекс с одним или более липидами, образуя таким образом LNP, где катионный липид LNP выбран из структур с III-1 по III-36 из таблицы 9 опубликованной патентной заявки РСТ WO2018/078053A1. Соответственно, формулы с III-1 по III-36 из WO2018/078053A1 и конкретное раскрытие, относящееся к ним, включены в настоящий документ посредством ссылки.

В особенно предпочтительном воплощении второго аспекта по меньшей мере одна РНК, предпочтительно по меньшей мере одна мРНК, образует комплекс с одним или более липидами, образуя таким образом LNP, где LNP содержат катионный липид согласно формуле III-3:



Липид формулы III-3, соответствующим образом применяемый в настоящем документе, имеет химическое название ((4-гидоксибутил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеcanoат) и также обозначен как ALC-0315.

В некоторых воплощениях катионный липид, определенный в настоящем документе, более предпочтительно катионное липидное соединение III-3, присутствует в LNP в количестве от примерно 30 до примерно 95 мольных процентов по отношению к общему содержанию липидов в LNP. Если в LNP включено более одного катионного липида, такие проценты относятся к сумме катионных липидов. В воплощениях катионный липид присутствует в LNP в количестве от примерно 30 до примерно 70 мольных процентов. В одном из воплощений катионный липид присутствует в LNP в количестве от примерно 40 до примерно 60 мольных процентов, например, примерно 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 мольных

процентов, соответственно. В воплощениях катионный липид присутствует в LNP в количестве от примерно 47 до примерно 48 мольных процентов, например, примерно 47,0, 47,1, 47,2, 47,3, 47,4, 47,5, 47,6, 47,7, 47,8, 47,9, 50,0 мольных процентов, соответственно, где 47,7 мольных процентов являются особенно предпочтительными.

В некоторых воплощениях катионный липид присутствует в отношении от примерно 20 мольных процентов до примерно 70 или 75 мольных процентов, или от примерно 45 до примерно 65 мольных процентов, или примерно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, или примерно 70 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в LNP. В других воплощениях LNP содержат от примерно 25% до примерно 75% в расчете по молям катионного липида, например, от примерно 20 до примерно 70%, от примерно 35 до примерно 65%, от примерно 45 до примерно 65%, примерно 60%, примерно 57,5%, примерно 57,1%, примерно 50% или примерно 40% в расчете по молям (в расчете на 100% общего количества молей липида в липидной наночастице). В некоторых воплощениях отношение катионного липида к РНК составляет от примерно 3 до примерно 15, например, от примерно 5 до примерно 13 или от примерно 7 до примерно 11.

Другие подходящие (катионные или ионизируемые) липиды раскрыты в WO2009/086558, WO2009/127060, WO2010/048536, WO2010/054406, WO2010/088537, WO2010/129709, WO2011/153493, WO 2013/063468, US2011/0256175, US2012/0128760, US2012/0027803, US8158601, WO2016/118724, WO2016/118725, WO2017/070613, WO2017/070620, WO2017/099823, WO2012/040184, WO2011/153120, WO2011/149733, WO2011/090965, WO2011/043913, WO2011/022460, WO2012/061259, WO2012/054365, WO2012/044638, WO2010/080724, WO2010/21865, WO2008/103276, WO2013/086373, WO2013/086354, патентах США №№ 7893302, 7404969, 8283333, 8466122 и 8569256 и патентных публикациях США US2010/0036115, US2012/0202871, US2013/0064894, US2013/0129785, US2013/0150625, US2013/0178541, US2013/0225836, US2014/0039032 и WO2017/112865. В этом контексте раскрытия WO2009/086558, WO2009/127060, WO2010/048536, WO2010/054406, WO2010/088537, WO2010/129709, WO2011/153493, WO 2013/063468, US2011/0256175, US2012/0128760, US2012/0027803, US8158601, WO2016/118724, WO2016/118725, WO2017/070613, WO2017/070620, WO2017/099823, WO2012/040184, WO2011/153120, WO2011/149733, WO2011/090965, WO2011/043913, WO2011/022460, WO2012/061259, WO2012/054365, WO2012/044638, WO2010/080724, WO2010/21865, WO2008/103276, WO2013/086373, WO2013/086354, патентов США №

7893302, 7404969, 8283333, 8466122 и 8569256 и патентной публикации США № US2010/0036115, US2012/0202871, US2013/0064894, US2013/0129785, US2013/0150625, US2013/0178541, US2013/0225836 и US2014/0039032 и WO2017/112865, конкретно относящиеся к (катионным) липидам, подходящим для LNP, включены в настоящий документ посредством ссылки.

В воплощениях амино- или катионные липиды, определенные в настоящем документе, имеют по меньшей мере одну протонируемую или депротонируемую группу, так что липид является положительно заряженным при рН, соответствующем физиологическому рН (например, рН 7,4) или ниже, и нейтрален при втором рН, предпочтительно при рН, соответствующем физиологическому или выше. Безусловно, будет понятно, что добавление или удаление протонов в зависимости от рН является равновесным процессом и что указание заряженного или нейтрального липида относится к характеру преобладающих видов и не требует, чтобы все липиды обязательно находились в заряженной или нейтральной форме. Липиды, имеющие более одной протонируемой или депротонируемой группы или являющиеся цвиттер-ионными, не исключаются и могут также быть подходящими в контексте настоящего изобретения. В некоторых воплощениях протонируемые липиды имеют рКа протонируемой группы в диапазоне от примерно 4 до примерно 11, например, рКа от примерно 5 до примерно 7.

LNP могут содержать два или более (разных) катионных липида, определенных в настоящем документе. Катионные липиды могут быть выбраны так, чтобы они придавали различные полезные свойства. Например, в LNP можно использовать катионные липиды, которые отличаются такими свойствами, как рКа амина, химическая стабильность, период полувыведения из кровотока, период полувыведения из ткани, чистое накопление в ткани или токсичность. В частности, катионные липиды могут быть выбраны таким образом, чтобы свойства смешанных LNP были более желательными, чем свойства одиночных LNP, состоящих из отдельных липидов.

Количество постоянно катионного липида или липидоида может быть выбрано с учетом количества транспортируемой нуклеиновой кислоты. В одном из воплощений эти количества выбирают таким образом, чтобы отношение N/P наночастицы (наночастиц) или композиции находилось в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 20. В данном контексте отношение N/P определяется как мольное отношение атомов азота («N») основных азотсодержащих групп липида или липидоида к фосфатным группам

(«Р») нуклеиновой кислоты, которая используется для транспорта. Отношение N/P можно рассчитать, исходя из того, что, например, 1 мкг РНК обычно содержит примерно 3 нмоль фосфатных остатков при условии, что РНК демонстрирует статистическое распределение оснований. Значение «N» липида или липидоида можно рассчитать на основе его молекулярной массы и относительного содержания постоянно катионных и, если они присутствуют, катионизируемых групп.

Характеристики и поведение LNP *in vivo* могут быть изменены путем добавления гидрофильного полимерного покрытия, например, полиэтиленгликоля (PEG), к поверхности LNP для придания стерической стабилизации. Кроме того, LNP можно использовать для специфичного нацеливания путем присоединения лигандов (например, антител, пептидов и углеводов) к его поверхности или к концевой области присоединенных цепей PEG (например, через пегелированные липиды или пегелированный холестерин).

В некоторых воплощениях LNP содержат липид, конъюгированный с полимером. Термин «липид, конъюгированный с полимером» относится к молекуле, содержащей как липидную часть, так и полимерную часть. Примером липида, конъюгированного с полимером, является пегелированный липид. Термин «пегелированный липид» относится к молекуле, содержащей как липидную часть, так и полиэтиленгликолевую часть. Пегелированные липиды известны в данной области техники и включают 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-s-DMG) и тому подобное.

Конъюгированный с полимером липид, определенный в настоящем документе, например, PEG-липид, может служить в качестве липида, снижающего агрегацию.

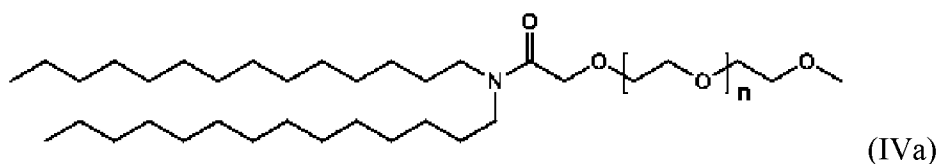
В некоторых воплощениях LNP содержит стабилизирующий липид, который представляет собой полиэтиленгликоль-липид (пегелированный липид). Подходящие полиэтиленгликоль-липиды включают PEG-модифицированный фосфатидилэтаноламин, PEG-модифицированную фосфатидную кислоту, PEG-модифицированные церамиды (например, PEG-CerC14 или PEG-CerC20), PEG-модифицированные диалкиламины, PEG-модифицированные диацилглицерины, PEG-модифицированные диалкилглицерины. Иллюстративные полиэтиленгликоль-липиды включают PEG-c-DOMG, PEG-c-DMA и PEG-s-DMG. В одном из воплощений полиэтиленгликоль-липид представляет собой N-[(метоксиполи(этиленгликоль)2000)карбамил]-1,2-димиристоилоксипропил-3-амин

(PEG-с-DMA). В предпочтительном воплощении полиэтиленгликоль-липид представляет собой PEG-2000-DMG. В одном из воплощений полиэтиленгликоль-липид представляет собой PEG-с-DOMG). В других воплощениях LNP содержат пегелированный диацилглицерин (PEG-DAG), такой как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG), пегелированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), PEG-сукцинат диацилглицерин (PEG-S-DAG), такой как 4-O-(2',3'-ди(тетрадеканоилюкси)пропил-1-O-(ω-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG), пегелированный церамид (PEG-сег) или PEG-диалкокситропилкарбамат, такой как ω-метокси(полиэтокси)этил-N-(2,3-ди(тетрадеканокси)пропил)карбамат или 2,3-ди(тетрадеканокси)пропил-N-(ω-метокси(полиэтокси)этил)карбамат.

В предпочтительных воплощениях пегелированный липид предпочтительно получают из формулы (IV) опубликованной патентной заявки РСТ WO2018/078053A1. Соответственно, пегелированные липиды, полученные из формулы (IV) опубликованной патентной заявки РСТ WO2018/078053A1, и соответствующее раскрытие, относящееся к ней, включены в настоящий документ посредством ссылки.

В особенно предпочтительных воплощениях по меньшей мере одна РНК композиции образует комплекс с одним или более липидами, образуя, таким образом, LNP, где LNP содержит пегелированный липид, где PEG-липид предпочтительно получают из формулы (IVa) опубликованной патентной заявки РСТ WO2018/078053A1. Соответственно, пегелированный липид, полученный из формулы (IVa) опубликованной патентной заявки РСТ WO2018/078053A1, и соответствующее раскрытие, относящееся к ней, включены в настоящий документ посредством ссылки.

В особенно предпочтительном воплощении по меньшей мере одна РНК образует комплекс с одним или более липидами, образуя, таким образом, липидные наночастицы (LNP), где LNP содержит пегелированный липид/PEG-липид. Предпочтительно указанный PEG-липид имеет формулу (IVa):



где  $n$  имеет среднее значение в диапазоне от 30 до 60, такое как примерно  $30 \pm 2$ ,  $32 \pm 2$ ,  $34 \pm 2$ ,  $36 \pm 2$ ,  $38 \pm 2$ ,  $40 \pm 2$ ,  $42 \pm 2$ ,  $44 \pm 2$ ,  $46 \pm 2$ ,  $48 \pm 2$ ,  $50 \pm 2$ ,  $52 \pm 2$ ,  $54 \pm 2$ ,  $56 \pm 2$ ,  $58 \pm 2$  или  $60 \pm 2$ . В наиболее предпочтительном воплощении  $n$  равно примерно 49. В других



предпочтительных аспектах указанный PEG-липид имеет формулу (IVa), где  $n$  представляет собой целое число, выбранное таким образом, что средняя молекулярная масса PEG-липида составляет от примерно 2000 г/моль до примерно 3000 г/моль или от примерно 2300 г/моль до примерно 2700 г/моль, еще более предпочтительно примерно 2500 г/моль.

Липид формулы IVa, используемый в настоящем документе, имеет химическое название 2[(полиэтиленгликоль)-2000]-N,N-дитетрадецилацетамид, также обозначаемое как ALC-0159.

Другие примеры PEG-липидов, подходящих в этом контексте, представлены в источниках US2015/0376115A1 и WO2015/199952, каждый из которых полностью включен посредством ссылки.

В некоторых воплощениях LNP включают менее примерно 3, 2 или 1 мольного процента PEG или модифицированного PEG липида в расчете на общее количество молей липида в LNP. В дополнительных воплощениях LNP содержат от примерно 0,1% до примерно 20% PEG-модифицированного липида в расчете по молям, например, от примерно 0,5 до примерно 10%, от примерно 0,5 до примерно 5%, примерно 10%, примерно 5%, примерно 3,5%, примерно 3%, примерно 2,5%, примерно 2%, примерно 1,5%, примерно 1%, примерно 0,5% или примерно 0,3% в расчете по молям (в расчете на 100% общего количества молей липидов в LNP). В предпочтительных воплощениях LNP содержат от примерно 1,0% до примерно 2,0% PEG-модифицированного липида в расчете по молям, например, от примерно 1,2 до примерно 1,9%, от примерно 1,2 до примерно 1,8%, от примерно 1,3 до примерно 1,8%, примерно 1,4%. до примерно 1,8%, примерно от 1,5 до примерно 1,8%, примерно от 1,6 до примерно 1,8%, в частности примерно 1,4%, примерно 1,5%, примерно 1,6%, примерно 1,7%, примерно 1,8%, примерно 1,9%, наиболее предпочтительно 1,7% (в расчете на 100% общего количества молей липидов в LNP). В различных воплощениях мольное отношение катионного липида к пегилированному липиду находится в диапазоне от примерно 100:1 до примерно 25:1.

В предпочтительных воплощениях LNP включает один или более дополнительных липидов, которые стабилизируют образование частиц во время их образования или в процессе производства (например, нейтральный липид и/или один или более стероидов или аналогов стероидов).

В предпочтительных воплощениях второго аспекта по меньшей мере одна РНК образует комплекс с одним или более липидами, образуя, таким образом, липидные наночастицы (LNP), где LNP содержит один или более нейтральных липидов и/или один или более стероидов или аналогов стероидов.

Подходящие стабилизирующие липиды включают нейтральные липиды и анионные липиды. Термин «нейтральный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые существуют либо в незаряженной, либо в нейтральной цвиттер-ионной форме при физиологических значениях pH. Типичные нейтральные липиды включают диацилфосфатидилхолины, диацилфосфатидилэтанолламины, церамиды, сфингомиелины, дигидросфингомиелины, кефалины и цереброзиды.

В воплощениях второго аспекта LNP содержит один или более нейтральных липидов, где нейтральный липид выбран из группы, включающей дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламин (POPE) и диолеоилфосфатидилэтанолламин 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфоэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-O-монометил-PE, 16-O-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеариоил-2-олеоилфосфатидэтанолламин (SOPE) и 1,2-диелаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (transDOPE) или их смеси.

В некоторых воплощениях LNP содержат нейтральный липид, выбранный из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM. В различных воплощениях мольное отношение катионного липида к нейтральному липиду находится в диапазоне от примерно 2:1 до примерно 8:1.

В предпочтительных воплощениях нейтральный липид представляет собой 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC). Мольное отношение катионного липида к DSPC может находиться в диапазоне от примерно 2:1 до примерно 8:1.

В предпочтительных воплощениях стероид представляет собой холестерин. Мольное отношение катионного липида к холестерину может находиться в диапазоне от примерно 2:1 до примерно 1:1. В некоторых воплощениях холестерин может быть пегилированным.

Стерол может составлять от примерно 10 мол.% до примерно 60 мол.% или от примерно 25 мол.% до примерно 40 мол.% липидной частицы. В одном из воплощений стерол составляет примерно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или примерно 60 мол.% от общего количества липидов, присутствующих в липидной частице. В другом воплощении LNP включают от примерно 5% до примерно 50% в расчете по молям стерола, например, от примерно 15% до примерно 45%, от примерно 20% до примерно 40%, примерно 48%, примерно 40%, примерно 38,5%, примерно 35%, примерно 34,4%, примерно 31,5% или примерно 31% в расчете по молям (в расчете на 100% общего количества молей липидов в липидной наночастице).

Предпочтительно липидные наночастицы (LNP) содержат: (а) по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту, (b) катионный липид, (c) агент, снижающий агрегацию (такой как полиэтиленгликоль-липид (PEG) или PEG-модифицированный липид), (d) возможно, некаатионный липид (такой как нейтральный липид) и (e) возможно, стерол.

В некоторых воплощениях катионные липиды (определенные выше), некаатионные липиды (определенные выше), холестерин (определенный выше) и/или PEG-модифицированные липиды (определенные выше) можно комбинировать в различных относительных мольных отношениях. Например, отношение катионного липида к некаатионному липиду, к липиду на основе холестерина, к пегилированному липиду может составлять примерно 30-60:20-35:20-30:1-15 или примерно 40:30:25:5, 50:25:20:5, 50:27:20:3, 40:30:20:10, 40:32:20:8, 40:32:25:3 или 40:33:25:2, или в отношении примерно 50:25:20:5, 50:20:25:5, 50:27:20:3, 40:30:20:10, 40:30:25:5 или 40:32:20:8, 40:32:25:3 или 40:33:25:2, соответственно.

В некоторых воплощениях LNP содержат липид формулы (III), по меньшей мере одну РНК, определенную в настоящем документе, нейтральный липид, стероид и пегилированный липид. В предпочтительных воплощениях липид формулы (III) представляет собой липидное соединение III-3 (ALC-0315), нейтральный липид представляет собой DSPC, стероид представляет собой холестерин, и пегилированный липид представляет собой соединение формулы (IVa) (ALC-0159).

В предпочтительном воплощении второго аспекта LNP состоит по существу из (1) по меньшей мере одного катионного липида; (2) нейтрального липида; (3) стерола, например, холестерина; и (4) PEG-липиды, например, PEG-DMG или PEG-cDMA, в

мольном отношении примерно 20-60% катионного липида: 5-25% нейтрального липида: 25-55% стерола; 0,5-15% PEG-липид.

В особенно предпочтительных воплощениях по меньшей мере РНК образует комплекс с одним или более липидами, образуя, таким образом, липидные наночастицы (LNP), где LNP содержит:

- 1) по меньшей мере один катионный липид, определенный в настоящем документе, предпочтительно липид формулы (III), более предпочтительно липид III-3 (ALC-0315);
- 2) по меньшей мере один нейтральный липид, определенный в настоящем документе, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC);
- 3) по меньшей мере один стероид или аналог стероида, определенный в настоящем документе, предпочтительно холестерин; и
- 4) по меньшей мере один PEG-липид, определенный в настоящем документе, например, PEG-DMG или PEG-cDMA, предпочтительно пегилированный липид, который представляет собой или является производным формулы (IVa) (ALC-0159).

В особенно предпочтительных воплощениях по меньшей мере одна РНК образует комплекс с одним или более липидами, образуя, таким образом, липидные наночастицы (LNP), где LNP содержит (1)-(4) в мольном отношении примерно 20-60% катионного липида: 5-25% нейтрального липида: 25-55% стерола; 0,5-15% PEG-липид.

В одном из предпочтительных воплощений липидная наночастица содержит: катионный липид формулы (III) и/или PEG-липид формулы (IV), возможно, нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC) и, возможно, стероид, предпочтительно холестерин, где мольное отношение катионного липида к DSPC, возможно, находится в диапазоне от примерно 2:1 до 8:1, где мольное отношение катионного липида к холестерину, возможно, находится в диапазоне от примерно от 2:1 до 1:1.

В конкретном предпочтительном воплощении композиция согласно второму аспекту, содержащая по меньшей мере одну РНК, содержит липидные наночастицы (LNP), которые имеют мольное отношение примерно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 (то есть доли (мол.%) катионного липида (предпочтительно липида III-3 (ALC-0315)), DSPC, холестерина и PEG-липид (предпочтительно PEG-липид формулы (IVa) с  $n = 49$ , еще более

предпочтительно PEG-липида формулы (IVa) с n = 45 (ALC-0159)), солюбилизованные в этаноле).

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту содержит по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 24837-24854, 27524-27546, 24855-24872, 27547-27569, 24909-24926, 27616-27638, 28827-28866, 28687-28735, 28867-28915, 28929-28932, 28937-28940, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липида формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту содержит по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, 28699-28704, 28879-28884, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липида формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту содержит по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липида формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту содержит по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28688-28691, 28868-28871,

28929-28932, 28937-28940, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту содержит по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23529-23534, 27386-27408, 23535-23552, 27409-27431, 23590-23606, 27478-27500, 28736-28776, 28638-28686, 28777-28825, 28925-28928, 28933-28936, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту содержит по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, 28650-28655, 28789-28794, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту содержит по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

Предпочтительно композиция согласно второму аспекту содержит по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28639-28642, 28778-28781, 28925-28928, 28933-28936, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

В воплощениях, где композиция представляет собой поливалентную композицию, определенную выше, виды РНК, предпочтительно виды мРНК поливалентной композиции, могут быть приготовлены отдельно, например, могут быть включены в состав липосом или LNP. Соответственно, виды РНК поливалентной композиции отдельно включают в состав LNP, которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45). Типы нуклеиновых кислот для поливалентных композиций предпочтительно выбраны, как определено выше (см. раздел «Поливалентные композиции согласно настоящему изобретению»).

В этом контексте композиция может содержать:

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 149, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)); и/или

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23529-23534, 27386-27408, 23535-23552, 27 409-27431, 23590-23606, 27478-27500, 28736- 28776, 28638-28686, 28777-28825, 28925-28928, 28933-28936, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют

мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC- 0159)); и/или

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, 28650-28655, 28789-28794, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC- 0159)); и/или

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)); и/или

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28639-28642, 28778-28781, 28925-28928, 28933-28936, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC- 0159)).

В этом контексте композиция может содержать:

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 24837, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей



(мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)); и/или

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 24837-24854, 27524-27546, 24855-24872, 27547-27569, 24909-24926, 27616-27638, 28827-28866, 28687-28735, 28867-28915, 28929-28932, 28937-28940, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)); и/или

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, 28699-28704, 28879-28884, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)); и/или

- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)); и/или

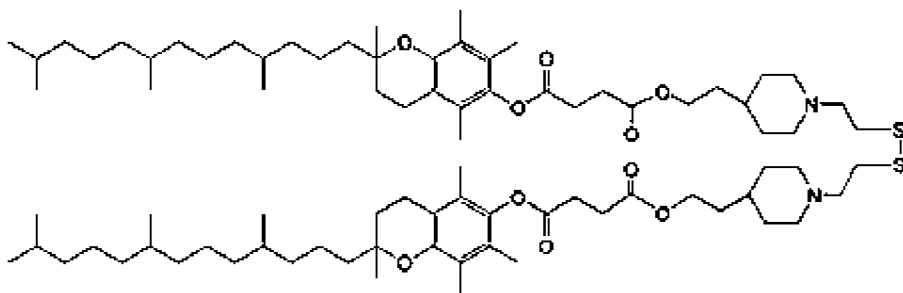
- по меньшей мере одну РНК, которая идентична или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28688-28691, 28868-28871, 28929-28932, 28937-28940, приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)).

В воплощениях, где композиция представляет собой поливалентную композицию, определенную выше, виды нуклеиновых кислот (например, ДНК или РНК), предпочтительно виды РНК поливалентной композиции могут быть совместно включены в состав, предпочтительно совместно включены в состав липосом или LNP. Соответственно, виды РНК поливалентной композиции совместно включают в состав LNP, которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с  $n = 49$  или с  $n = 45$ ). Виды нуклеиновых кислот для поливалентных композиций предпочтительно выбраны, как определено выше (см. раздел «Поливалентные композиции согласно настоящему изобретению»).

Общее количество РНК в липидных наночастицах может быть различным и определяется, например, в зависимости от массового отношения (масс/масс) нуклеиновой кислоты и общего количества липида. В одном из воплощений изобретения отношение нуклеиновой кислоты, в частности РНК, к общему количеству липидов составляет менее 0,06 масс/масс, предпочтительно от 0,03 масс/масс до 0,04 масс/масс.

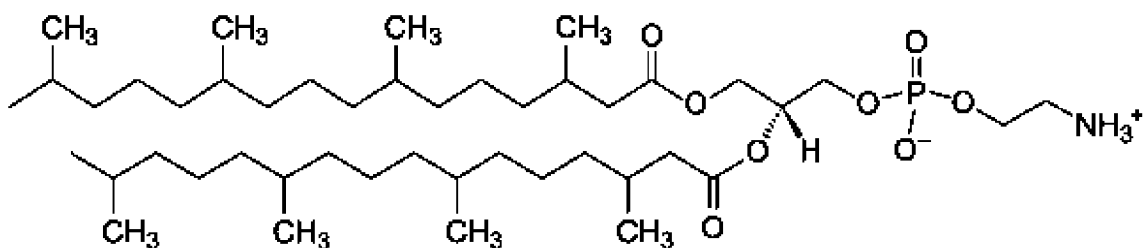
В некоторых воплощениях липидные наночастицы (LNP) состоят только из трех липидных компонентов, а именно имидазолового эфира холестерина (ICE), 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE) и 1,2-димиристоил-*sn*-глицерина, метоксиполиэтиленгликоля (DMG-PEG-2K).

В одном из воплощений липидная наночастица композиции содержит катионный липид, стероид; нейтральный липид; и липид, конъюгированный с полимером, предпочтительно пегилированный липид. Предпочтительно липид, конъюгированный с полимером, представляет собой пегилированный липид или PEG-липид. В конкретном воплощении липидные наночастицы содержат катионный липид, подобный катионному липиду COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15; NOF Corporation, Токио, Япония), в соответствии со следующей формулой

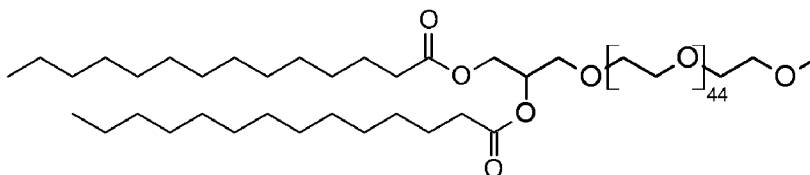


Как дополнительно описано ниже, эти липидные наночастицы обозначаются как «GN01».

Кроме того, в конкретном воплощении липидные наночастицы GN01 содержат нейтральный липид, подобный структуре 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DPhyPE):



Кроме того, в конкретном воплощении липидные наночастицы GN01 содержат липид, конъюгированный с полимером, предпочтительно пегилированный липид, представляющий собой 1,2-димиристоил-*rac*-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль 2000 (DMG-PEG 2000), имеющий следующую структуру:



В данной области техники «DMG-PEG 2000» считается смесью 1,2-DMG-PEG 2000 и 1,3-DMG-PEG 2000 в отношении примерно 97:3.

Соответственно, липидные наночастицы GN01 (GN01-LNP) согласно одному из предпочтительных воплощений содержат катионный липид SS-EC, нейтральный липид DPhyPE, холестерин и липид, конъюгированный с полимером (пегилированный липид) 1,2-димиристоил-*rac*-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль (PEG-DMG).

В предпочтительном воплощении LNP GN01 включают:

(а) катионный липид SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15; NOF Corporation, Токио, Япония) в количестве 45-65 мол.%;

- (b) холестерин в количестве 25-45 мол.%;
- (c) DPhyPE в количестве 8-12 мол.%; и
- (d) PEG-DMG 2000 в количестве 1-3 мол.%;

каждое количество относится к общему мольному количеству всех липидных эксципиентов липидных наночастиц GN01.

В еще одном предпочтительном воплощении липидные наночастицы GN01, описанные в настоящем документе, содержат 59 мол.% катионного липида, 10 мол.% нейтрального липида, 29,3 мол.% стероида и 1,7 мол.% конъюгированного с полимером липида, предпочтительно пегилированного липида. В наиболее предпочтительном воплощении липидные наночастицы GN01, описанные в настоящем документе, содержат 59 мол.% катионного липида SS-EC, 10 мол.% DPhyPE, 29,3 мол.% холестерина и 1,7 мол.% DMG-PEG 2000.

Количество катионного липида по отношению к количеству нуклеиновой кислоты в липидной наночастице GN01 также может быть выражено в виде массового отношения (далее сокращено как «масс/масс»). Например, липидные наночастицы GN01 содержат по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно по меньшей мере одну РНК в количестве, достаточном для достижения массового отношения липида к РНК в диапазоне от примерно 20 до примерно 60 или от примерно 10 до примерно 50. В других воплощениях отношение катионного липида к нуклеиновой кислоте или РНК составляет от примерно 3 до примерно 15, например, от примерно 5 до примерно 13, от примерно 4 до примерно 8 или от примерно 7 до примерно 11. В очень предпочтительном воплощении настоящего изобретения массовое отношение общего липида/РНК составляет примерно 40 или 40, то есть в примерно 40 или в 40 раз больше массы для обеспечения инкапсуляции РНК. Другое предпочтительное отношение РНК/липиды составляет от примерно 1 до примерно 10, от примерно 2 до примерно 5, от примерно 2 до примерно 4 или предпочтительно примерно 3.

Кроме того, количество катионного липида может быть выбрано с учетом количества транспортируемой нуклеиновой кислоты, такой как рассматриваемое соединение РНК. В одном из воплощений отношение N/P может находиться в диапазоне от примерно 1 до примерно 50. В другом воплощении указанный диапазон составляет от примерно 1 до примерно 20, от примерно 1 до примерно 10, от примерно 1 до примерно 5. В одном из предпочтительных воплощений эти количества выбраны

таким образом, что отношение N/P липидных наночастиц GN01 или композиции находится в диапазоне от примерно 10 до примерно 20. В другом очень предпочтительном воплощении отношение N/P составляет 14 (то есть 14-кратный мольный избыток положительного заряда для обеспечения инкапсуляции нуклеиновой кислоты).

В предпочтительном воплощении липидные наночастицы GN01 содержат 59 мол.% катионного липида COATSOME® SS-EC (прежнее название: SS-33/4PE-15, как следует из раздела примеров; NOF Corporation, Токио, Япония), 29,3 мол.% холестерина в качестве стероида, 10 мол.% DPhyPE в качестве нейтрального липида/фосфолипиды и 1,7 мол.% DMG-PEG 2000 в качестве конъюгированного с полимером липида. Еще одним преимуществом изобретения, связанным с применением DPhyPE, является высокая способность к слиянию из-за его объемных хвостов, посредством чего он способен сливаться с эндосомальными липидами на высоком уровне. Для «GN01» N/P (мольное отношение липидов к нуклеиновой кислоте, например, РНК) предпочтительно равно 14, а массовое отношение общего липида/РНК предпочтительно равно 40 (масс/масс).

В других воплощениях по меньшей мере одна РНК, предпочтительно по меньшей мере одна мРНК образует комплекс с одним или более липидами, образуя, таким образом, липидные наночастицы (LNP), где LNP содержит:

- 1 по меньшей мере один катионный липид;
- 2 по меньшей мере один нейтральный липид;
- 3 по меньшей мере один стероид или аналог стероида; и
- 4 по меньшей мере один PEG-липид, определенный в настоящем документе,

где катионный липид представляет собой DLin-KC2-DMA (50 мол.%) или DLin-MC3-DMA (50 мол.%), нейтральный липид представляет собой DSPC (10 мол.%), PEG-липид представляет собой PEG-DOMG (1,5 мол.%), и структурный липид представляет собой холестерин (38,5 мол.%).

В других воплощениях по меньшей мере одна РНК, предпочтительно по меньшей мере одна мРНК образует комплекс с одним или более липидами, образуя при этом липидные наночастицы (LNP), где LNP содержит SS15/Chol/DOPE (или DOPC)/DSG-5000 при отношении в мол.% 50/38,5/10/1,5.

В других воплощениях РНК согласно настоящему изобретению может быть включена в состав липосом, например, липосом, описанных в WO2019/222424, WO2019/226925, WO2019/232095, WO2019/232097 или WO2019/232208, и содержание WO2019/222424, WO2019/226925, WO2019/232095, WO2019/232097 или WO2019/232208, относящееся к липосомам или молекулам-носителям на липидной основе, включено в настоящий документ посредством ссылки.

В различных воплощениях LNP, которые надлежащим образом инкапсулируют по меньшей мере одну РНК согласно настоящему изобретению, имеют средний диаметр от примерно 50 нм до примерно 200 нм, от примерно 60 нм до примерно 200 нм, от примерно 70 нм до примерно 200 нм, от примерно 80 нм до примерно 200 нм, от примерно 90 нм до примерно 200 нм, от примерно 90 нм до примерно 190 нм, от примерно 90 нм до примерно 180 нм, от примерно 90 нм до примерно 170 нм, от примерно 90 нм до примерно 160 нм, от примерно 90 нм до примерно 150 нм, от примерно 90 нм до примерно 140 нм, от примерно от 90 нм до примерно 130 нм, от примерно 90 нм до примерно 120 нм, от примерно 90 нм до примерно 100 нм, от примерно 70 нм до примерно 90 нм, от примерно 80 нм до примерно 90 нм, от примерно 70 нм до примерно 80 нм, или примерно 30 нм, 35 нм, 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, 150 нм, 160 нм, 170 нм, 180 нм, 190 нм или 200 нм и по существу нетоксичны. В настоящем документе средний диаметр может быть представлен средним значением по оси z, определенным с помощью динамического светорассеяния, широко известного в данной области техники.

Индекс полидисперсности (PDI) наночастиц обычно находится в диапазоне от 0,1 до 0,5. В конкретном воплощении PDI составляет менее 0,2. Как правило, PDI определяют с помощью динамического светорассеяния.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения липидные наночастицы имеют гидродинамический диаметр в диапазоне от примерно 50 нм до примерно 300 нм, или от примерно 60 нм до примерно 250 нм, от примерно 60 нм до примерно 150 нм, или от примерно 60 нм до примерно 120 нм, соответственно.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения липидные наночастицы имеют гидродинамический диаметр в диапазоне от примерно 50 нм до примерно 300 нм, или от примерно 60 нм до примерно 250 нм, от примерно 60 нм до примерно 150 нм, или от примерно 60 нм до примерно 120 нм, соответственно.

В воплощениях, где композиция содержит более одного или множество, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 видов РНК согласно настоящему изобретению, указанное количество более одного или указанное множество, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 видов РНК согласно настоящему изобретению могут образовывать комплексы с одним или более липидами, таким образом образуя LNP, содержащие более одного или множество, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 различных видов РНК.

Согласно предпочтительному воплощению LNP, предпочтительно инкапсулирующие или содержащие РНК, очищают по меньшей мере на одной стадии очистки, предпочтительно по меньшей мере на одной стадии TFF и/или по меньшей мере на одной стадии осветления и/или по меньшей мере на одной стадии фильтрации. Эта очистка, в частности, приводит к уменьшению в композиции количества этанола, который применяли для получения липидного состава.

В этом контексте особенно предпочтительно, чтобы после очистки композиция содержала менее примерно 500 ppm этанола, предпочтительно менее примерно 50 ppm этанола, более предпочтительно менее примерно 5 ppm этанола.

В воплощениях LNP, описанные в настоящем документе, могут быть лиофилизированы для улучшения стабильности при хранении состава и/или РНК. В воплощениях LNP, описанные в настоящем документе, могут быть высушены распылением для улучшения стабильности при хранении состава и/или нуклеиновой кислоты. Лиопротекторы для лиофилизации и/или сушки распылением могут быть выбраны из трегалозы, сахарозы, маннозы, декстрана и инулина. Предпочтительным лиопротектором является сахароза, возможно, содержащая дополнительный лиопротектор. Другим предпочтительным лиопротектором является трегалоза, возможно, содержащая дополнительный лиопротектор.

Соответственно, композицию, например, композицию, содержащую LNP, лиофилизируют (например, в соответствии с публикациями WO2016/165831 или WO2011/069586, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки) с получением термостабильной высушенной композиции нуклеиновой кислоты (порошка), определенной в настоящем документе (например, РНК или ДНК). Композицию, например, композицию, содержащую LNP, можно также высушить с использованием распылительной сушки или распылительной сушки вымораживанием (например, согласно WO2016/184575 или WO2016/184576) с

получением термостабильной композиции (порошка), определенной в настоящем документе.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях композиция представляет собой высушенную композицию.

Термин «высушенная композиция», используемый в настоящем документе, следует понимать как композицию, которая была подвергнута лиофильной сушке, или распылительной сушке, или распылительной сушке вымораживанием, как определено выше, с получением термостабильной высушенной композиции (порошка), например, содержащей РНК в комплексе LNP (как определено выше).

В соответствии с другими воплощениями композиция согласно второму аспекту может содержать по меньшей мере один адъювант.

Соответственно, адъювант предпочтительно добавляют для усиления иммуностимулирующих свойств композиции.

Термин «адъювант», используемый в настоящем документе, будет известен и понятен специалисту в данной области техники и, например, предназначен для обозначения фармакологического и/или иммунологического агента, который может модифицировать, например, усиливать действие других агентов, или который может подходить для поддержания введения и доставки композиции. Термин «адъювант» относится к широкому спектру веществ. Как правило, эти вещества способны повышать иммуногенность антигенов. Например, адъюванты могут распознаваться системами врожденного иммунитета и, например, могут вызывать врожденный иммунный ответ (то есть неспецифичный иммунный ответ). «Адъюванты» обычно не вызывают адаптивного иммунного ответа. В контексте настоящего изобретения адъюванты могут усиливать действие антигенного пептида или белка, обеспечиваемого нуклеиновой кислотой. В этом контексте по меньшей мере один адъювант может быть выбран из любого адъюванта, известного специалисту в данной области техники и подходящего для данного случая, то есть поддерживающего индукцию иммунного ответа у субъекта, например, у человека.

Соответственно, композиция согласно второму аспекту может содержать по меньшей мере один адъювант, где по меньшей мере один адъювант может быть подходящим образом выбран из любого адъюванта, представленного в публикации WO2016/203025, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Адъюванты, раскрытые в любом из пп. 2-17 формулы изобретения публикации



WO2016/203025, предпочтительно адъюванты, раскрытые в п. 17 формулы изобретения WO2016/203025, являются особенно подходящими, относящиеся к ним конкретное содержание указанных публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки. Адъюванты могут быть соответствующим образом применены и включены в композицию согласно второму аспекту или вакцину согласно четвертому аспекту, например, для уменьшения количества нуклеиновой кислоты, необходимого для достаточного иммунного ответа на кодируемый белок, и/или для повышения эффективности композиции/вакцины для лечения/вакцинации людей старшего возраста. Подходящим адъювантом в контексте композиции или вакцины против коронавируса (в частности, для композиций, содержащих полипептид согласно третьему аспекту) может быть адъювант-агонист Toll-подобного рецептора 9 (TLR9), CpG 1018TM.

Композиция согласно второму аспекту может содержать, помимо компонентов, указанных в настоящем документе, по меньшей мере один дополнительный компонент, который может быть выбран из группы, состоящей из дополнительных антигенов (например, в форме пептида или белка, предпочтительно полученных из коронавируса) или дополнительных нуклеиновых кислот, кодирующих антиген (предпочтительно кодирующих пептид или белок, предпочтительно полученных из коронавируса); дополнительный иммунотерапевтический агент; одно или более вспомогательных веществ (цитокины, такие как монокины, лимфокины, интерлейкины или хемокины); или любое дополнительное соединение, которое, как известно, является иммуностимулирующим вследствие аффинности его связывания (в качестве лигандов) с Toll-подобными рецепторами человека; и/или адъювантную нуклеиновую кислоту, предпочтительно иммуностимулирующую РНК (исРНК), например, CpG-РНК и так далее.

В предпочтительных воплощениях композиция, содержащая носители на липидной основе (например, LNP), инкапсулирующие по меньшей мере одну РНК, стабильна после хранения в виде жидкости, например, стабильна в течение по меньшей мере 2 недель после хранения в виде жидкости при температуре примерно 5°C.

Используемый в настоящем документе термин «стабильный» относится к жидкой композиции, содержащей носители на липидной основе (например, LNP), инкапсулирующие РНК, где измеренные значения различных физико-химических параметров после хранения находятся в пределах определенного диапазона. В одном из

воплощений жидкую композицию, содержащую носители на липидной основе, инкапсулирующие РНК, анализируют для оценки стабильности по различным параметрам. Подходящие параметры стабильности включают, без ограничения, целостность РНК, Z-средний размер частиц, индекс полидисперсности (PDI), количество свободной РНК в жидкой композиции, эффективность инкапсуляции РНК (доля РНК в процентах, включенная в носители на липидной основе), форму и морфологию носителей на липидной основе, инкапсулирующих РНК, рН, осмоляльность или мутность. Кроме того, «стабильный» относится к жидкой композиции, содержащей носители на липидной основе, инкапсулирующие РНК, где измеренные значения различных функциональных параметров после хранения находятся в пределах определенного диапазона. В одном из воплощений жидкую композицию, содержащую носители на липидной основе, инкапсулирующие РНК, анализируют для оценки активности жидкой композиции, включая, например, экспрессию кодируемого пептида или белка, индукцию титров специфических антител, индукцию титров нейтрализующих антител, индукцию Т-клеток, реактогенность жидкой композиции, включая, например, индукцию врожденных иммунных ответов и так далее.

В предпочтительных воплощениях термин «стабильный» относится к целостности РНК.

Термин «целостность РНК» обычно описывает, присутствует ли полная последовательность РНК в жидкой композиции. Низкая целостность РНК может быть связана, среди прочего, с деградацией РНК, расщеплением РНК, неправильным или неполным химическим синтезом РНК, неправильным спариванием оснований, интеграцией модифицированных нуклеотидов или модификацией уже интегрированных нуклеотидов, отсутствием или неполным кэпированием, отсутствием полиаденилирования или неполным полиаденилированием или неполной транскрипцией РНК *in vitro*. РНК представляет собой хрупкую молекулу, которая может легко разлагаться, что может быть вызвано, например, температурой, действием рибонуклеаз, рН или другими факторами (например, нуклеофильными атаками, гидролизом и так далее), которые могут снижать целостность РНК и, следовательно, функциональность РНК.

В предпочтительных воплощениях РНК композиции имеет целостность РНК по меньшей мере примерно 50%, предпочтительно по меньшей мере примерно 60%, более

предпочтительно по меньшей мере примерно 70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 80% или примерно 90%. РНК подходящим образом определяют с помощью аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), предпочтительно аналитической обращенно-фазовой HPLC (RP-HPLC).

Квалифицированный специалист может выбирать из множества различных хроматографических или электрофоретических методов для определения целостности РНК. Хроматографические и электрофоретические методы хорошо известны в данной области техники. В случае использования хроматографии (например, RP-HPLC) анализ целостности РНК может быть основан на определении площади пика (или «площади под пиком») полноразмерной РНК на соответствующей хроматограмме. Площадь пика может быть определена с помощью любого подходящего программного обеспечения, которое оценивает сигналы детекторной системы. Процесс определения площади пика также называется интегрированием. Площадь пика, представляющая полноразмерную РНК, обычно устанавливается по отношению к площади пика общей РНК в соответствующем образце. Целостность РНК может быть выражена в % целостности РНК.

В контексте аспектов настоящего изобретения целостность РНК можно определить с помощью аналитической (RP)HPLC. Как правило, тестируемый образец жидкой композиции, содержащей носитель на липидной основе, инкапсулирующий РНК, может быть обработан детергентом (например, примерно 2% Triton X100) для диссоциации носителя на липидной основе и высвобождения инкапсулированной РНК. Высвобожденная РНК может быть захвачена с использованием подходящих связывающих соединений, например, гранул Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США), по существу в соответствии с инструкциями производителя. После подготовки образца РНК можно провести аналитическую (RP)HPLC для определения целостности РНК. Как правило, для определения целостности РНК образцы РНК можно разводить до концентрации 0,1 г/л, используя, например, воду для инъекций (WFI). Примерно 10 мкл разбавленного образца РНК можно ввести в колонку HPLC (например, монолитную матрицу поли(стирол-дивинилбензол)). Аналитическую (RT)HPLC можно проводить, используя стандартные условия, например: градиент 1: буфер А (0,1 М ТЕАА (рН 7,0)); буфер В (0,1 М ТЕАА (рН 7,0), содержащий 25% ацетонитрила). Начиная с 30% буфера В, градиент увеличивался до 32% буфера В за 2

минуты, после чего происходило увеличение до 55% буфера В в течение 15 минут при скорости потока 1 мл/мин. Хроматограммы HPLC обычно регистрируют при длине волны 260 нм. Полученные хроматограммы могут быть оценены с использованием программного обеспечения, и относительная площадь пика может быть определена в процентах (%), как это общеизвестно в данной области техники. Относительная площадь пика указывает количество РНК, которое имеет 100% целостность РНК. Поскольку количество РНК, введенной в HPLC, обычно известно, анализ относительной площади пика дает информацию о целостности РНК. Таким образом, если, например, всего было введено 100 нг РНК и 100 нг определены как относительная площадь пика, целостность РНК будет равна 100%. Если, например, относительная площадь пика будет соответствовать 80 нг, целостность РНК составит 80%. Соответственно, целостность РНК в контексте изобретения настоящего определяют с помощью аналитической HPLC, предпочтительно аналитической RP-HPLC.

В предпочтительных воплощениях 80% РНК, содержащейся в жидкой композиции, инкапсулировано, предпочтительно 85% РНК, содержащейся в композиции, инкапсулировано, 90% РНК, содержащейся в композиции, инкапсулировано, наиболее предпочтительно 95% или более РНК, содержащейся в композиции, инкапсулировано. Процент инкапсуляции можно определить с помощью анализа с реагентом Ribogreen, известного в данной области техники.

В воплощениях композиция содержит по меньшей мере один антагонист по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора. Такой антагонист предпочтительно может быть включен в состав вместе с носителями на липидной основе, определенными в настоящем документе.

Подходящие антагонисты по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора раскрыты в патентной заявке согласно РСТ РСТ/ЕР2020/072516, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В частности, включено описание, относящееся к подходящему антагонисту по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора, приведенное в любом из пп. 1-94 формулы изобретения заявки РСТ/ЕР2020/072516.

В предпочтительных воплощениях композиция содержит по меньшей мере один антагонист по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего

рецептора, выбранного из Toll-подобного рецептора, предпочтительно TLR7 и/или TLR8.

В воплощениях по меньшей мере один антагонист по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора выбран из нуклеотида, аналога нуклеотида, нуклеиновой кислоты, пептида, белка, малой молекулы, липида или фрагмента, варианта или производного любого из них.

В предпочтительных воплощениях по меньшей мере один антагонист по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, предпочтительно одноцепочечный РНК-олигонуклеотид.

В воплощениях антагонист по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, который содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-212 из РСТ/EP2020/072516 или фрагментов любой из этих последовательностей.

В предпочтительных воплощениях антагонист по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, который содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-87, 149-212 РСТ/EP2020/072516, или фрагментов любой из этих последовательностей.

Особенно предпочтительным антагонистом по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора в контексте настоящего изобретения является 5'-GAG CGmG CCA-3' (SEQ ID NO: 85 из РСТ/EP2020/072516) или его фрагмент.

В воплощениях мольное отношение по меньшей мере одного антагониста по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора, определенного в настоящем документе, к по меньшей мере одной нуклеиновой

кислоте, предпочтительно РНК, кодирующей антигенный пептид или белок SRAS-CoV-2, определенной в настоящем документе, соответственно находится в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 100:1 или находится в диапазоне от примерно 20:1 до примерно 80:1.

В воплощениях массовое отношение по меньшей мере одного антагониста по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора, определенного в настоящем документе, к по меньшей мере одной нуклеиновой кислоте, предпочтительно РНК, кодирующей антигенный пептид или белок SRAS-CoV-2, определенной в настоящем документе, соответственно находится в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 1:30 или в диапазоне от примерно 1:2 до примерно 1:10.

### **Вакцина:**

В третьем аспекте настоящего изобретения предложена вакцина, например, вакцина против коронавируса SARS-CoV-2 (ранее nCoV-2019), вызывающего заболевание COVID-19. Указанная вакцина может быть эффективна против нескольких коронавирусов SARS-CoV-2. Вакцина также может быть эффективна как против одного или более коронавирусов SARS-CoV-2, так и против одного или более некоронавирусов (например, вакцина может быть эффективна как против вируса SARS-CoV-2, так и против вируса гриппа).

В предпочтительных воплощениях четвертого аспекта вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту (например, ДНК или РНК), предпочтительно по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту или композицию согласно второму аспекту.

В других воплощениях вакцина содержит по меньшей мере один полипептид, определенный в третьем аспекте.

В других воплощениях вакцина содержит по меньшей мере одну плазмидную ДНК или ДНК аденовируса, определенную в первом аспекте.

Примечательно, что воплощения, относящиеся к композиции согласно второму аспекту, также могут быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения вакцины согласно четвертому аспекту. Кроме того, воплощения, относящиеся к вакцине согласно четвертому аспекту, также могут быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения композиции согласно второму аспекту. Кроме того, признаки и воплощения, описанные в контексте первого аспекта (нуклеиновая кислота согласно

настоящему изобретению), должны быть истолкованы и должны быть поняты как подходящие воплощения четвертого аспекта.

Термин «вакцина» будет известен и понятен специалисту в данной области техники, и, например, и, например, предназначен для обозначения профилактического или терапевтического материала, обеспечивающего по меньшей мере один эпитоп или антиген, предпочтительно иммуноген. В контексте настоящего изобретения антиген или антигенная функция соответствующим образом обеспечены нуклеиновой кислотой согласно настоящему изобретению в соответствии с первым аспектом (указанная нуклеиновая кислота содержит кодирующую последовательность, кодирующую антигенный пептид или белок, полученный из коронавируса SARS-CoV-2), или композицией согласно второму аспекту (содержащей по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту согласно первому аспекту). В других воплощениях антиген или антигенная функция обеспечена полипептидом согласно настоящему изобретению в соответствии с третьим аспектом.

В предпочтительных воплощениях вакцина или композиция согласно второму аспекту вызывает адаптивный иммунный ответ, предпочтительно адаптивный иммунный ответ против коронавируса, предпочтительно против коронавируса SARS-CoV-2.

В особенно предпочтительных воплощениях вакцина или композиция согласно второму аспекту вызывает выработку функциональных антител, которые могут эффективно нейтрализовать вирус, предпочтительно коронавирус SARS-CoV-2.

В других предпочтительных воплощениях вакцина или композиция согласно второму аспекту индуцирует обеспечиваемый IgA иммунитет слизистых оболочек путем индукции антител IgA слизистых оболочек.

В особенно предпочтительных воплощениях вакцина или композиция согласно второму аспекту вызывает выработку функциональных антител, которые могут эффективно нейтрализовать вирус, предпочтительно коронавирус SARS-CoV-2.

В других особенно предпочтительных воплощениях вакцина или композиция согласно второму аспекту индуцирует функциональный клеточный ответ Т-клеток с широким спектром действия против коронавируса, предпочтительно против коронавируса SARS-CoV-2.

В других особенно предпочтительных воплощениях вакцина или композиция согласно второму аспекту индуцирует сбалансированный В-клеточный и Т-клеточный ответ против коронавируса, предпочтительно против коронавируса SARS-CoV-2.

В соответствии с предпочтительным воплощением вакцина, определенная в настоящем документе, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель и, возможно, по меньшей мере один адъювант, как указано в контексте второго аспекта.

Подходящие адъюванты в этом контексте могут быть выбраны из адъювантов, раскрытых в пункте 17 формулы изобретения WO 2016/203025.

В предпочтительном воплощении вакцина представляет собой моновалентную вакцину.

Термины «моновалентная вакцина», «моновалентная композиция», «одновалентная вакцина» или «одновалентная композиция» будут известны и понятны специалисту в данной области техники и, например, предназначены для обозначения композиции или вакцины, содержащей только один антиген или антигенную конструкцию из патогена. Соответственно, указанная вакцина или композиция содержит только один вид нуклеиновой кислоты, кодирующий один антиген или антигенную конструкцию одного организма. Термин «моновалентная вакцина» включает иммунизацию против одного возбудителя. В контексте настоящего изобретения моновалентная вакцина или композиция против коронавируса SARS-CoV-2 должны содержать по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую один единственный антигенный пептид или белок, полученный из одного конкретного коронавируса SARS-CoV-2.

В воплощениях вакцина представляет собой поливалентную вакцину, содержащую множество или по меньшей мере более одного из видов нуклеиновых кислот, определенных в контексте первого аспекта. Воплощения, относящиеся к поливалентной композиции, раскрытой в контексте второго аспекта, также могут быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения поливалентной вакцины.

Термины «поливалентная вакцина», «поливалентная композиция», «мультивалентная вакцина» или «мультивалентная композиция» будут известны и понятны специалистам в данной области техники и, например, предназначены для обозначения композиции или вакцины, содержащей антигены из более чем одного вируса (например, разных изолятов коронавируса SARS-CoV-2), или содержащей



разные антигены или антигенные конструкции одного и того же коронавируса SARS-CoV-2, или любую их комбинацию. Данные термины описывают, что указанная вакцина или композиция имеет более одной валентности. В контексте настоящего изобретения поливалентная вакцина против коронавируса SARS-CoV-2 должна содержать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антигенные пептиды или белки, полученные из нескольких разных коронавирусов SARS-CoV-2 (например, разных изолятов коронавируса SARS-CoV-2), или содержать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие разные антигены или антигенные конструкции одного и того же коронавируса SARS-CoV-2 или их комбинации.

В предпочтительных воплощениях поливалентная или мультивалентная вакцина включает по меньшей мере одну поливалентную композицию, определенную во втором аспекте. Особенно предпочтительными являются поливалентные композиции, определенные в разделе «Поливалентные композиции согласно настоящему изобретению».

В некоторых воплощениях вакцина содержит по меньшей мере один антагонист по меньшей мере одного РНК-чувствительного паттерн-распознающего рецептора, определенный во втором аспекте.

Вакцина, как правило, содержит безопасное и эффективное количество нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), предпочтительно РНК согласно первому аспекту или композиции согласно второму аспекту (или полипептида согласно третьему аспекту). Используемый в настоящем документе термин «безопасное и эффективное количество» означает количество нуклеиновой кислоты или композиции, достаточное для того, чтобы вызвать значительную положительную модификацию течения заболевания или расстройства, связанного с инфекцией коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2. В то же время «безопасное и эффективное количество» достаточно мало, чтобы избежать серьезных побочных эффектов. В отношении нуклеиновой кислоты, композиции или вакцины согласно настоящему изобретению выражение «безопасное и эффективное количество» предпочтительно означает количество нуклеиновой кислоты, композиции или вакцины, подходящее для стимуляции адаптивной иммунной системы против коронавируса таким образом, чтобы не было чрезмерных или повреждающих иммунных реакций (например, врожденных иммунных ответов).

«Безопасное и эффективное количество» нуклеиновой кислоты, композиции или вакцины, определенное выше, будет различным в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, а также от возраста и физического состояния пациента, подлежащего лечению, тяжести состояния, продолжительности лечения, характера сопутствующей терапии, конкретного применяемого фармацевтически приемлемого носителя и подобных факторов в пределах знаний и опыта специалиста в данной области техники. Более того, «безопасное и эффективное количество» нуклеиновой кислоты, композиции или вакцины может зависеть от пути введения/доставки (внутрикожно, внутримышечно, интраназально), устройства для введения (устройство для струйной инъекции, устройство для инъекции иглой, пластырь с микроиглами, устройство для электропорации) и /или комплексообразования/приготовления состава (комплексообразование с протамином или инкапсуляция в LNP, ДНК или РНК). Более того, «безопасное и эффективное количество» нуклеиновой кислоты, композиции или вакцины может зависеть от физического состояния субъекта, подвергающегося лечению (ребенок раннего возраста, беременная женщина, субъект с иммунодефицитным состоянием и так далее).

Вакцину можно применять согласно настоящему изобретению для медицинских целей в случае человека, а также для ветеринарных целей (в случае млекопитающих, позвоночных или видов птиц).

Используемый в настоящем документе фармацевтически приемлемый носитель предпочтительно включает жидкую или нежидкую основу вакцины. Если вакцина представлена в жидкой форме, носителем будет вода, как правило апиrogenная вода; изотонический солевой раствор или буферные (водные) растворы, например, фосфатные, цитратные и другие буферные растворы. Предпочтительно в качестве жидкой основы для вакцины или композиции согласно настоящему изобретению применяют раствор Рингера-лактат, как описано в публикации WO2006/122828, содержание которой, относящееся к подходящим буферным растворам, включено в настоящий документ посредством ссылки. Другие предпочтительные растворы, применяемые в качестве жидкой основы для вакцины или композиции, в частности, для композиций/вакцин, содержащих LNP, включают сахарозу и/или трегалозу.

Выбор фармацевтически приемлемого носителя, определенного в настоящем документе, определяется, в принципе, способом, которым вводят фармацевтическую композицию (композиции) или вакцину согласно настоящему изобретению. Вакцину

предпочтительно вводят местно. Пути местного введения в целом включают, например, пути местного введения, а также внутрикожные, трансдермальные, подкожные или внутримышечные инъекции или внутриочаговые, внутричерепные, внутрилегочные, внутрисердечные, внутрисуставные и подъязычные инъекции. Более предпочтительно, композицию или вакцины согласно настоящему изобретению можно вводить внутрикожным, подкожным или внутримышечным путем, предпочтительно посредством инъекции, которая может быть безыгольной и/или с применением иглы. Предпочтительной в контексте настоящего изобретения является внутримышечная инъекция. Поэтому композиции/вакцины предпочтительно готовят в жидкой или твердой форме. Подходящее количество вакцины или композиции согласно настоящему изобретению для введения можно определить с помощью обычных экспериментов, например, с применением моделей на животных. Такие модели включают, без каких-либо ограничений, модели кроликов, овец, мышей, крыс, собак и приматов, отличных от человека. Предпочтительные стандартные лекарственные формы для инъекций содержат стерильные водные растворы, физиологический раствор или их смеси. рН таких растворов следует довести примерно до 7,4.

Вакцина или композиция, определенные в настоящем документе, могут содержать одно или более вспомогательных веществ или адъювантов, определенных выше, для дополнительного повышения иммуногенности. Таким образом, предпочтительно достигается синергетическое действие нуклеиновой кислоты, содержащейся в композиции/вакцине, и вспомогательного вещества, которое, возможно, может быть приготовлено совместно (или приготовлено отдельно) с вакциной или композицией, описанными выше. Такие агенты или соединения, повышающие иммуногенность, могут быть представлены отдельно (не в составе с вакциной или композицией) и могут быть введены индивидуально.

Вакцина предпочтительно представлена в лиофилизированной или высушенной распылением форме (как описано в контексте второго аспекта). Такая лиофилизированная или высушенная распылением вакцина обычно содержит трегалозу и/или сахарозу, и ее восстанавливают в подходящем жидком буфере перед введением субъекту. В некоторых аспектах лиофилизированная вакцина согласно воплощениям содержит мРНК согласно воплощениям в комплексе с LNP. В некоторых аспектах содержание воды в лиофилизированной композиции составляет менее примерно 10%. Например, содержание воды в лиофилизированной композиции может составлять

примерно от 0,1% до 10%, от 0,1% до 7,5% или от 0,5% до 7,5%, предпочтительно содержание воды в лиофилизированной композиции составляет от примерно 0,5% до примерно 5,0%.

В предпочтительных воплощениях введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида, вакцины индуцирует титр нейтрализующих антител против коронавируса SARS-CoV-2 у субъекта.

В некоторых воплощениях титр нейтрализующих антител составляет по меньшей мере 100 нейтрализующих единиц на миллилитр (NU/мл), по меньшей мере 500 NU/мл или по меньшей мере 1000 NU/мл.

В некоторых воплощениях определяемые уровни антигена коронавируса вырабатываются у субъекта в период от примерно 1 до примерно 72 часов после введения нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида или вакцины.

В некоторых воплощениях титр нейтрализующих антител (против коронавируса) составляет по меньшей мере 100 NU/мл, по меньшей мере 500 NU/мл или по меньшей мере 1000 NU/мл в сыворотке субъекта в период от примерно 1 дня до примерно 72 дней после введения нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида или вакцины.

В некоторых воплощениях титр нейтрализующих антител достаточен для снижения коронавирусной инфекции по меньшей мере на 50% по отношению к титру нейтрализующих антител у невакцинированного контрольного субъекта или по отношению к титру нейтрализующих антител у субъекта, вакцинированного живой аттенуированной вирусной вакциной, инактивированной вирусной вакциной или субъединичной белковой вирусной вакциной.

В некоторых воплощениях титр нейтрализующих антител и/или Т-клеточный иммунный ответ достаточен для снижения частоты бессимптомной вирусной инфекции по сравнению с титром нейтрализующих антител у невакцинированных контрольных субъектов.

В некоторых воплощениях титр нейтрализующих антител и/или Т-клеточный иммунный ответ достаточен для предотвращения латентного существования вируса у субъекта.

В некоторых воплощениях титр нейтрализующих антител достаточен для блокирования слияния вируса с эпителиальными клетками субъекта.

В некоторых воплощениях титр нейтрализующих антител индуцируется в течение 20 дней после однократного введения дозы 1 мкг-100 мкг нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида или вакцины или в течение 40 дней после введения второй дозы 1 мкг-100 мкг нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида или вакцины.

В предпочтительных воплощениях введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида или вакцины индуцирует Т-клеточный иммунный ответ против коронавируса у субъекта. В ряде случаев Т-клеточный иммунный ответ включает иммунный ответ CD4+ Т-клеток и/или иммунный ответ CD8+ Т-клеток.

**Набор или составной набор, применение, медицинское применение, способ лечения:**

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложен набор или составной набор, пригодный для лечения или предупреждения коронавирусной инфекции. Предпочтительно указанный набор или составной набор подходит для лечения или предупреждения коронавируса, предпочтительно коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (ранее nCoV-2019).

Примечательно, что воплощения, относящиеся к нуклеиновой кислоте согласно первому аспекту, композиции согласно второму аспекту, полипептиду согласно третьему аспекту и вакцине согласно четвертому аспекту, также могут быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения набора или составного набора согласно пятому аспекту настоящего изобретения.

В предпочтительных воплощениях набор или составной набор содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту (например, РНК или ДНК), предпочтительно по меньшей мере одну РНК согласно первому аспекту, по меньшей мере одну композицию согласно второму аспекту и/или по меньшей мере один полипептид согласно третьему аспекту и/или по меньшей мере одну вакцину согласно четвертому аспекту.

В воплощениях набор или составной набор содержит по меньшей мере одну ДНК, определенную в первом аспекте, например, по меньшей мере одну плазмидную ДНК и/или по меньшей мере одну ДНК аденовируса.

В воплощениях набор или составной набор содержит по меньшей мере один полипептид, определенный в третьем аспекте.

Кроме того, набор или составной набор может включать жидкий носитель для сольюбилизации и/или технические инструкции, содержащие информацию о введении и дозировке компонентов.

Набор может дополнительно содержать дополнительные компоненты, описанные в контексте композиции согласно второму аспекту и/или вакцины согласно четвертому аспекту.

Технические инструкции к указанному набору могут содержать информацию о введении и дозировке, а также о группах пациентов. Такие наборы, предпочтительно составные наборы, можно применять, например, для любого из введений или применений, упомянутых в настоящем документе, предпочтительно для применения нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, композиции согласно второму аспекту, полипептида согласно третьему аспекту или вакцины согласно четвертому аспекту для лечения или профилактики инфекции или заболеваний, вызванных коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или связанных с ним заболеваний.

Предпочтительно нуклеиновая кислота, композиция, полипептид или вакцина представлены в виде отдельной части набора, где нуклеиновая кислота, композиция, полипептид или вакцина предпочтительно лиофилизированы.

Набор может дополнительно содержать в качестве части носитель (например, буферный раствор) для сольюбилизации нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида или вакцины.

В предпочтительных воплощениях набор или составной набор, определенный в настоящем документе, содержит раствор Рингера-лактат.

В предпочтительных воплощениях набор или составной набор, определенный в настоящем документе, содержит многодозовую емкость для введения композиции/вакцины.

Любой из указанных выше наборов можно применять для лечения или профилактики, как определено в настоящем документе. Более предпочтительно любой из указанных выше наборов можно применять в качестве вакцины, предпочтительно вакцины против инфекций, вызванных коронавирусом, предпочтительно вызванных коронавирусом SARS-CoV-2.

В предпочтительных воплощениях набор или составной набор включает следующие компоненты:

a) по меньшей мере одну емкость или флакон, содержащие композицию или вакцину против SARS-CoV-2, определенную в настоящем документе, где концентрация нуклеиновой кислоты в композиции или вакцине против SARS-CoV-2, предпочтительно концентрация РНК находится в диапазоне примерно 100 мкг/мл до примерно 1 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от примерно 100 мкг/мл до примерно 500 мкг/мл, например, примерно 270 мкг/мл;

b) по меньшей мере одну емкость или флакон для разведения, содержащие стерильный буфер для разведения, предпочтительно буфер, содержащий NaCl, возможно, содержащий консервант;

c) по меньшей мере одно средство для переноса композиции или вакцины из емкости для хранения в емкость для разведения; и

d) по меньшей мере один шприц для введения конечной разведенной композиции или вакцины субъекту, предпочтительно выполненный для внутримышечного введения человеку, где конечная разведенная композиция или вакцина имеет концентрацию нуклеиновой кислоты, предпочтительно концентрацию РНК в диапазоне примерно от 10 мкг/мл до примерно 100 мкг/мл, предпочтительно в диапазоне от примерно 10 мкг/мл до примерно 50 мкг/мл, например, примерно 24 мкг/мл.

В одном из воплощений набор или составной набор содержит более одной композиции/вакцины против SARS-CoV-2 на основе мРНК, предпочтительно

- по меньшей мере одну вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 163, 149 или 24837, *предпочтительно* приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)). Предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована; и/или

- по меньшей мере одну дополнительную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23529-23534, 27386-27408, 23535-23552, 27409-2743 1, 23590-23606, 27478-27500, 28736-28776, 28638 -28686, 28777-28825, 28925-28928, 28933-28936, *предпочтительно* приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)). Предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована; и/или

- по меньшей мере одну дополнительную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, 28650-28655, 28789-28794, предпочтительно приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (при n = 49 или при n = 45 (ALC-0159)). Предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована; и/или

- по меньшей мере одну дополнительную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%



идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27394, 27417, 27486, 28762, предпочтительно приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (при n = 49 или при n = 45 (ALC-0159)). Предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована; и/или

- по меньшей мере одну дополнительную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28639-28642, 28778-28781, 28925-28928, 28933-28936, предпочтительно приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)). Предпочтительно нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не является химически модифицированной.

В одном из воплощений набор или составной набор содержит более одной композиции/вакцины против SARS-CoV-2 на основе мРНК, предпочтительно

- по меньшей мере одну вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 163, 149 или 24837, *предпочтительно* приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)). Предпочтительно,

чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована; и/или

- по меньшей мере одну дополнительную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где композиция/вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 24837-24854, 27524-27546, 24855-24872, 27547-27569, 24909-24926, 27616-27638, 28827-28866, 28687-28735, 28867-28915, 28929-28932, 28937-28940, предпочтительно приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (при  $n = 49$  или с  $n = 45$  (ALC-0159)). Предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована; и/или

- по меньшей мере одну дополнительную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, 28699-28704, 28879-28884, предпочтительно приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (при  $n = 49$  или при  $n = 45$  (ALC-0159)). Предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована; и/или

- по меньшей мере одну дополнительную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27532, 27555, 27624, 28852, предпочтительно приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (при n = 49 или при n = 45 (ALC-0159)). Предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована; и/или

- по меньшей мере одну дополнительную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, которая идентична или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28688-28691, 28868-28871, 28929-28932, 28937-28940, предпочтительно приготовленную в липидных наночастицах (LNP), которые имеют мольное отношение приблизительно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 долей (мол.%) катионного липида III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерина и PEG-липиды формулы (IVa) (с n = 49 или с n = 45 (ALC-0159)). Предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, не была химически модифицирована.

В одном из воплощений набор или составной набор содержит две разные вакцины против SARS-CoV-2 для праймирующей вакцинации и бустерной вакцинации:

- по меньшей мере одну **праймирующую вакцину**, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная вакцина представляет собой вакцину против SARS-CoV-2 на основе мРНК, определенную в настоящем документе; и

- по меньшей мере одну **бустерную вакцину**, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина представляет собой вакцину против SARS-CoV-2 на основе аденовируса, определенную в настоящем документе.

В одном из воплощений набор или составной набор содержит две разные вакцины против SARS-CoV-2 для праймирующей вакцинации и бустерной вакцинации:

- по меньшей мере одну бустерную вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная вакцина представляет собой вакцину против SARS-CoV-2 на основе мРНК, определенную в настоящем документе; и

- по меньшей мере одну праймирующую вакцину, определенную в настоящем документе, представленную в первом флаконе или емкости, где указанная композиция/вакцина представляет собой вакцину против SARS-CoV-2 на основе аденовируса, определенную в настоящем документе.

### **Комбинация:**

Пятый **аспект** относится к комбинации по меньшей мере двух последовательностей нуклеиновых кислот, определенных в первом аспекте, по меньшей мере двух композиций, определенных в контексте второго аспекта, по меньшей мере двух полипептидов, определенных в третьем аспекте, по меньшей мере двух вакцин, определенных в контексте четвертого аспекта, или по меньшей мере двух наборов, определенных в пятом аспекте.

В контексте настоящего изобретения термин «комбинация» предпочтительно означает совместное нахождение по меньшей мере двух компонентов, предпочтительно по меньшей мере двух последовательностей нуклеиновых кислот, определенных в первом аспекте, по меньшей мере двух композиций, определенных в контексте второго аспекта, по меньшей мере двух полипептидов, определенных в третьем аспекте, по меньшей мере двух вакцин, определенных в контексте четвертого аспекта, или по меньшей мере двух наборов, определенных в пятом аспекте. Компоненты такой комбинации могут находиться в форме отдельных объектов. Таким образом, введение компонентов комбинации может осуществляться либо одновременно, либо в различное время, либо в одно и то же место введения, либо в различные места введения.

При этом, воплощения, относящиеся к нуклеиновой кислоте согласно первому аспекту, композиции согласно второму аспекту, полипептиду согласно третьему аспекту и вакцине согласно четвертому аспекту или набору или составному набору согласно пятому аспекту, также могут быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения компонентов комбинации согласно шестому аспекту.

В воплощениях комбинация может содержать множество или по меньшей мере более одного из видов нуклеиновых кислот, например, видов РНК, определенных в

контексте первого аспекта настоящего изобретения, где виды нуклеиновых кислот представлены в виде отдельных компонентов.

Предпочтительно комбинация, определенная в настоящем документе, может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более различных видов нуклеиновых кислот, например, видов РНК, определенных в контексте первого аспекта настоящего изобретения; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных композиций, определенных в контексте второго аспекта настоящего изобретения; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных полипептидов, определенных в контексте третьего аспекта настоящего изобретения; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных вакцин, определенных в контексте третьего аспекта настоящего изобретения, где виды нуклеиновых кислот, композиции, полипептиды, вакцины представлены в виде отдельных компонентов.

В воплощениях комбинация содержит 2, 3, 4 или 5 РНК, содержащихся в отдельных компонентах, предпочтительно виды РНК, где указанные виды нуклеиновых кислот содержат или состоят из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 149, 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23529-23534, 27386-27408, 23535-23552, 27409-27431, 23590-23606, 27478-27500, 28736-28776, 28638-28686, 28777-28825, 28925-28928, 28933-28936, и, возможно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, где каждый из 2, 3, 4 или 5 видов нуклеиновых кислот кодирует отличный от других антигенный пептид или белок коронавируса SARS-CoV-2.

В воплощениях комбинация содержит 2, 3, 4 или 5 РНК, содержащихся в отдельных компонентах, предпочтительно виды РНК, где указанные виды нуклеиновых кислот содержат или состоят из последовательности нуклеиновой кислоты, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24837-24854, 27524-27546, 24855-24872, 27547-27569, 24909-24926, 27616-27638, 28827-28866, 28687-28735, 28867-28915, 28929-28932, 28937-28940, и, возможно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, где каждый из 2, 3, 4 или 5

видов нуклеиновых кислот кодирует отличный от других антигенный пептид или белок коронавируса SARS-CoV-2.

Далее представлены особенно предпочтительные воплощения комбинации, где каждый компонент комбинации представлен в виде отдельного объекта.

Предпочтительно каждый из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более различных видов нуклеиновых кислот, композиций, вакцин комбинации кодирует отличный от других стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (определенный в первом аспекте). Предпочтительно стабилизация конформации до слияния достигается введением двух последовательных замен на пролин в остатках K986 и V987 в шиповидном белке (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1). Соответственно, в предпочтительных воплощениях каждый из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 стабилизированных в конформации до слияния шиповидных белков (S\_stab) содержит по меньшей мере одну стабилизирующую конформацию до слияния мутацию, где указанная по меньшей мере одна стабилизирующая конформация до слияния мутация включает следующие аминокислотные замены: K986P и V987P (положения аминокислот в референсной SEQ ID NO: 1).

Соответственно, каждый из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более различных видов нуклеиновых кислот, композиций, вакцин комбинации кодирует отличный от других стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок, где по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более стабилизированных шиповидных белков выбраны из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, 28540-28588, 28917-28920, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей.

В предпочтительных воплощениях комбинация содержит один вид нуклеиновой кислоты, композицию, вакцину, содержащие кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 10, где мультивалентная

композиция дополнительно содержит по меньшей мере 2, 3, 4 дополнительных вида РНК, выбранных из

1) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22961; и/или

2) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22960; и/или

3) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22963; и/или

4) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22959;

5) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27070, 27093;

6) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27071, 27094;

7) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27072, 27095;

8) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 27073, 27096, 28545; и/или

9) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 22964.

10) одного вида нуклеиновой кислоты, содержащего кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, идентичную или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 28541-28544, 28917-28920.

Предпочтительно по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более различных видов нуклеиновых кислот, композиция, вакцина комбинации содержат кодирующие последовательности нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует отличный от других стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок, где по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более кодирующих последовательностей нуклеиновых кислот выбраны из последовательностей нуклеиновых кислот, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 116, 136, 137, 146, 148, 149, 151, 162, 163, 165, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 22819, 22821, 22823, 22825, 22827, 22829, 22831, 22833, 22835, 22837, 22839, 28916, 23089-23148, 23150-23184, 23309-23368, 23370-23404, 23529-23588, 23590-23624, 24837-24944, 27110-27907, 28589-28915,



28916, 28921-28940, или фрагментов или вариантов любой из указанных последовательностей. Предпочтительно каждый из видов мРНК содержит структуру cap1, и, возможно, каждый из видов мРНК не содержит модифицированных нуклеотидов.

В конкретном воплощении первый компонент комбинации содержит вакцину/композицию на основе вирусного вектора, такую как вакцина на основе аденовирусного вектора, например, ADZ1222 или Ad26.COV-2.S, а второй компонент содержит вакцину/композицию на основе нуклеиновой кислоты, предпочтительно вакцину на основе мРНК, определенную в настоящем документе.

**Первое и второе/дальнейшее медицинское применение:**

**Еще один аспект** относится к первому медицинскому применению предложенной нуклеиновой кислоты, композиции, вакцины, набора или комбинации.

При этом, воплощения, относящиеся к нуклеиновой кислоте согласно первому аспекту, композиции согласно второму аспекту, полипептиду согласно третьему аспекту и вакцине согласно четвертому аспекту, или набору или составному набору согласно пятому аспекту, или комбинации, также могут быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения медицинских применений настоящего изобретения.

Соответственно, в настоящем изобретении предложены по меньшей мере одна нуклеиновая кислота (например, ДНК или РНК), предпочтительно РНК, определенная в первом аспекте, для применения в качестве лекарственного средства, композиция, определенная во втором аспекте, для применения в качестве лекарственного средства, полипептид, определенный в третьем аспекте, для применения в качестве лекарственного средства, вакцина, определенная в четвертом аспекте, для применения в качестве лекарственного средства, и набор или составной набор, определенный в пятом аспекте, для применения в качестве лекарственного средства, а также комбинация.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено несколько назначений и применений указанных нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида, вакцины, или набора, или комбинации.

В частности, нуклеиновая кислота (предпочтительно РНК), композиция, полипептид, вакцина или набор, или комбинация могут быть применены для медицинских целей у человека, а также для ветеринарных медицинских целей, предпочтительно для медицинских целей у человека.

В частности, нуклеиновая кислота (предпочтительно РНК), композиция, полипептид, вакцина, или набор, или составной набор, или комбинация предназначены для применения в качестве лекарственного средства для медицинских целей у человека, где указанные нуклеиновая кислота (предпочтительно РНК), композиция, полипептид, вакцина, или набор, или составной набор могут быть подходящими для детей раннего возраста, новорожденных, реципиентов с иммунодефицитным состоянием, а также беременных и кормящих женщин и людей старшего возраста. В частности, нуклеиновая кислота (предпочтительно РНК), композиция, полипептид, вакцина, или набор, или составной набор предназначены для применения в качестве лекарственного средства для медицинских целей у человека, где указанные нуклеиновая кислота (предпочтительно РНК), композиция, полипептид, вакцина, или набор, или составной набор являются особенно подходящими для субъектов-людей старшего возраста.

Указанные нуклеиновая кислота (предпочтительно РНК), композиция, полипептид, вакцина, или набор, или комбинация предназначены для применения в качестве лекарственного средства для медицинских целей у человека, где указанные РНК, композиция, вакцина, или набор, или составной набор могут быть особенно подходящими для внутримышечной инъекции или внутрикожной инъекции.

В еще **одном аспекте** настоящее изобретение относится ко второму медицинскому применению предложенной нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида, вакцины, или набора, или комбинации.

Соответственно, в настоящем изобретении предложена по меньшей мере одна нуклеиновая кислота, предпочтительно РНК, определенная в первом аспекте, для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройства или заболевания, связанного с такой инфекцией, такого как COVID-19; композиция, определенная во втором аспекте, для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройства или заболевания, связанного с такой инфекцией, такого как COVID-19; полипептид, определенный в третьем аспекте, для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройства или заболевания, связанного с такой инфекцией, такого как COVID-19; вакцина, определенная в четвертом аспекте, для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройства или заболевания, связанного с такой инфекцией, такого как COVID-19;

набор или составной набор, определенный в пятом аспекте, для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройства или заболевания, связанного с такой инфекцией, такого как COVID-19; комбинация, определенная в шестом аспекте, для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройства или заболевания, связанного с такой инфекцией, такого как COVID-19.

В воплощениях нуклеиновая кислота, предпочтительно РНК согласно первому аспекту, композиция согласно второму аспекту, полипептид согласно третьему аспекту, вакцина согласно четвертому аспекту, или набор или составной набор согласно пятому аспекту, или комбинация согласно шестому аспекту предназначены для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2.

В частности, нуклеиновая кислота, предпочтительно РНК согласно первому аспекту, композиция согласно второму аспекту, полипептид согласно третьему аспекту, вакцина согласно четвертому аспекту, или набор или составной набор согласно пятому аспекту, или комбинация согласно шестому аспекту могут быть применены в способе профилактического (предэкспозиционная профилактика или постэкспозиционная профилактика) и/или терапевтического лечения инфекций, вызванных коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2.

В частности, нуклеиновая кислота, предпочтительно РНК согласно первому аспекту, композиция согласно второму аспекту, полипептид согласно третьему аспекту, вакцина согласно четвертому аспекту, или набор или составной набор согласно пятому аспекту, или комбинация согласно шестому аспекту могут быть применены в способе профилактического (предэкспозиционная профилактика или постэкспозиционная профилактика) и/или терапевтического лечения заболевания COVID-19, вызванного инфекцией коронавирусом SARS-CoV-2.

Нуклеиновая кислота, композиция, полипептид, или вакцина, или комбинация предпочтительно могут быть применены местно. В частности, композиции, или полипептиды, или вакцины, или комбинации могут быть введены внутрикожным, подкожным, интраназальным или внутримышечным путем. В воплощениях нуклеиновая кислота, композиция, полипептид, вакцина согласно настоящему изобретению могут быть введены посредством обычной инъекции иглой или

безыгольной струйной инъекции. Предпочтительной в этом контексте является внутримышечная инъекция.

В воплощениях, в которых плазмидная ДНК применяется и содержится в композиции, или вакцине, или комбинации, указанная композиция/вакцина/комбинация может быть введена путем электропорации с применением устройства для электропорации, например, устройства для электропорации для внутрикожной или внутримышечной доставки. Может быть подходящим образом применено устройство, описанное в источнике US7245963B2, в частности, устройство, определенное в пунктах формулы изобретения 1-68 US7245963B2.

В воплощениях, в которых ДНК аденовируса применяется и содержится в композиции, или вакцине, или комбинации, указанная композиция/вакцина/комбинация может быть введена интраназальным путем.

В воплощениях нуклеиновую кислоту, содержащуюся в композиции, или вакцине, или комбинации, определенных в настоящем документе, обеспечивают в количестве от примерно 100 нг до примерно 500 мкг, в количестве от примерно 1 мкг до примерно 200 мкг, в количестве от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг, в количестве от примерно 5 мкг до примерно 100 мкг, предпочтительно в количестве от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг, в частности, в количестве примерно 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 8 мкг, 9 мкг, 10 мкг, 11 мкг, 12 мкг, 13 мкг, 14 мкг, 15 мкг, 16 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 55 мкг, 60 мкг, 65 мкг, 70 мкг, 75 мкг, 80 мкг, 85 мкг, 90 мкг, 95 мкг или 100 мкг.

В некоторых воплощениях вакцина, содержащая нуклеиновую кислоту, или композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, приготовлена в количестве, эффективном для достижения специфичного в отношении антигена иммунного ответа у субъекта. В некоторых воплощениях эффективное количество нуклеиновой кислоты составляет общую дозу от 1 мкг до 200 мкг, от 1 мкг до 100 мкг или от 5 мкг до 100 мкг.

В воплощениях, где нуклеиновая кислота представлена в носителе на липидной основе, например, LNP, количество PEG-липидов, определенного в настоящем документе, содержащегося в одной дозе, составляет менее примерно 50 мкг PEG-липидов, предпочтительно менее примерно 45 мкг PEG-липидов, более предпочтительно менее примерно 40 мкг PEG-липидов.

Наличие небольшого количества PEG-липидов в одной дозе может снизить риск побочных эффектов (например, аллергии).

В особенно предпочтительных воплощениях количество PEG-липидов, содержащегося в одной дозе, находится в диапазоне от примерно 3,5 мкг PEG-липидов до примерно 35 мкг PEG-липидов.

В воплощениях, где нуклеиновая кислота представлена в носителе на липидной основе, например, LNP, количество катионного липида, определенного в настоящем документе, содержащегося в одной дозе, составляет менее примерно 400 мкг катионного липида, предпочтительно менее примерно 350 мкг катионного липида, более предпочтительно менее примерно 300 мкг катионного липида.

Наличие небольшого количества катионного липида в одной дозе может снизить риск побочных эффектов (например, лихорадки).

В особенно предпочтительных воплощениях количество катионного липида, содержащегося в одной дозе, находится в диапазоне от примерно 30 мкг катионного липида до примерно 300 мкг катионного липида.

В одном из воплощений протокол иммунизации для лечения или профилактики субъекта против коронавируса, предпочтительно коронавируса SARS-CoV-2, включает одну однократную дозу композиции или вакцины.

В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 1 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 2 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 3 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 4 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 5 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 6 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 7 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 8 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 9 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 10 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В

некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 11 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 12 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 13 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 14 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 16 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 20 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 25 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 30 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 40 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 50 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 100 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 200 мкг, вводимую субъекту за одну вакцинацию. «Доза» в этом контексте относится к эффективному количеству нуклеиновой кислоты, предпочтительно мРНК, определенной в настоящем документе.

В предпочтительных воплощениях протокол иммунизации для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно инфекции коронавирусом SARS-CoV-2, включает серию однократных доз или введений композиции или вакцины. Однократная доза, используемая в настоящем документе, относится к начальной/первой дозе, второй дозе или любым дополнительным дозам, соответственно, которые предпочтительно вводят для «бустирования» иммунной реакции.

В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 1 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 2 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 3 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 4 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых

воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 5 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 6 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 7 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 8 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 9 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 10 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 11 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 12 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 13 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 14 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 16 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 20 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 25 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 30 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 40 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 50 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 100 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой дозу 200 мкг, вводимую субъекту всего два раза. «Доза» в этом контексте относится к эффективному количеству нуклеиновой кислоты, предпочтительно мРНК, определенной в настоящем документе.

В предпочтительных воплощениях вакцина/композиция/комбинация обеспечивает иммунную защиту субъекта от инфекции коронавирусом, предпочтительно от инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 (после введения, определенного в настоящем документе), в течение по меньшей мере 1 года,

предпочтительно по меньшей мере 2 лет. В предпочтительных воплощениях вакцина/композиция/комбинация обеспечивает иммунную защиту субъекта от коронавируса, предпочтительно от коронавируса SARS-CoV-2, в течение более чем 2 лет, более предпочтительно в течение более чем 3 лет, еще более предпочтительно в течение более чем 4 лет, даже более предпочтительно более чем 5-10 лет.

**Способ лечения и применение, способ диагностики и применение:**

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения расстройства.

При этом, воплощения, относящиеся к нуклеиновой кислоте согласно первому аспекту, композиции согласно второму аспекту, полипептиду согласно третьему аспекту и вакцине согласно четвертому аспекту, набору или составному набору согласно пятому аспекту, комбинации согласно шестому аспекту или медицинским применениям, также могут быть истолкованы и поняты как подходящие воплощения способов лечения, предложенных в настоящем документе. Кроме того, конкретные признаки и воплощения, относящиеся к способу лечения, предложенному в настоящем документе, также могут распространяться на медицинское применение настоящего изобретения.

Предупреждение (ингибирование) или лечение заболевания, в частности, коронавирусной инфекции, относится к ингибированию полного развития заболевания или состояния, например, у субъекта, подверженного риску заболевания, такого как коронавирусная инфекция. «Лечение» относится к терапевтическому вмешательству, которое улучшает признак или симптом заболевания или патологического состояния после того, как оно начало развиваться. Термин «улучшение» применительно к заболеванию или патологическому состоянию относится к любому наблюдаемому благоприятному эффекту лечения. Ингибирование заболевания может включать предупреждение или снижение риска заболевания, как то предупреждение или снижение риска вирусной инфекции. Благоприятный эффект может быть подтвержден, например, задержкой начала проявления клинических симптомов заболевания у восприимчивого субъекта, уменьшением тяжести некоторых или всех клинических симптомов заболевания, более медленным прогрессированием заболевания, снижением вирусной нагрузки, улучшением общего состояния здоровья или самочувствия субъекта или другими параметрами, специфичными для конкретного заболевания. «Профилактическое» лечение представляет собой лечение, проводимое у субъекта, у



которого не проявляются признаки заболевания или проявляются только первичные признаки, с целью снижения риска развития патологии.

В предпочтительных воплощениях настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения расстройства, где указанный способ включает нанесение или введение нуждающемуся в этом субъекту по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, композиции согласно второму аспекту, полипептида согласно третьему аспекту, вакцины согласно четвертому аспекту, или применение набора или составного набора согласно пятому аспекту, или комбинации согласно шестому аспекту.

В предпочтительных воплощениях расстройство представляет собой инфекцию коронавирусом или расстройство, связанное с такими инфекциями, в частности, инфекцию коронавирусом SARS-CoV-2 или расстройство, связанное с такими инфекциями, например, COVID-19.

В предпочтительных воплощениях настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения расстройства, определенного выше, где указанный способ включает нанесение или введение нуждающемуся в этом субъекту по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, композиции согласно второму аспекту, полипептида согласно третьему аспекту, вакцины согласно четвертому аспекту, или применение набора или составного набора согласно пятому аспекту, или комбинации согласно шестому аспекту, где нуждающийся субъект предпочтительно представляет собой субъекта-млекопитающее.

В некоторых воплощениях способ лечения или предупреждения заболевания путем нанесения или введения нуждающемуся в этом субъекту по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, композиции согласно второму аспекту, полипептида согласно третьему аспекту, вакцины согласно четвертому аспекту, или применения набора или составного набора согласно пятому аспекту, или комбинации согласно шестому аспекту дополнительно определяется как способ снижения бремени заболевания у субъекта. Например, указанный способ предпочтительно снижает тяжесть и/или длительность одного или более симптомов заболевания COVID-19. В некоторых аспектах способ снижает вероятность того, что субъекту потребуется госпитализация, госпитализация в отделение интенсивной терапии, лечение с помощью кислородной терапии и/или лечение с помощью аппарата искусственной вентиляции легких. В других аспектах способ снижает вероятность того,

что у субъекта разовьется лихорадка, затрудненность дыхания; снижение обоняния и/или снижение вкусовой чувствительности. В предпочтительных аспектах способ снижает вероятность того, что у субъекта разовьется тяжелое или умеренное заболевание COVID-19. В некоторых аспектах способ согласно воплощениям предупреждает тяжелое или умеренное заболевание COVID-19 у субъекта в период от примерно 2 недель до 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года или 2 лет после введения субъекту композиции согласно воплощениям. В предпочтительных аспектах способ согласно воплощениям предупреждает заболевание COVID-19 с клиническими симптомами. В других аспектах способ согласно воплощениям предупреждает появление обнаруживаемых уровней нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2 у субъекта в период от примерно 2 недель до 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года или 2 лет после введения субъекту композиции согласно воплощениям. В других аспектах способ согласно воплощениям определяется как способ обеспечения защитного иммунитета к коронавирусной инфекции (например, инфекции SARS-CoV-2) у субъекта. В других аспектах способ согласно воплощениям предупреждает умеренное и тяжелое заболевание COVID-19 по меньшей мере у 80%, 85%, 90% или 95% получающих лечение субъектов. В других аспектах способ согласно воплощениям предупреждает умеренное и тяжелое заболевание COVID-19 по меньшей мере у 80%, 85%, 90% или 95% получающих лечение субъектов в период от примерно 2 недель до примерно 1 года после введения второй или последующей иммуногенной композиции (например, бустерного введения). В других аспектах способ согласно воплощениям предупреждает умеренное и тяжелое заболевание COVID-19 по меньшей мере у 80%, 85%, 90% или 95% получающих лечение субъектов в период от примерно 2 недель до примерно 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 года, 1,5 лет, 2 лет или 3 лет после введения второй или последующей композиции.

В других аспектах способ согласно воплощениям включает (i) получение композиции (например, вакцинной композиции) согласно воплощениям, где композиция является лиофилизированной; (ii) растворение лиофилизированной композиции в фармацевтически приемлемом жидком носителе с получением жидкой композиции; и (iii) введение эффективного количества жидкой композиции субъекту. В некоторых аспектах содержание воды в лиофилизированной композиции составляет менее примерно 10%. Например, лиофилизированная композиция предпочтительно

может содержать от примерно 0,1% до примерно 10%, от 0,5% до 7,5% или от 0,5% до 5,0% воды.

В других аспектах способ согласно воплощениям включает введение вакцинной композиции, содержащей по меньшей мере две различных мРНК, каждая из которых кодирует отличный от другого шиповидный полипептид SARS-CoV-2, каждый из которых по меньшей мере примерно на 95% идентичен SEQ ID NO: 10 (например, в комплексе с LNP), субъекту. В других аспектах такой способ обеспечивает у субъекта иммунный ответ, достаточный для защиты субъекта от тяжелого заболевания COVID-19 в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев. Например, в некоторых аспектах субъект защищен от тяжелого заболевания COVID-19 в течение периода от примерно 6 месяцев до примерно 1 года, 1,5 лет, 2 лет, 2,5 лет, 3 лет, 4 лет или 5 лет. Таким образом, в некоторых аспектах способ согласно воплощениям обеспечивает вакцинную композицию для однократного применения, которая может обеспечить субъекту длительную (например, более 6 месяцев) защиту от тяжелого заболевания.

В настоящем документе тяжелое заболевание COVID-19 определяется как заболевание, при котором субъект, испытывает одно или более из следующего:

- Клинические признаки в покое, свидетельствующие о тяжелом системном заболевании (частота дыхания 30 вдохов в минуту или более, частота сердечных сокращений 125 в минуту или более, SpO<sub>2</sub> 93% или менее при комнатном воздухе на уровне моря или PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> менее 300 мм рт. ст. (корректируется в зависимости от высоты))

- Дыхательная недостаточность (определяется как потребность в высокопоточной оксигенации, неинвазивной вентиляции легких, механической вентиляции легких или экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЕСМО))

- Признаки шока (САД (систолическое артериальное давление) менее 90 мм рт. ст., ДАД (диастолическое артериальное давление) менее 60 мм рт. ст. или необходимость применения вазопрессорных средств)

- Существенная дисфункция почек, печени или неврологическая дисфункция

- Поступление в отделение интенсивной терапии

- Смерть

В настоящем документе умеренное заболевание COVID-19 определяется как заболевание, при котором субъект, испытывает одно или более из следующего:

- Одышка или затруднение дыхания

- Частота дыхания 20 вдохов в минуту или более
- не соответствующее норме значение SpO<sub>2</sub>, но при этом более 93% при комнатном воздухе на уровне моря (корректируется в зависимости от высоты)
- Клинические или рентгенографические признаки заболевания нижних дыхательных путей
- Рентгенологические признаки тромбоза глубоких вен (DVT)

В настоящем документе легкая форма заболевания COVID-19 определяется как заболевание, при котором субъект, испытывает все из следующего:

- Клинические симптомы И
- Отсутствие одышки или затруднения дыхания И
- Отсутствие гипоксемии (корректируется в зависимости от высоты) И
- Не соответствует критериям определения случая умеренного или тяжелого заболевания COVID-19.

В особенно предпочтительных воплощениях нуждающийся субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, например, новорожденного, беременную, человека с иммунодефицитным состоянием и/или человека старшего возраста. В некоторых воплощениях возраст субъекта составляет от 6 месяцев до 100 лет, от 6 месяцев до 80 лет, от 1 года до 80 лет, от 1 года до 70 лет, от 2 лет до 80 лет или от 2 лет до 60 лет. В других воплощениях субъект-человек представляет собой новорожденного или ребенка в возрасте не более 3 лет, не более 2 лет, не более 1,5 лет, не более 1 года (12 месяцев), не более 9 месяцев, 6 месяцев или 3 месяцев. В некоторых воплощениях субъект-человек представляет человека старшего возраста. В некоторых воплощениях субъект-человек представляет собой человека старшего возраста, возраст которого составляет по меньшей мере 50, 60, 65 или 70 лет. В других аспектах возраст субъекта, подлежащего лечению согласно воплощениям, составляет 61 год или более. В других аспектах возраст субъекта составляет от 18 до 60 лет.

В других воплощениях субъект-млекопитающее представляет собой человека в возрасте 60 лет или младше. В некоторых воплощениях субъект-человек представляет собой человека в возрасте 55, 50, 45 или 40 лет или младше. Таким образом, в некоторых воплощениях возраст субъекта-человека составляет от примерно 12 до 60; от 12 до 55; от 12 до 50; от 12 до 45 или от 12 до 40 лет. В других воплощениях возраст субъекта-человека составляет от примерно 18 до 60; от 18 до 55; от 18 до 50; от 18 до 45

или от 18 до 40 лет. В некоторых воплощениях возраст субъекта-человека составляет от 18 до 50 или от 18 до 40 лет.

В некоторых воплощениях субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, представляет собой беременного субъекта, такого как беременный человек. В некоторых аспектах субъект является беременным в течение более чем одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев или восьми месяцев.

В некоторых аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, имеет коренное американское, африканское, азиатское или европейское происхождение. В некоторых аспектах субъект имеет по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% коренное американское, африканское, азиатское или европейское происхождение. В некоторых аспектах субъект имеет коренное американское происхождение, как то по меньшей мере примерно на 10%, 25% или 50% коренное американское происхождение. В других аспектах субъект представляет собой субъекта старшего возраста, имеющего коренное американское происхождение, например, субъекта, возраст которого составляет по меньшей мере 55, 60, 65 или 70 лет.

В других аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, имеет заболевание или иммунодефицитное состояние. В некоторых аспектах субъект имеет заболевание печени, заболевание почек, диабет, гипертензию, заболевание сердца или заболевание легких. В других аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, представляет собой субъекта с аллергической реакцией в анамнезе, такого как субъект, имеющий пищевую аллергию. В некоторых аспектах субъект ранее имел аллергическую реакцию на вакцину, такую как анафилактическая реакция. В других аспектах субъект, подлежащий лечению в соответствии с указанными способами, представляет собой субъекта, имеющего обнаруживаемый уровень антител к PEG, как то обнаруживаемый уровень IgE к PEG в сыворотке.

В других аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, имеет по меньшей мере одно сопутствующее заболевание, выбранное из:

(1) Хронической болезни почек: функцию почек оценивают путем определения уровня креатинина в сыворотке за последние 3-6 месяцев, на основе которого определяют расчетную скорость клубочковой фильтрации (eGFR) с использованием уравнения Сотрудничества в области эпидемиологии хронических заболеваний почек

(СКД-ЕРІ), при этом нарушение функции почек определяют как eGFR менее 60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>.

- Легкая степень хронической болезни почек определяется как eGFR в диапазоне 60-89 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>.

- Умеренная степень хронической болезни почек определяется как eGFR в диапазоне 31–59 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> при стабильной терапии и хорошем поддерживающем лечении в течение по меньшей мере 6 месяцев (с изменениями из Clinical Practice Clinical Guidelines for Chronic Kidney Disease: Am J Kidney Dis, 2002).

(2) Хронической обструктивной болезни легких (СОРD) (включая эмфизему и хронический бронхит).

- Легкая СОРD с кашлем или выделением мокроты или без них определяется как объем форсированного выдоха за 1 секунду/форсированная жизненная емкость легких (FEV1/FVC) <0,7 и FEV1 ≥ 80% от расчетного.

- Умеренная СОРD с кашлем или выделением мокроты или без них определяется как FEV1/FVC <0,7 и FEV1 ≥ 50%, но <80% от расчетного при стабильном лечении (критерии GOLD для тяжести СОРD).

(3) Ожирения с индексом массы тела (ВМІ) >32 кг/м<sup>2</sup> - также будет включено любое тяжелое патологическое ожирение.

(4) Хронических сердечно-сосудистых заболеваний (сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, кардиомиопатии, артериальная гипертензия), включая следующие:

- Сердечная недостаточность класса I с потенциально высоким риском развития сердечной недостаточности в будущем при отсутствии функциональных или структурных нарушений сердца.

- Сердечная недостаточность класса II: субъекты с заболеванием сердца, приводящим к небольшому ограничению физической активности. Комфортное состояние в покое.

- Обычная физическая активность приводит к утомлению, ощущению сердцебиения, одышке или стенокардической боли.

- Сердечная недостаточность класса III с выраженным ограничением физической активности, но комфортным состоянием в покое, однако активность меньше обычной приводит к проявлению симптомов.

- Структурное заболевание сердца без симптомов на любой стадии.

- Легкая систолическая или диастолическая дисфункция левого желудочка, как правило, без выраженных клинических признаков.

- Умеренная левожелудочковая недостаточность с одышкой при физической нагрузке, или ортопноэ, или пароксизмальной ночной одышкой по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA), стабильное состояние при применении лекарственных средств (класс II-III).

- Ишемическая болезнь сердца с пороговым значением метаболического эквивалента (MET) 2 и выше вплоть до умеренной, стабильное состояние при применении лекарственных средств. (MET определяется как количество кислорода, потребляемого в состоянии покоя в положении сидя, и эквивалентен 3,5 мл O<sub>2</sub> на кг массы тела x мин; 4 - нормальное значение, субъект может подниматься по лестнице, подниматься в гору и может участвовать в других требующий усилий действиях; 1 - может позаботиться о себе, но может и не обслуживать себя и испытывать напряжение при нагрузках.)

- Кардиомиопатии неинфекционного и метаболического генеза со значением 2-3 MET при медикаментозном лечении.

- Гипертензия стадии 1 или гипертензия стадии 2, стабильна и контролируется помощью лекарственных средств.

(5) Хронической ВИЧ-инфекции со стабильной авиремией (менее 50 копий/мл) и количеством CD4 более 350/мл, что подтверждается образцами крови, взятыми в течение 12 месяцев до включения в исследование. (Допускается вирусная нагрузка менее 50 копий/мл с преходящими изменениями в диапазоне 50-350 копий/мл.)

(6) Сахарного диабета типа 2, как контролируемого с помощью лекарственных средств [гемоглобин A1c (HbA1c) менее 58 ммоль/моль (7,45%)], так и неконтролируемого с недавним уровнем HbA1c более 58 ммоль/моль (7,45%); [(HbA1c в % -2,15) x 10,929 = HbA1c в ммоль/моль]; при неконтролируемом СД HbA1c должен колебаться в пределах менее 10%, и субъект не должен иметь в анамнезе диабетического кетоацидоза или эпизода тяжелой симптоматической гипогликемии в течение предшествующих 3 месяцев.

(7) Субъекты, перенесшие трансплантацию почки по меньшей мере год назад, в стабильном состоянии в течение по меньшей мере 6 месяцев при применении лекарственных средств, отнесенные к категории низкого риска отторжения.

В других аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, не получал лечение с применением лекарственного средства-иммунодепрессанта в течение периода более 14 дней за последние 6 месяцев. В некоторых аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, не получал живую вакцину по меньшей мере за 28 дней до введения и/или не получал инактивированную вакцину по меньшей мере за 14 дней до введения. В других аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, НЕ:

- Имел вирусологически подтвержденного заболевания COVID-19;
- Для женщин: имела беременности или периода лактации в течение месяца до введения композиции согласно воплощениям;
  - получал лечения с применением экспериментального или незарегистрированного продукта (например, вакцины или лекарственного средства) в течение 28 дней, предшествующих введению композиции согласно воплощениям;
  - получал разрешенных к применению вакцин в течение 28 дней (для живых вакцин) или 14 дней (для инактивированных вакцин) до введения композиции согласно воплощениям;
  - получал ранее или одновременно лечения с применением любой экспериментальной вакцины против SARS-CoV-2 или вакцины против другого коронавируса (SARS-CoV, MERS-CoV);
  - получал лечения с применением иммунодепрессантов или других иммуномодулирующих лекарственных средств (например, кортикостероидов, биологических препаратов и метотрексата) в общей сложности более 14 дней в течение 6 месяцев, предшествующих введению композиции согласно воплощениям;
  - имел какого-либо клинически диагностированного или предполагаемого иммунодепрессивного или иммунодефицитного состояния на основании анамнеза и медицинского осмотра, включая известную инфекцию вирусом иммунодефицита человека (HIV), вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV); текущего диагноза или лечения рака, включая лейкоз, лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому или генерализованное злокачественное новообразование; хронической почечной недостаточности или нефротического синдрома; а также не являлся реципиентом трансплантата органа или костного мозга.
- имел ангионевротического отека (наследственного или идиопатического) в анамнезе или любой анафилактической реакции или pIMD в анамнезе.



- имел аллергии на любой компонент вакцины CVnCoV в анамнезе.
- подвергался введению иммуноглобулинов или любых препаратов крови в течение 3 месяцев до введения композиции согласно воплощениям;
- имел серьезного острого или хронического соматического или психического заболевания; и/или
  - имел тяжелого и/или не поддающегося лечению сердечно-сосудистого заболевания, заболевания желудочно-кишечного тракта, заболевания печени, заболевания почек, респираторного заболевания, расстройства эндокринной системы, а также неврологических и психических заболеваний.

В некоторых аспектах субъект, подлежащий лечению в соответствии со способами согласно воплощениям, не имеет какого-либо потенциального иммуноопосредованного заболевания (pIMD). В других аспектах способ лечения согласно воплощениям не индуцирует какого-либо pIMD у получающего лечение субъекта. В настоящем документе pIMD определяются как целиакия; болезнь Крона; язвенный колит; язвенный проктит; аутоиммунный холангит; аутоиммунный гепатит; первичный билиарный цирроз; первичный склерозирующий холангит; болезнь Аддисона; аутоиммунный тиреоидит (включая тиреоидит Хашимото); сахарный диабет I типа; болезнь Грейвса или Базедова болезнь; антисинтеазный синдром; дерматомиозит; ювенильный хронический артрит (включая болезнь Стилла); смешанное поражение соединительной ткани; ревматическая полимиалгия; полимиозит; псориатическая артропатия; рецидивирующий полихондрит; ревматоидный артрит; склеродермия (например, включая диффузную системную форму и CREST-синдром); спондилоартрит (например, включая анкилозирующий спондилит, реактивный артрит (синдром Рейтера) и недифференцированный спондилоартрит); системная красная волчанка; системный склероз; острый диссеминированный энцефаломиелит (включая локализованные варианты (например, неинфекционный энцефалит, энцефаломиелит, миелит, миелорадикуломиелит)); заболевания черепно-мозговых нервов (например, включая параличи/парезы (например, паралич Белла)), синдром Гийена-Барре (например, включая синдром Миллера-Фишера и другие варианты), иммуноопосредованные периферические нейропатии, синдром Персонейджа-Тернера и плексопатии (например, включая хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, мультифокальную моторную нейропатию и полинейропатии, ассоциированные с

моноклональной гаммапатией); рассеянный склероз; нарколепсия; неврит зрительного нерва; поперечный миелит; очаговая алопеция; аутоиммунные буллезные заболевания кожи, включая пузырчатку, пемфигоид и герпетический дерматит; кожная красная волчанка; узловатая эритема; очаговая склеродермия; красный плоский лишай; псориаз; синдром Свита; витилиго; васкулит крупных сосудов (например, включая: гигантоклеточный артериит, такой как артериит Такаясу и височный артериит); васкулит средних и/или мелких сосудов (например, включая: узелковый полиартериит, болезнь Кавасаки, микроскопический полиангиит, гранулематоз Вегенера, синдром Черджа-Стросса (аллергический гранулематозный ангиит), болезнь Бюргера - облитерирующий тромбангиит, некротизирующий васкулит и положительный по антителам к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулит (неуточненного типа), пурпура Шенлейна-Геноха, синдром Бехчета, лейкоцитокластический васкулит); антифосфолипидный синдром; аутоиммунная гемолитическая анемия; аутоиммунный гломерулонефрит (включая IgA-нефропатию, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, мембранозный гломерулонефрит, мембранопрлиферативный гломерулонефрит и мезангиопрлиферативный гломерулонефрит); аутоиммунный миокардит/кардиомиопатия; аутоиммунная тромбоцитопения; синдром Гудпасчера; идиопатический легочный фиброз; злокачественная анемия; синдром Рейно; саркоидоз; синдром Шегрена; синдром Стивенса-Джонсона; увеит).

В некоторых аспектах способ вакцинации согласно воплощениям не приводит к возникновению у субъекта каких-либо нежелательных явлений особого значения (AESI). В настоящем документе AESI определяются как rIMD, перечисленные выше; анафилаксия; васкулиты; усиление заболевания после иммунизации; мультисистемный воспалительный синдром у детей; острый респираторный дистресс-синдром; заболевание COVID-19; острое повреждение миокарда; микроангиопатия; сердечная недостаточность и кардиогенный шок; стрессовая кардиомиопатия; ишемическая болезнь сердца; аритмия; миокардит, перикардит; тромбоцитопения; тромбоз глубоких вен; легочный эмбол; цереброваскулярный инсульт; ишемия конечностей; геморрагическая болезнь; острая почечная недостаточность; поражение печени; генерализованные судороги; синдром Гийена-Барре; острый диссеминированный энцефаломиелит; anosmia, снижение вкусовой чувствительности; менингоэнцефалит; поражения, подобные обморожению; кожный васкулит отдельного органа;

полиморфная эритема; серьезная местная/системная нежелательная реакция (AR) после иммунизации.

В частности, такой способ лечения может включать стадии:

а) обеспечение по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), предпочтительно по меньшей мере одной РНК согласно первому аспекту, по меньшей мере одной композиции согласно второму аспекту, по меньшей мере одного полипептида согласно третьему аспекту, по меньшей мере одной вакцины согласно четвертому аспекту, или набора или составного набора согласно пятому аспекту;

б) нанесение или введение субъекту указанной нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида, вакцины или применение набора или составного набора у субъекта в качестве первой дозы

с) возможно, нанесение или введение субъекту указанной нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида, вакцины или применение набора или составного набора у субъекта в качестве второй дозы или последующей дозы, предпочтительно по меньшей мере через 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев после первой дозы.

«Первая доза», используемая в настоящем документе, относится к начальной/первой дозе, второй дозе или любым дополнительным дозам, соответственно, которые предпочтительно вводят для «бустирования» иммунной реакции. В некоторых аспектах вакцину/композицию вводят субъекту один, два, три, четыре или более раз. В некоторых аспектах вакцину/композицию вводят субъекту по меньшей мере первый и второй раз (например, праймирование и бустирование). В некоторых аспектах второе введение осуществляют по меньшей мере через 10 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней, 35 дней, 42 дня, 49 дней или 56 дней после первого введения. В некоторых аспектах период времени между первым введением и вторым введением составляет от примерно 7 дней до примерно 56 дней; от примерно 14 дней до примерно 56 дней; от примерно 21 дня до примерно 56 дней или от примерно 28 дней до примерно 56 дней. В других аспектах вакцину/композицию вводят субъекту три или более раз. В некоторых аспектах между двумя последовательными введениями вакцины/композиции проходит по меньшей мере 10 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней, 35 дней, 42 дня, 49 дней или 56 дней.

В некоторых аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, был ранее инфицирован SARS-CoV-2 или ранее получал лечение с применением по меньшей мере первой вакцинной композиции против SARS-CoV-2. В некоторых

аспектах субъект получал лечение с применением одной, двух, трех или более доз первой вакцинной композиции против SARS-CoV-2. В некоторых аспектах композиция согласно воплощениям, применяемая для лечения субъекта, представляет собой вакцинную композицию другого типа по сравнению с композицией, ранее применяемой для лечения субъекта. В некоторых аспектах субъект ранее получал лечение с применением мРНК-вакцины, такой как BNT162 или mRNA-1273. В других аспектах субъект ранее получал лечение с применением белковой субъединичной вакцины, такой как вакцина на основе шиповидного белка, например, NVX-CoV2373 или COVAX. В некоторых предпочтительных аспектах белковые субъединичные вакцинные композиции содержат адъювант. В других аспектах субъект ранее получал лечение с применением вакцины на основе вирусного вектора, такой как вакцина на основе аденовирусного вектора, например, ADZ1222 или Ad26.COV-2.S. В других аспектах субъект ранее получал лечение с применением инактивированной вирусной вакцины против SARS-CoV-2, такой как CoronaVac, BBIBP-CoV или BBV152. В других аспектах субъект, ранее получавший лечение с применением вакцинной композиции, имеет обнаруживаемый уровень связывающих SARS-CoV-2 антител, таких как связывающие S-белок SARS-CoV-2 антитела или связывающие N-белок SARS-CoV-2 антитела. В других аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, получал лечение с применением первой вакцинной композиции против SARS-CoV-2 по меньшей мере примерно 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года или 3 года назад. В других аспектах субъект, подлежащий лечению согласно воплощениям, получал лечение с применением первой вакцинной композиции против SARS-CoV-2 в период от примерно 3 месяцев до 2 лет назад или от примерно 6 месяцев до 2 лет назад. В некоторых аспектах субъекты, получавшие лечение с применением дополнительной вакцинной композиции согласно воплощениям, защищены от умеренного и тяжелого заболевания COVID-19 по меньшей мере у 80%, 85%, 90% или 95% получавших лечение субъектов. Например, получавшие указанное лечение субъекты могут быть защищены от умеренного и тяжелого заболевания COVID-19 по меньшей мере у 80%, 85%, 90% или 95% получавших лечение субъектов в течение периода от примерно 2 недель до примерно 1 года после введения дополнительной композиции. В других аспектах введение дополнительной вакцинной композиции согласно воплощениям предупреждает умеренное и тяжелое заболевание COVID-19 по меньшей мере у 80%, 85%, 90% или 95% получающих лечение субъектов в период от

примерно 2 недель до примерно 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 года, 1,5 лет, 2 лет или 3 лет после указанного введения. Примеры таких стратегий комбинированной вакцинации представлены ниже:

Доза 1: мРНК-вакцина - T1 - доза 2: мРНК-вакцина - T2 - доза 3: мРНК-вакцина

Доза 1: мРНК-вакцина - T1 - доза 2: мРНК-вакцина - T2 - доза 3: субъединичная белковая вакцина

Доза 1: мРНК-вакцина - T1 - доза 2: мРНК-вакцина - T2 - доза 3: вакцина на основе вирусного вектора

Доза 1: мРНК-вакцина - T1 - доза 2: мРНК-вакцина - T2 - доза 3: инактивированная вирусная вакцина

Доза 1: субъединичная белковая вакцина - T1 - доза 2: субъединичная белковая вакцина - T2 - доза 3: мРНК-вакцина

Доза 1: инактивированная вирусная вакцина - T1 - доза 2: инактивированная вирусная вакцина - T2 - доза 3: мРНК-вакцина

Доза 1: вакцина на основе вирусного вектора - T1 - доза 2: вакцина на основе вирусного вектора - T2 - доза 3: мРНК-вакцина

Доза 1: вакцина на основе вирусного вектора - T2 - доза 2: мРНК-вакцина

Доза 1: субъединичная белковая вакцина - T2 - доза 2: мРНК-вакцина

Доза 1: инактивированная вирусная вакцина - T2 - доза 2: мРНК-вакцина

Доза 1: мРНК-вакцина - T2 - доза 2: мРНК-вакцина

В приведенных выше примерах период времени 1 (T1), как правило, составляет от 2 до 6 недель, предпочтительно от 3 до 4 недель. Период времени 2 (T2) в некоторых случаях составляет примерно 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года или три года.

В некоторых аспектах способ согласно воплощениям включает многократное введение вакцинной композиции субъекту. В другом аспекте предложен способ снижения реактогенности бустерной вакцинной композиции против SARS-CoV-2. В некоторых аспектах после первичной вакцинации субъекту, демонстрирующему высокий уровень реактогенности, вводят бустерную вакцину, которая отличается от первичной вакцинной композиции. Например, в некоторых аспектах первичная вакцина представляет собой BNT162 или mRNA-1273, а бустерная вакцина представляет собой вакцинную композицию на основе мРНК согласно воплощениям. В некоторых аспектах бустерную вакцинную композицию для субъекта с высокой

реактогенностью выбирают на основе содержания более низкой концентрации PEG или PEG-конъюгата по сравнению с ранее введенной вакцинной композицией. В некоторых аспектах бустерную вакцинную композицию для субъекта с высокой реактогенностью выбирают на основе содержания более низкой концентрации мРНК или LNP по сравнению с ранее введенной вакцинной композицией.

В некоторых аспектах субъекту, подлежащему лечению согласно воплощениям, вводят вакцинную композицию в качестве бустерной вакцины, и ранее он подвергался одному или более введениям вакцинной композиции против коронавируса. В некоторых аспектах субъект, подлежащий лечению с применением бустерной вакцины, ранее получал лечение с применением вакцинной композиции, содержащей антиген шиповидного белка или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген шиповидного белка. В некоторых аспектах субъекту, выбранному для лечения с применением бустерной вакцины, ранее вводили вакцинную композицию, содержащую или кодирующую шиповидный белок, имеющий аминокислотную последовательность, отличную от последовательности шиповидного белка бустерной вакцины. В некоторых аспектах ранее введенная вакцинная композиция содержала или кодировала шиповидный белок (например, шиповидный белок SARS-CoV-2), имеющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 отличий в аминокислотах от шиповидного белка бустерной вакцинной композиции. В некоторых аспектах бустерная вакцинная композиция содержит РНК, кодирующую шиповидный белок, имеющий от примерно 1 до 50; от примерно 3 до 30; от примерно 5 до 30 или от примерно 10 до 25 отличий в аминокислотах от шиповидного белка ранее введенной вакцинной композиции. В других аспектах бустерная вакцинная композиция содержит РНК, кодирующую 2, 3, 4 или более различающихся шиповидных белка с различными аминокислотными последовательностями.

В других аспектах способы согласно воплощениям включают введение субъекту 2 или более бустерных вакцинных композиций, где каждая бустерная вакцинная композиция содержит РНК, кодирующую различающиеся шиповидные белки с различными аминокислотными последовательностями. В некоторых аспектах такие различающиеся бустерные вакцинные композиции вводят по существу одновременно или с интервалом менее примерно 10 минут, 20 минут, 30 минут, 1 часа или 2 часов. В некоторых аспектах различающиеся бустерные вакцинные композиции вводят в один участок, как то путем внутримышечных инъекций в одну руку субъекта. В других

аспектах различающиеся бустерные вакцинные композиции вводят в разные участки, как то путем внутримышечных инъекций в разные руки или в одну или обе руки и еще одну в мышцы ноги.

В некоторых аспектах способ согласно воплощениям дополнительно определяется как способ стимулирования выработки антител или CD8+ Т-клеточного ответа у субъекта. В некоторых аспектах указанный способ определяется как способ стимулирования ответа в виде выработки нейтрализующих антител у субъекта. В других аспектах указанный способ определяется как способ стимулирования защитного иммунного ответа у субъекта. В других аспектах указанный способ определяется как способ стимулирования TH2-направленного иммунного ответа у субъекта.

В других аспектах введение вакцины/композиции/комбинации согласно воплощениям стимулирует ответ в виде выработки антител, при котором у субъекта продуцируется от примерно 10 до примерно 500 связывающих шиповидный белок коронавируса антител на каждое нейтрализующее коронавирус антитело. Например, введение может стимулировать ответ в виде выработки антител, при котором продуцируется не более примерно 200 связывающих шиповидный белок антител на каждое нейтрализующее коронавирус антитело. В других аспектах введение стимулирует ответ в виде выработки антител, при котором продуцируется от примерно 10 до примерно 300; от примерно 20 до примерно 300; от примерно 20 до примерно 200; от примерно 30 до примерно 100 или от примерно 30 до примерно 80 связывающих шиповидный белок коронавируса антител на каждое нейтрализующее коронавирус антитело. В других аспектах введение композиции согласно воплощениям стимулирует у субъекта ответ в виде выработки антител, который обуславливает отношение связывающих шиповидный белок антител к нейтрализующим коронавирус антителам, составляющее 20%, 15%, 10% или 5% отношения связывающих шиповидный белок антител к нейтрализующим коронавирус антителам, обнаруживаемого в среднем в сыворотке выздоравливающего пациента (от субъекта, выздоровевшего от коронавирусной инфекции).

В других аспектах введение вакцины/композиции/комбинации согласно воплощениям стимулирует ответ в виде выработки антител, при котором у субъекта продуцируется от примерно 1 до примерно 500 связывающих рецептор-связывающий домен (RBD) шиповидного белка коронавируса антител на каждое нейтрализующее коронавирус антитело. В других аспектах введение стимулирует ответ в виде

выработки антител, при котором продуцируется не более примерно 50 связывающих RBD шиповидного белка антител на каждое нейтрализующее коронавирус антитело. В других аспектах введение стимулирует ответ в виде выработки антител, при котором продуцируется от примерно 1 до примерно 200; от примерно 2 до примерно 100; от примерно 3 до примерно 200; от примерно 5 до примерно 100; от примерно 5 до примерно 50 или от примерно 5 до примерно 20 связывающих RBD шиповидного белка антител на каждое нейтрализующее коронавирус антитело. В других аспектах введение композиции согласно воплощениям стимулирует у субъекта ответ в виде выработки антител, который обуславливает отношение связывающих RBD шиповидного белка антител к нейтрализующим коронавирус антителам, составляющее 20%, 15%, 10% или 5% отношения связывающих RBD шиповидного белка антител к нейтрализующим коронавирус антителам, обнаруживаемого в среднем в сыворотке выздоравливающего пациента (от субъекта, выздоровевшего от коронавирусной инфекции).

В других аспектах введение вакцины/композиции/комбинации согласно воплощениям по существу не вызывает повышения уровней IL-4, IL-13, TNF и/или IL-1 $\beta$  у субъекта. В других аспектах введение вакцины/композиции согласно воплощениям по существу не вызывает повышения уровней IL-4, IL-13, TNF и/или IL-1 $\beta$  в сыворотке у субъекта. В некоторых аспектах введение вакцины/композиции согласно воплощениям по существу не вызывает повышения уровней IL-4, IL-13, TNF и/или IL-1 $\beta$  в месте инъекции (например, в месте внутримышечной инъекции) у субъекта. В других аспектах способ согласно воплощениям включает введение вакцины/композиции согласно воплощениям субъекту-человеку, имеющему заболевание. В некоторых аспектах субъект имеет сердечно-сосудистое заболевание, заболевание почек, заболевание легких или аутоиммунное заболевание. В некоторых аспектах вакцину/композицию согласно воплощениям вводят субъекту, который получает антикоагулянтную терапию.

В других аспектах введение вакцины/композиции/комбинации согласно воплощениям субъектам-людям приводит к тому, что не более 20%, 15%, 10%, 7,5% или 5% субъектов испытывают местное нежелательное явление степени 3 (см. Таблицу 3а ниже). Например, в некоторых аспектах не более 10% субъектов испытывают местное нежелательное явление степени 3 после введения первой или второй дозы композиции. В предпочтительных аспектах введение композиции согласно воплощениям субъектам-людям приводит к тому, что не более 40%, 30%, 25%, 20%,



15%, 10%, 7,5% или 5% субъектов испытывают местное нежелательное явление степени 2 или выше. Например, в некоторых аспектах не более 30% субъектов испытывают местное нежелательное явление степени 2 или выше после введения первой или второй дозы композиции. В некоторых аспектах введение композиции согласно воплощениям субъектам-людям приводит к тому, что не более 10% субъектов испытывают боль, покраснение кожи, отек и/или зуд степени 3 в месте инъекции.

В других аспектах введение вакцины/композиции/комбинации согласно воплощениям субъектам-людям приводит к тому, что не более 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% субъектов испытывают системное нежелательное явление степени 3 (см. Таблицу В ниже). Например, в некоторых аспектах не более 25% субъектов испытывают системное нежелательное явление степени 3 после введения первой дозы композиции. В некоторых аспектах не более 40% субъектов испытывают системное нежелательное явление степени 3 после введения второй дозы композиции. В некоторых аспектах введение композиции согласно воплощениям субъектам-людям приводит к тому, что не более 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% субъектов испытывают лихорадку, головную боль, утомляемость, озноб, боль в мышцах, боль в суставах, тошноту и/или диарею степени 3.

*Таблица 3а: Оценка степени интенсивности\* местных нежелательных явлений, выявленных при опросе*

<b>НЯ</b>	<b>Степень</b>	<b>Расшифровка</b>
Боль в месте инъекции	0	Отсутствует
	1	Не препятствует деятельности
	2	Препятствует деятельности и/или многократное применение ненаркотического болеутоляющего средства более 24 часов
	3	Исключает повседневную деятельность и/или многократное применение наркотического болеутоляющего средства
Покраснение кожи	0	менее 2,5 см
	1	2,5 - 5 см
	2	5,1 - 10 см
	3	более 10 см
Отечность	0	менее 2,5 см
	1	2,5 - 5 см и не препятствует деятельности
	2	5,1 - 10 см или препятствует деятельности
	3	более 10 см или исключает повседневную деятельность
Зуд	0	Отсутствует
	1	Слабый, не препятствует нормальной деятельности
	2	Умеренный, в некоторой степени препятствует нормальной деятельности
	3	Значительный, исключает нормальную деятельность

*Таблица 3б: Оценка степени интенсивности\* системных нежелательных явлений, выявленных при опросе*

<b>Нежелательное явление</b>	<b>Степень</b>	<b>Расшифровка</b>
Лихорадка	0	менее 38°C
	1	≥ 38,0 - 38,4°C
	2	≥ 38,5 - 38,9°C
	3	≥ 39°C

<b>Нежелательное явление</b>	<b>Степень</b>	<b>Расшифровка</b>
Головная боль	0	Отсутствует
	1	Слабая, не препятствует нормальной деятельности
	2	Умеренная, в некоторой степени препятствует нормальной деятельности и/или многократное применение ненаркотического болеутоляющего средства более 24 часов
	3	Значительная; любое применение наркотического болеутоляющего средства и/или исключает повседневную деятельность
Утомляемость	0	Отсутствует
	1	Слабая, не препятствует нормальной деятельности
	2	Умеренная, в некоторой степени препятствует нормальной деятельности
	3	Значительная, исключает нормальную деятельность
Озноб	0	Отсутствует
	1	Слабый, не препятствует нормальной деятельности
	2	Умеренный, в некоторой степени препятствует нормальной деятельности
	3	Значительный, исключает нормальную деятельность
Боль в мышцах	0	Отсутствует
	1	Слабая, не препятствует нормальной деятельности
	2	Умеренная, в некоторой степени препятствует нормальной деятельности
	3	Значительная, исключает нормальную деятельность
Боль в суставах	0	Отсутствует
	1	Слабая, не препятствует нормальной деятельности
	2	Умеренная, в некоторой степени препятствует нормальной деятельности
	3	Значительная, исключает нормальную деятельность
Тошнота/рвота	0	Отсутствует

Нежелательное явление	Степень	Расшифровка
	1	Слабая, не препятствует деятельности и/или 1-2 эпизода/24 часа
	2	Умеренная, в некоторой степени препятствует деятельности и/или более 2 эпизодов/24 часа
	3	Значительная, исключает повседневную деятельность, требуется в/в восполнение потери жидкости в амбулаторных условиях
Диарея	0	Отсутствует
	1	2-3 эпизода жидкого стула в течение 24 часов
	2	4 - 5 эпизодов дефекации в течение 24 часов
	3	6 или более эпизодов водянистого стула в течение 24 часов или требуется в/в восполнение потери жидкости в амбулаторных условиях

\*Шкала оценки степени токсичности FDA (US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry. Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials. 2007. В сети Интернет:

[fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm091977.pdf](https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm091977.pdf); по состоянию на: март 2019 г., включено в настоящий документ посредством ссылки); в/в = внутривенно

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении также предложен способ экспрессии по меньшей мере одного полипептида, включающего по меньшей мере один пептид или белок, полученный из коронавируса, или его фрагмент или вариант, где указанный способ предпочтительно включает следующие стадии:

а) обеспечение по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту или по меньшей мере одной композиции согласно второму аспекту; и

б) нанесение или введение указанной нуклеиновой кислоты или композиции в систему экспрессии (клетки), ткань, организм. Подходящая клетка для экспрессии полипептида (который кодируется нуклеиновой кислотой согласно настоящему изобретению) может представлять собой линию клеток насекомых *Drosophila S2*.

Способ экспрессии может применяться в лабораторных целях, для исследований, для диагностики, для коммерческого получения пептидов или белков и/или в терапевтических целях. Кроме того, указанный способ может быть применен в контексте лечения конкретного заболевания, в частности, для лечения инфекционных заболеваний, в частности, коронавирусных инфекций, предпочтительно инфекций коронавирусом SARS-CoV-2 и заболевания COVID-19.

Схожим образом, согласно другому аспекту в настоящем изобретении также предложено применение нуклеиновой кислоты, композиции, полипептида, вакцины или набора или составного набора предпочтительно для диагностических или терапевтических целей, например, для экспрессии кодируемого антигенного пептида или белка коронавируса.

В конкретных воплощениях после нанесения или введения указанной нуклеиновой кислоты, полипептида, композиции, вакцины, комбинации в ткань или организм может следовать, например, стадия получения индуцированных антител к коронавирусу, например, специфичных (моноклональных) антител к коронавирусу SARS-CoV-2, или стадия получения образовавшихся конструкций белка коронавируса SARS-CoV-2 (белка S).

Указанное применение может осуществляться в (диагностических) лабораторных целях, для исследований, для диагностики, для коммерческого получения пептидов, белков или антител к коронавирусу SARS-CoV-2 и/или в терапевтических целях. Указанное применение может осуществляться *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Кроме того, указанное применение может осуществляться в контексте лечения конкретного заболевания, в частности, для лечения коронавирусной инфекции (например, COVID-19) или схожего расстройства.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении также предложен способ изготовления композиции или вакцины, включающий стадии:

а) Стадия транскрипции РНК *in vitro* с применением ДНК-матрицы в присутствии аналога кэпа с получением кэпированной мРНК, предпочтительно имеющей последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в **таблице 2**;

б) Очистка полученной кэпированной РНК, полученной на стадии а), с помощью RP-HPLC, и/или TFF, и/или очистки на смоле Oligo(dT), и/или AEX, предпочтительно с помощью RP-HPLC;

с) Обеспечение первой жидкой композиции, содержащей очищенную кэпированную РНК, полученную на стадии b);

d) Обеспечение второй жидкой композиции, содержащей по меньшей мере один катионный липид, определенный в настоящем документе, нейтральный липид, определенный в настоящем документе, стероид или аналог стероида, определенный в настоящем документе, и PEG-липид, определенный в настоящем документе;

e) Введение первой жидкой композиции и второй жидкой композиции по меньшей мере в одно устройство для смешивания с обеспечением образования LNP, содержащих кэпированную РНК;

f) Очистка полученных LNP, содержащих кэпированную РНК;

g) необязательно, лиофильная сушка очищенных LNP, содержащих кэпированную РНК.

Предпочтительно устройство для смешивания на стадии e) представляет собой T-образный коннектор или микрофлюидное устройство для смешивания. Предпочтительно стадия очистки f) включает по меньшей мере одну стадию, выбранную из стадии осаждения, стадии диализа, стадии фильтрации, стадии TFF. Возможно, после стадии a) или b) может быть выполнена стадия ферментативного полиаденилирования. Возможно, могут быть осуществлены дополнительные стадии очистки, например, для удаления остаточной ДНК, буферов, побочных продуктов в виде малой РНК и так далее. Возможно, транскрипцию РНК *in vitro* осуществляют в отсутствие аналога кэпа, и стадию ферментативного кэпирования проводят после транскрипции РНК *in vitro*. Возможно, транскрипцию РНК *in vitro* осуществляют в присутствии по меньшей мере одного модифицированного нуклеотида, определенного в настоящем документе.

В воплощениях стадию a, предпочтительно стадии a-c, более предпочтительно все описанные выше стадии (a-g) проводят в автоматизированном устройстве для транскрипции РНК *in vitro*. Такое устройство также может быть применено для получения композиции или вакцины (см. аспекты 2 и 3). Предпочтительно может быть подходящим образом применено устройство, описанное в источнике WO2020/002598, в частности, устройство, описанное в пунктах формулы изобретения 1-59 и/или 68-76 WO2020/002598 (и на фигурах 1-18).

#### **Краткое описание перечней и таблиц**

**Перечень 1a:** Положения аминокислот для замен, делеций и/или вставок

**Перечень 1b:** Аминокислотные замены, делеции или вставки

**Таблица 1:** Предпочтительные конструкции коронавируса (аминокислотные последовательности и кодирующие последовательности нуклеиновых кислот)

**Таблица 2a:** Конструкции РНК, подходящие для вакцины против коронавируса

**Таблица 2b:** Конструкции РНК, подходящие для вакцины против коронавируса

**Таблица 3a:** Оценка интенсивности местных нежелательных явлений, выявленных при опросе

**Таблица 3b:** Оценка интенсивности системных нежелательных явлений, выявленных при опросе

**Таблица 4:** Конструкции РНК, кодирующие различные конструкции антигена S SARS-CoV-2 (применяемые в примерах)

**Таблица 5:** Состав носителя на липидной основе, применяемый в примерах

**Таблица 6:** Схема вакцинации

**Таблица 7:** Медианные значения VNT (день 42)

**Таблица 8:** Схема вакцинации (пример 3)

**Таблица 9:** Схема вакцинации (пример 4)

**Таблица 10:** Схема вакцинации (пример 5)

**Таблица 11:** Схема вакцинации (пример 6)

**Таблица 12:** Схема вакцинации (пример 7)

**Таблица 13:** Схема вакцинации (пример 8)

**Таблица 14A:** Схема вакцинации (пример 9A)

**Таблица 14B:** Схема вакцинации (пример 9B)

**Таблица 15:** Схема вакцинации (пример 10)

**Таблица 16:** Схема вакцинации (пример 11)

**Таблица 17:** Схема вакцинации (пример 12)

**Таблица 18:** Схема вакцинации (пример 13)

**Таблица 19:** Схема вакцинации (пример 14)

### **Примеры**

Следующие примеры иллюстрируют различные воплощения и аспекты настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения никоим образом не ограничивается описанными в настоящем документе конкретными воплощениями. Следующие способы приготовления и примеры приведены для более четкого

понимания и практического осуществления настоящего изобретения специалистами в данной области техники. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается приведенными в качестве примеров воплощениями, которые предназначены только для иллюстрации отдельных аспектов настоящего изобретения, а способы, которые являются функционально эквивалентными, входят в объем настоящего изобретения. Безусловно, различные модификации настоящего изобретения помимо тех, которые описаны в настоящем документе, станут очевидны для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания, прилагаемых чертежей и приведенных ниже примеров. Все такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### **Пример 1: Приготовление конструкций ДНК и РНК, композиций и вакцин**

В настоящем примере предложены способы получения РНК согласно настоящему изобретению, а также способы получения композиции или вакцины согласно настоящему изобретению.

##### **1.1. Приготовление конструкций ДНК и РНК:**

Получали последовательности ДНК, кодирующие различные конструкции S-белка SARS-CoV-2, и применяли их для последующих реакций транскрипции РНК *in vitro*. Последовательности ДНК получали путем модификации кодирующих последовательностей ДНК дикого типа или эталонных кодирующих последовательностей ДНК путем введения кодирующей последовательности с оптимизированным или модифицированным содержанием G/C (например, «*cds opt1*») с целью стабилизации и оптимизации экспрессии. Последовательности вводили в полученный из рUC ДНК-вектор с получением стабилизирующих последовательностей 3'-UTR и последовательностей 5'-UTR, дополнительно содержащих участок из аденозинов (например, A64 или A100) и, возможно, гистоновую структуру стебель-петля (hSL), и, возможно, участок из 30 цитозинов (например, C30) (см. **Таблицу 4**, обзор конструкций антигенов коронавируса см. в **Перечне 1** или **Таблице 1**).

Полученные конструкции плазмидной ДНК подвергали трансформации и нарабатывали в бактериях с применением обычных протоколов, известных в данной области техники. Конструкции плазмидной ДНК выделяли, очищали и применяли для последующей транскрипции РНК *in vitro* (см. раздел 1.2.).

В качестве альтернативы, ДНК-плазмиды могут быть применены в качестве матрицы для амплификации методом ПЦР (см. раздел 1.3.).

##### **1.2. Транскрипция РНК *in vitro* с матриц плазмидной ДНК:**



ДНК-плазмиды, приготовленные в соответствии с разделом 1.1, подвергали ферментативной линеаризации с помощью фермента рестрикции и применяли для ДНК-зависимой транскрипции РНК *in vitro* с использованием РНК-полимеразы Т7 в присутствии смеси нуклеотидов (АТФ/ГТФ/СТФ/УТФ) и аналога кэпа (например, m7GpppG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG) или 3'OMe-m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG.) в среде подходящего буфера. Полученные конструкции РНК очищали с помощью RP-HPLC (PureMessenger®, CureVac AG, Тюбинген, Германия; WO2008/077592) и применяли для экспериментов *in vitro* и *in vivo*. ДНК-матрицы также могут быть получены с помощью ПЦР. Такие ПЦР-матрицы могут быть применены для ДНК-зависимой транскрипции РНК *in vitro* с использованием РНК-полимеразы, как указано в настоящем документе.

Для получения химически модифицированной мРНК транскрипцию РНК *in vitro* проводили в присутствии смеси модифицированных нуклеотидов, содержащей N(1)-метилпсевдоуридин (m1Ψ) или псевдоуридин (Ψ) вместо урацила. Полученную химически модифицированную РНК, содержащую m1Ψ или Ψ, очищали с помощью RP-HPLC (PureMessenger®, CureVac AG, Тюбинген, Германия; WO2008/077592) и применяли для последующих экспериментов.

Получение кэпированной РНК с помощью ферментативного кэпирования (пример возможного применения):

Некоторые конструкции РНК получают путем транскрипции *in vitro* в отсутствие аналога кэпа. Затем кэп-структуру (cap0 или cap1) добавляют ферментативным путем с помощью кэпирующих ферментов, общеизвестных в данной области техники. Полученную путем транскрипции *in vitro* РНК подвергают кэпированию с применением набора для кэпирования с получением cap0-РНК. cap0-РНК дополнительно модифицируют с помощью кэп-специфичной 2'-О-метилтрансферазы с получением cap1-РНК. cap1-РНК очищают, например, как указано выше, и применяют для дальнейших экспериментов.

РНК для клинической разработки производят в соответствии с действующей надлежащей производственной практикой, например, в соответствии с WO2016/180430, с осуществлением различных стадий контроля качества на уровне ДНК и РНК.

#### Конструкции РНК согласно примерам:

Полученные последовательности/конструкции РНК представлены в **таблице 4** совместно с указанными в ней кодируемым антигенным белком и соответствующими

элементами UTR. Если не указано иное, последовательности/конструкции РНК, представленные в **Таблице 4**, были получены путем транскрипции РНК *in vitro* в присутствии m7GpppG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; соответственно, указанные последовательности/конструкции РНК содержат 5'-структуру Cap1. Если не указано иное, последовательности/конструкции РНК, представленные в **таблице 4**, были получены в отсутствие химически модифицированных нуклеотидов (например, псевдоуридина (Ψ) или N(1)-метилпсевдоуридина (m1Ψ)).

1.3. Транскрипция РНК *in vitro* с амплифицированных методом ПЦР ДНК-матриц (пример возможного применения):

Очищенные амплифицированные методом ПЦР ДНК-матрицы, приготовленные в соответствии с разделом 1.1, подвергаются транскрипции *in vitro* с применением ДНК-зависимой РНК-полимеразы T7 в присутствии смеси нуклеотидов (АТФ/ГТФ/СТФ/УТР) и аналога кэпа (m7GpppG или 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G)) в среде подходящего буфера. В качестве альтернативы, амплифицированную методом ПЦР ДНК подвергают транскрипции *in vitro* с применением ДНК-зависимой РНК-полимеразы T7 в присутствии смеси модифицированных нуклеотидов (АТФ, ГТФ, СТФ, N1-метилпсевдоуридина (m1Ψ) или псевдоуридина (Ψ) и аналога кэпа (m7GpppG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG или m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG) в среде подходящего буфера. Некоторые конструкции РНК получают путем транскрипции *in vitro* в отсутствие аналога кэпа, а кэп-структуру (cap0 или cap1) добавляют ферментативным путем с помощью копирующих ферментов, общеизвестных в данной области техники. Полученную РНК очищают, например, как указано выше, и применяют для дальнейших экспериментов. Полученные мРНК очищают, например, с помощью RP-HPLC (PureMessenger®, CureVac AG, Тюбинген, Германия; WO2008/077592) и применяют для экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

**Таблица 4:** Конструкции РНК, кодирующие различные конструкции антигена S SARS-CoV-2

ID РНК	Сокращенное название	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; Конструкция UTR	3'- конец	SEQ ID NO: Белок	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: РНК
R9488, R9492,	S	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	1	136	148
R9487,	S_stab_PP	opt1	HSD17B4	hSL-	10	137	149,

R9491, R9709, R10159**, R10160, R10727**, R10820**, R10821**	(K986P_V987P)	(gc)	/ PSMB3; a-1	A100			28736
R10166, R10812**, R10813**	S_stab_PP (K986P_V987P _D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22738	22765	22792 , 28737
R10811, R10814**, R10815**	S_stab_PP(K986P_V98 7P_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	22738	22765	24838 , 28827
R10279	S_stab_PP (K986P_V987P _A222V_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22740	22767	22794
R10299	S_stab_PP (K986P_V987P _N439K_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22742	22769	22796
R10286	S_stab_PP (K986P_V987P _S477N_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22744	22771	22798
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_N501Y_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22746	22773	22800
R10275	S_stab_PP (K986P_V987P _H69del_V70del _D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22748	22775	22802
R10283	S_stab_PP (K986P_V987P _Y453F_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22750	22777	22804
R10291	S_stab_PP (K986P_V987P _D614G_I692V)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22752	22779	22806
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_D614G_M1229I)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22754	22781	22808
R10295	S_stab_PP (K986P_V987P _H69del_V70del _A222V_Y453F)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22756	22783	22810

	_S477N_D614G_I692V)						
	S_stab_PP(K986P_V987P_H69del_V70del_Y453F_D614G_I692V_M1229I)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL-A100	22758	22785	22812
R10162**	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt10 (gc mod)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL-A100	10	146	151
R10357	S_stab_PP (K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL-A100	22959	23089	23529
R10361	S_stab_PP (K986P_V987P_K417N_E484K_N501Y_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL-A100	22960	23090	23530
R10384	S_stab_PP (K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_R246I_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL-A100	22961	23091	23531
R10385	S_stab_PP (K986P_V987P_L18F_T20N_P26S_D138Y_R190S_K417T_E484K_N501Y_D614G_H655Y_T1027I)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL-A100	22963	23093	23533
R10410	S_stab_PP (K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H_E484K)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL-A100	*	*	*
R10452	S_stab_PP (K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_R246I_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	22961	23091	*

R9515	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5- C30- hSL-N5	10	137	163
R10385	S_stab_PP(K986P_V98 7P_L18F_T20N_P26S_ D138Y_R190S_K417T _E484K_N501Y_D614 G_H655Y_T1027I)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22963	23093	23533
R10616	S_stab_PP(K986P_V98 7P_L18F_T20N_P26S_ D138Y_R190S_K417T _E484K_N501Y_D614 G_H655Y_T1027I_V1 176F)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27091	27114	27390
P5335	S_stab_PP(K986P_V98 7P_E484K_D614G_V1 176F)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27092	27115	27391
R10614	S_stab_PP(K986P_V98 7P_S13I_W152C_L452 R_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	22964	23094	23534
R10520	S_stab_PP(K986P_V98 7P_Q52R_A67V_H69d el_V70del_Y144del_E4 84K_D614G_Q677H_F 888L)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27089	27112	27388
R10577	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_Y144del_E484K_D 614G_Q677H_F888L)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27090	27113	27389
R10598	S_stab_PP(K986P_V98 7P_L452R_D614G_P6 81R)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27093	27116	27392
P5333	S_stab_PP(K986P_V98 7P_E154K_L452R_E4 84Q_D614G_P681R_Q 1071H)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27094	27117	27393
R10630, R10827**, R10828**, R11043, R11160**, R11161**	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_F157del_R1 58del_L452R_T478K_ D614G_P681R_D950N )	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27095	27118	27394 , 28762

R10824, R10825**, R10826**	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_F157del_R1 58del_L452R_T478K_ D614G_P681R_D950N )	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	27095	27118	27532 , 28852
P5336, R10800	S_stab_PP(K986P_V98 7P_G75V_T76I_R246d el_S247del_Y248del_L 249del_T250del_P251d el_G252del_L452Q_F4 90S_D614G_T859N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27096	27119	27395
R10575	S_stab_PP(K986P_V98 7P_H69del_V70del_N4 39K_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27097	27120	27396
R10579	S_stab_PP(K986P_V98 7P_L5F_T95I_D253G_ E484K_D614G_A701V )	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27098	27121	27397
R10581	S_stab_PP(K986P_V98 7P_L5F_T95I_D253G_ S477N_D614G_Q957R )	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27099	27122	27398
R10592	S_stab_PP(K986P_V98 7P_F157L_V367F_Q61 3H_P681R)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27100	27123	27399
R10615	S_stab_PP(K986P_V98 7P_S254F_D614G_P68 1R_G769V)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27101	27124	27400
P5418	S_stab_PP(K986P_V98 7P_P26S_H69del_V70 del_V126A_Y144del_L 242del_A243del_L244 del_H245Y_S477N_E4 84K_D614G_P681H_T 1027I_D1118H)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27102	27125	27401
R10679	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T95I_Y144T_Y145 S_ins145N_R346K_E4 84K_N501Y_D614G_P 681H_D950N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27103	27126	27402
P5420	S_stab_PP(K986P_V98 7P_ins214TDR_Q414K _N450K_D614G_T716	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27104	27127	27403

	D)						
P5416	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T478K_D614G_P6 81H_T732A)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27105	27128	27404
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_E484K_N501Y_D6 14G_P681H_E1092K_ H1101Y_V1176F)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27106	27129	27405
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_H66D_G142V_Y14 4del_Y145del_D215G_ V483A_D614G_H655 Y_G669S_Q949R_N11 87D)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27107	27130	27406
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_Y144del_L452R_T 478K_P681R)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27108	27131	27407
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_Y144del_Y1 45del_L452R_T478K_ D614G_P681R)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	27109	27132	27408
R10922	S_stab_PP(K986P_V98 7P_P9L_C136F_Y144d el_R190S_D215G_L24 2del_A243del_Y449H_ E484K_N501Y_D614G _H655Y_N679K_T716 I_T859N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28540	28589	28638
R11175, R11176, R11177**, R11178**	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_S477N_ T478K_E484A_Q493R_ _G496S_Q498R_N501 Y_Y505H_T547K_D61 4G_H655Y_N679K_P6 81H_N764K_D796Y_ N856K_Q954H_N969 K_L981F);	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28541	28590	28639 , 28778

	S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v1)						
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_S477N_ T478K_E484A_Q493R _G496S_Q498R_N501 Y_Y505H_T547K_D61 4G_H655Y_N679K_P6 81H_N764K_D796Y_ N856K_Q954H_N969 K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v1	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	28541	28590	28688 , 28868
R11113, R11114, R11115**, R11116**	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_K417N_ N440K_G446S_S477N_ _T478K_E484A_Q493 R_G496S_Q498R_N50 1Y_Y505H_T547K_D6 14G_H655Y_N679K_P 681H_N764K_D796Y_ N856K_Q954H_N969 K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v0)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28542	28591	28640 , 28779
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_K417N_ N440K_G446S_S477N	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	28542	28591	28689 , 28869



	_T478K_E484A_Q493 R_G496S_Q498R_N50 1Y_Y505H_T547K_D6 14G_H655Y_N679K_P 681H_N764K_D796Y_ N856K_Q954H_N969 K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v0)						
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_ A67V_T95I_G339D_S 371L_S373P_S375F_S 477N_T478K_E484A_ Q493R_G496S_Q498R _N501Y_Y505H_T547 K_D614G_H655Y_N6 79K_P681H_D796Y_N 856K_Q954H_N969K_ L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_B.1.1.529)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28543	28592	28641 , 28780
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_ A67V_T95I_G339D_S 371L_S373P_S375F_S 477N_T478K_E484A_ Q493R_G496S_Q498R _N501Y_Y505H_T547 K_D614G_H655Y_N6 79K_P681H_D796Y_N 856K_Q954H_N969K_ L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_B.1.1.529)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	28543	28592	28690 , 28870
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_ T19I_L24del_P25del_P 26del_A27S_G142D_V 213G_G339D_S371F_ S373P_S375F_T376A_ D405N_S477N_T478K _E484A_Q493R_Q498	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28544	28593	28642 , 28781

	R_N501Y_Y505H_D6 14G_H655Y_N679K_P 681H_D796Y_Q954H_ N969K); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.2)						
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_ T19I_L24del_P25del_P 26del_A27S_G142D_V 213G_G339D_S371F_ S373P_S375F_T376A_ D405N_S477N_T478K _E484A_Q493R_Q498 R_N501Y_Y505H_D6 14G_H655Y_N679K_P 681H_D796Y_Q954H_ N969K); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.2)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	28544	28593	28691 , 28871
P5508	S_stab_PP(K986P_V98 7P_G75V_T76I_R246d el_S247del_Y248del_L 249del_T250del_P251d el_G252del_D253N_L4 52Q_F490S_D614G_T 859N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28545	28594	28643
P5453	S_stab_PP(K986P_V98 7P_S12F_H69del_V70 del_W152R_R346S_L4 52R_D614G_Q677H_ A899S)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28547	28596	28645
P5507	S_stab_PP(K986P_V98 7P_I210T_N440K_E48 4K_D614G_D936N_S9 39F_T1027I)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28548	28597	28646
P5509	S_stab_PP(K986P_V98 7P_W152L_E484K_D6 14G_G769V)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28549	28598	28647
P5572	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T20I_R357K_D614 G)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28550	28599	28648

P5664	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T95I_Y144del_E48 4K_D614G_P681H_D7 96H)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28551	28600	28649
R10884	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_G142D_E15 6G_F157del_R158del_ L452R_T478K_D614G _P681R_D950N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28552	28601	28650
R10801, R10832**, R10833**	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_T95I_G142D _E156G_F157del_R15 8del_W258L_K417N_ L452R_T478K_D614G _P681R_D950N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28553	28602	28651 , 28790
R10829, R10830**, R10831**	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_T95I_G142D _E156G_F157del_R15 8del_W258L_K417N_ L452R_T478K_D614G _P681R_D950N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	28553	28602	28700 , 28880
R10802	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_V70F_G142 D_E156G_F157del_R1 58del_A222V_K417N_ L452R_T478K_D614G _P681R_D950N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28554	28603	28652
P5662	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_T95I_G142D _E156G_F157del_R15 8del_L452R_T478K_D 614G_P681R_D950N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28555	28604	28653
P5663	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_E156G_F157 del_R158del_L452R_T 478K_D614G_P681R_ D950N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28556	28605	28654
R11036	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_T95I_G142D _Y145H_E156G_F157 del_R158del_A222V_L 452R_T478K_D614G_ P681R_D950N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28557	28606	28655

P5454	S_stab_PP(K986P_V98 7P_T19R_L452R_E484 Q_D614G_P681R_D95 0N)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28558	28607	28656
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_N440K_ S477N_T478K_E484A _Q493R_G496S_Q498 R_N501Y_Y505H_T54 7K_D614G_H655Y_N 679K_P681H_N764K_ D796Y_N856K_Q954 H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v2)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28917	28921	28927 , 28935
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_N440K_ S477N_T478K_E484A _Q493R_G496S_Q498 R_N501Y_Y505H_T54 7K_D614G_H655Y_N 679K_P681H_N764K_ D796Y_N856K_Q954 H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v2)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	28917	28921	28929 , 28937
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_N440K_ S477N_T478K_E484A _Q493R_G496S_Q498 R_N501Y_Y505H_T54 7K_D614G_H655Y_N 679K_P681H_N764K_ D796Y_N856K_Q954 H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v2)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28918	28922	28926 , 28934

	T478K_E484A_Q493R _G496S_Q498R_N501 Y_Y505H_T547K_D61 4G_H655Y_N679K_P6 81H_D796Y_N856K_ Q954H_N969K_L981F ); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v3)						
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_S477N_ T478K_E484A_Q493R _G496S_Q498R_N501 Y_Y505H_T547K_D61 4G_H655Y_N679K_P6 81H_D796Y_N856K_ Q954H_N969K_L981F ); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v3)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	28918	28922	28930 , 28938
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_S477N_ T478K_E484A_Q493R _G496S_Q498R_N501 Y_Y505H_T547K_D61 4G_H655Y_N679K_P6 81H_A701V_N764K_ D796Y_N856K_Q954 H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v4)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28919	28923	28927 , 28935
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3;	A100	28919	28923	28931 ,

	del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_S477N_ T478K_E484A_Q493R_ _G496S_Q498R_N501 Y_Y505H_T547K_D61 4G_H655Y_N679K_P6 81H_A701V_N764K_ D796Y_N856K_Q954 H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v4)		a-1				28939
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_G446S_ S477N_T478K_E484A_ _Q493R_G496S_Q498 R_N501Y_Y505H_T54 7K_D614G_H655Y_N 679K_P681H_N764K_ D796Y_N856K_Q954 H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v5)	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	hSL- A100	28920	28924	28928 , 28936
	S_stab_PP(K986P_V98 7P_A67V_H69del_V70 del_T95I_G142D_V14 3del_Y144del_Y145del _N211del_L212I_ins21 4EPE_G339D_S371L_ S373P_S375F_G446S_ S477N_T478K_E484A_ _Q493R_G496S_Q498 R_N501Y_Y505H_T54 7K_D614G_H655Y_N 679K_P681H_N764K_ D796Y_N856K_Q954	opt1 (gc)	HSD17B4 / PSMB3; a-1	A100	28920	28924	28932 , 28940

H_N969K_L981F); S_stab_PP(K986P_V98 7P_BA.1_v5)							
---	--	--	--	--	--	--	--

\*\*мРНК R10159, R10162, R10157, R10712, R10813, R10815, R10821, R10823, R10826, R10828, R10831, R10833, R11116, R11120, R11161, R11178 были получены с применением N(1)-метилпсевдоуридина (m1ψ); R10727, R10728, R10812, R10814, R10820, R10822, R10825, R10827, R10830, R10832, R11115, R11119, R11160, R11177 были получены с применением псевдоуридина (ψ))

Шиповидный белок, стабилизированный в конформации до слияния (= S\_stab), шиповидный белок (= S)

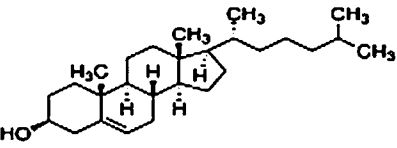
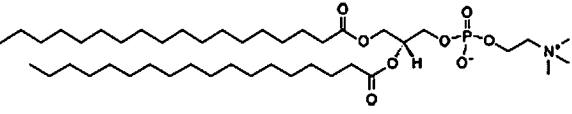
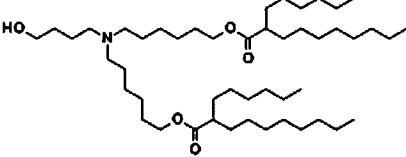
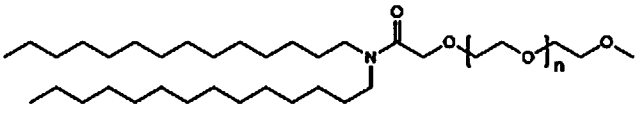
#### 1.4. Получение композиции мРНК, приготовленной в LNP:

LNP готовили с применением катионных липидов, структурных липидов, PEG-липидов и холестерина. Раствор липидов (в этаноле) смешивали с раствором РНК (водный буфер) с помощью микрофлюидного устройства для смешивания. Полученные LNP переводили в углеводный буфер с помощью диализа и концентрировали до достижения целевой концентрации с применением пробирок для ультрацентрифугирования. Приготовленную в LNP мРНК хранили при -80°C до применения в экспериментах *in vitro* или *in vivo*.

Липидные наночастицы готовили и подвергали испытаниям в соответствии с общими методиками, описанными в публикациях согласно РСТ № WO2015/199952, WO2017/004143 и WO2017/075531, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Приготовленную в липидных наночастицах (LNP) мРНК получали с применением ионизируемого аминоклипида (катионного липида), фосфолипида, холестерина и пегилированного липида. LNP готовили следующим образом. Катионный липид согласно формуле III-3 (ALC-0315), DSPC, холестерин и PEG-липид согласно формуле IVa (ALC-0159) сольбилизировали в этаноле при молярном отношении, составляющем примерно 47,5:10:40,8:1,7 (см. **таблицу 5**). Липидные наночастицы (LNP), содержащие соединение III-3, готовили при отношении мРНК (последовательности см. в **таблице 4**) к общему содержанию липидов, составляющем 0,03-0,04 масс/масс. Кратко, мРНК разводили до концентрации 0,05- 0,2 мг/мл в 10-50 мМ цитратном буфере, pH 4. Для смешивания раствора липидов в этаноле с водным раствором мРНК в отношении примерно от 1:5 до 1:3 (об./об.) использовали шприцевые насосы с суммарной скоростью потока выше 15 мл/мин. Затем этанол удаляли, а внешний буфер заменяли на PBS путем диализа. Затем

липидные наночастицы фильтровали через стерильный фильтр с размером пор 0,2 мкм. Размер липидных наночастиц в диаметре составлял 60-90 нм, что определяли методом квазиупругого рассеяния света с помощью анализатора Malvern Zetasizer Nano (Malvern, Великобритания).

**Таблица 5:** Состав носителя на липидной основе, применяемый в примерах

	Соединения	Доля (мол. %)	Структура	Масса
1	Холестерин	40,9		386,4
2	1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC)	10		789,6
3	Катионный липид	47,4		765,7
4	PEG-липид	1,7	 Среднее n = ~ 49	2010,1

1.5. Получение комбинированных мРНК-вакцин, содержащих комбинации антигенов (двухвалентные или поливалентные вакцинные композиции):

Комбинированные мРНК-вакцины готовили с LNP путем либо отдельного, либо совместного приготовления. В случае отдельно смешанных или приготовленных мРНК-вакцин получали каждый компонент мРНК и отдельно готовили в LNP, как описано в **примере 1.4**, после чего смешивали различные компоненты, приготовленные в LNP. В случае совместно приготовленной мРНК-вакцины сначала смешивают различные компоненты мРНК, после чего следует совместное приготовление в LNP, как описано в **примере 1.4**.



**Пример 2:** Исследование поливалентности у крыс: Иммуногенность двухвалентной вакцины CV2CoV (R9709) и CV2CoV.351 (R10384) при в/м введении крысам Wistar

В этом исследовании оценивали гуморальную иммуногенность у крыс Wistar, индуцированную приготовленной в LNP двухвалентной мРНК-вакциной CV2CoV/CV2CoV.351 (R9709 /R10384) по сравнению с CV2CoV (R9709) или CV2CoV.351 (R10384).

Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2-предшественника, и вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV.351, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2 B.1.351) получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4** и **примеру 1.5** (отдельно смешивали или готовили («mixed 2 LNP») или совместно готовили («mixed 1 LNP») в случае двухвалентных мРНК-вакцин (группы F, G, H)), после чего применяли в экспериментах по вакцинации *in vivo*.

Иммунизация:

Крысам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 6**. Вакцинированные буфером животные служили отрицательным контролем (группа А). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 21. Образцы крови для определения гуморального иммунного ответа собирали в день 14, день 21 и день 42.

**Таблица 6:** *Схема вакцинации (пример 2)*

Группа	Животные	1-ая вакцинация	2-ая вакцинация	План иммунизации	Выделение сыворотки
А	N = 4	NaCl	NaCl		
В	Wistar Самки	CV2CoV 8 мкг	CV2CoV 8 мкг	День 0,	День 14 День 21
С		CV2CoV.351 8 мкг	CV2CoV.351 8 мкг		
Д		CV2CoV 8 мкг	CV2CoV.351 8 мкг		
Е		CV2CoV.351 8 мкг	CV2CoV 8 мкг		
F		CV2CoV+ CV2CoV.351 совместно	CV2CoV +CV2CoV.351 совместно смешанные (mixed 1) с LNP 8 мкг		

	N = 6	<b>смешанные (mixed 1) с LNP 8 мкг</b>		день 21	День 42
G		CV2CoV + CV2CoV.351 <b>отдельно смешанные (mixed 2) с LNP 8 мкг</b>	CV2CoV+CV2CoV.351: <b>отдельно смешанные (mixed 2) с LNP 8 мкг</b>		
H		CV2CoV ( <b>левая конечность</b> ) 4 мкг CV2CoV.351 ( <b>правая конечность</b> ) 4 мкг	CV2CoV ( <b>левая конечность</b> ) 4 мкг CV2CoV.351 ( <b>правая конечность</b> ) 4 мкг		

CV2CoV представлена как R9709 в Таблице 4, и CV2CoV.351 представлена как R10384 в Таблице 4.

Определение титров связывающих шиповидный белок антител IgG1 и IgG2 с помощью ELISA:

Специфичные к белку - RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 связывающие антитела, представленные в виде титров IgG1 и IgG2a в конечной точке, определяли в сыворотке, выделенной в день 14 и день 21. Для покрытия применяли рекомбинантный белок - RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 или рекомбинантный RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 B.1.351 (K417N, E484K, N501Y). Планшеты с покрытием инкубировали с применением соответствующих разведений сыворотки, и связывание специфичных антител с RBD определяли с помощью биотинилированного антитела.

Определение VNT

Для анализа VNT сыворотки крыс серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки (56°C в течение 30 мин), исследуемые в двух повторностях с начальным разведением 1:10 с последующими серийными разведениями 1:2, инкубировали со 100 TCID<sub>50</sub> SARS-CoV-2. Для этого применяли различные вирусы:

- SARS-CoV-2-предшественник: штамм 2019-nCov/Italy-INMI, полученный от EVAg
- Вариант SARS-CoV-2 B.1.351: штамм hCoV-19/Netherlands/NoordHolland\_10159/2021, южноафриканский вариант, клада следующего штамма 20H, генетическая линия B.1.351, предоставлен EVAg
- Вариант SARS-CoV-2 B.1.1.7: штамм 14484 из мазка от человека, выделенный VisMederi Research, который содержит следующие мутации по сравнению с вирусом-предшественником: N501Y, A570D, T572I, D614G, P681H, T716I, S735L,

S982A, D1118H. Следует отметить, что эти мутации отличаются от консенсусной последовательности варианта 4, то есть делеции dH69/V70 и dY144 отсутствуют, а T572I и S735L представляют собой дополнительные мутации.

- Штамм варианта SARS-CoV-2 P.1: PG\_253, выделенный Сиенским университетом, содержащий следующие мутации: L18F T20N P26S D138Y R190S K417T E484K N501Y D614G H655Y T1027I и V1176F

SARS-CoV-2 дикого типа (штамм 2019-nCov/Italy-INMI, полученный от EVAg) или варианта SARS-CoV-2 B.1.351 (штамм hCoV-19/Netherlands/NoordHolland\_10159/2021, южноафриканский вариант, клада следующего штамма 20H, генетическая линия B.1.351, предоставлен EVAg)

Вирус инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Каждый планшет содержал выделенный ряд (8 лунок) для контроля клеток, который содержит только клетки и среду, и выделенный ряд контроля вируса, который содержит только клетки и вирус. Инфекционный вирус количественно определяли при инкубировании 100 мкл смеси вирус-сыворотка с конфлюэнтным слоем клеток Vero E6 (ATCC, Cat.1586) с последующим инкубированием в течение 3 дней (SARS-CoV-2-предшественник) или 4 дней (SARS-CoV-2 B.1.351, B.1.1.7 и P.1) при 37°C и микроскопической оценкой развития CPE. Для каждой серии выполняли обратное титрование с целью верификации правильного диапазона TCID<sub>50</sub> рабочего раствора вируса. Титры VN рассчитывали согласно методу, описанному Reed & Muench. Если нейтрализации не наблюдалось (MNt <10), сообщалось о произвольном значении 5. Анализ проводился в компании VisMederi srl (Сиена, Италия).

#### Результаты:

Как показано на ФИГ. 1, значимые ответы в виде выработки связывающих антител IgG1 и IgG2a к рецептор-связывающему домену (RBD) SARS-CoV-2-предшественника и RBD варианта B.351 на 14 день (фигура 1 A-D) и на 21 день (фигура 1 E-H) были обнаружены для группы, вакцинированной CV2CoV и CV2CoV.351. На 14 день, как показано на ФИГ. 1 А, были обнаружены сопоставимый ответ IgG1 для всех групп (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) предшественника) и сопоставимые титры IgG2a (ФИГ. 1 В) для всех групп (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника). На 14 день, как показано на ФИГ. 1 С, были обнаружены сопоставимый ответ IgG1 для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD

варианта В.1.351 К417N, Е484К, N501Y) и сопоставимые титры IgG2a (ФИГ. 1 D) для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD варианта В.1.351 К417N, Е484К, N501Y). На 21 день, как показано на ФИГ. 1 E, были обнаружены сопоставимый ответ IgG1 для всех схем вакцинации (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника) и сопоставимые титры IgG2a (ФИГ. 1 F) для всех схем вакцинации (при покрытии белком - рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2-предшественника). На 21 день, как показано на ФИГ. 1 G, были показаны сопоставимый ответ IgG1 для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD варианта В.1.351 К417N, Е484К, N501Y) и сопоставимые титры IgG2a (ФИГ. 1 H) для всех схем вакцинации (при покрытии белком RBD варианта В.1.351 К417N, Е484К, N501Y). В целом, CV2CoV и CV2CoV.351 при введении отдельно (группы В-С), в последовательной комбинации или (группы D-E) при совместной доставке обоих вариантов вакцины (двухвалентная вакцина CV2CoV/CV2CoV.351) в одном и двух видах LNP, при инъекции в одну и ту же конечность или разные конечности (группы F-H) индуцировали сопоставимые уровни связывающих антител к RBD SARS-CoV-2-предшественника и RBD варианта В.1.351.

Как показано на ФИГ. 2 A (день 14) и 2 B (день 21), вакцинация CV2CoV и CV2CoV.351 индуцировала значимые уровни VNT против варианта SARS-CoV-2-предшественника у крыс (группы В-Н). В целом, вакцинация либо вакциной отдельно, либо в комбинации (группы В-Н) обеспечивала высокие уровни VNT. В частности, две вакцинации CV2CoV в группе В, последовательная вакцинация CV2CoV и CV2CoV.351 в группе D и совместная доставка обоих вариантов вакцины (двухвалентная вакцина CV2CoV/CV2CoV.351) в разные конечности (группа Н) показали увеличение VNT в эти ранние моменты времени. На 42 день были обнаружены повышенные уровни VNT для всех групп (группы В-Н) (ФИГ. 2 C). На 42 день двухвалентные вакцины (группы F-H) индуцировали ответы, которые были сопоставимы с таковыми для моновалентных вакцин (группы В-Е), несмотря на применение более низких доз каждой вакцины.

Как показано на ФИГ. 3 A (день 14) и 3 B (день 21), вакцинация CV2CoV и CV2CoV.351 индуцировала значимые уровни VNT против варианта SARS-CoV-2 В.1.351 (группы В-Н). В целом, вакцинация либо вакциной отдельно, либо в комбинации (группы В-Н) обеспечивала достаточные уровни VNT. Две вакцинации CV2CoV.351 в группе С, последовательная вакцинация CV2CoV.351 и CV2CoV в

группе E и совместная доставка обоих вариантов вакцины (двухвалентная вакцина CV2CoV/CV2CoV.351) в разные конечности (группа H) показали увеличение VNT в ранние моменты времени. На 42 день были показаны повышенные уровни VNT для всех групп (группы B-H) (ФИГ. 3 C). На 42 день двухвалентные вакцины (группы F-H) индуцировали ответы, которые были сопоставимы с таковыми для моновалентных вакцин (группы B-E), несмотря на применение более низких доз каждой вакцины.

Как показано на ФИГ. 4, значимая индукция VNT, оцененная с помощью анализа СРЕ, для всех групп (группы B-H) при использовании варианта SARS-CoV-2 B.1.1.7 (ФИГ. 4 A) или B.1.1.28 P.1 (FIG.4 B) была выявлена на 42 день. Совместная доставка обоих вариантов вакцины в одну и ту же конечность (группы F и G) или в разные конечности (группа H) может вызывать ответы против обоих вариантов на 42 день. В таблице 7 приведены медианные значения VNT в отношении вируса-предшественника, вариантов SARS-CoV-2 B.1.1.7, B.1.351 и P1 на 42 день.

**Таблица 7:** Медианные значения VNT (день 42)

Группа	VNT предшественник	VNT B.1.1.7	VNT B.1.351	VNT P.1
A	5	5	5	5
B	3620	4370	2185	4370
C	1065	1225	13860	9801
D	1970	2263	4526	4526
E	1545	3090	8740	8740
F	2560	2560	9801	8740
G	4370	5120	12361	14481
H	4370	6180	12361	14481

В целом, двухвалентная вакцина вызывала устойчивые уровни как связывающих RBD, так и нейтрализующих вирус антител, которые были способны нейтрализовать как SARS-CoV-2-предшественник, так и SARS-CoV-2 B.1.351, а также варианты B.1.1.7 и B.1.1.28 P. 1.

**Пример 3: Исследование зависимости ответа от дозы: Иммуногенность CV2CoV.351 по сравнению с CV2CoV при в/м введении крысам Wistar**

Цель этого исследования заключалась в оценке иммуногенности и стимуляции раннего врожденного иммунного ответа вакциной CV2CoV.351 у крыс в исследовании зависимости ответа от дозы.

Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (приготовленная в LNP вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2-предшественника, и **приготовленная в LNP** вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV.351, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2 B.1.351) получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4**, после чего применяли в экспериментах по вакцинации *in vivo*.

Иммунизация:

Крысам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **Таблице 8**. Вакцинированные буфером животные служили отрицательным контролем (группа А). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 21. Образцы крови для определения титра антител собирали в день 14, день 21 и день 42.

**Таблица 8:** Схема вакцинации (пример 3)

Группа	Животные	Вакцина	Доза мРНК	в/м вакцинация	Сбор крови
А	Wistar Самки N = 4	Отр. контроль (буфер)	/	День 0, день 21	День 14, день 21, день 42
В	Wistar Самки N = 6	CV2CoV.351 (S варианта B.1.351)	0,5 мкг		
С			2 мкг		
Д			8 мкг		
Е			40 мкг		
Ф		CV2CoV (S предшественника)	0,5 мкг		
Г			2 мкг		
Н			8 мкг		
I			40 мкг		

CV2CoV представлена как R9709 в Таблице 4, и CV2CoV.351 представлена как R10384 в Таблице 4.

Определение титров связывающих шиповидный белок антител IgG1 и IgG2 с помощью ELISA и определение VNT выполняли, как описано в примере 2.

Результаты:

Титры специфичных к антигену связывающих антител (при анализе с помощью ELISA) и VNT как против SARS-CoV-2-предшественника, так и против SARS-CoV-2 B.1.351 обнаруживались в зависимости от дозы у животных, вакцинированных обеими

вакцинами. Уровни как связывающих, так и нейтрализующих антител повышались с течением времени и с увеличением дозы.

Как показано на **ФИГ. 5 А (IgG1) и 5 В (IgG2a)** (покрытие RBD SARS-CoV-2-предшественника), а также **5С (IgG1) и 5 D (IgG2a)** (покрытие RBD варианта В.1.351 К417N, Е484К, N501Y), вакцинация **CV2CoV** (группы В-Е) и **CV2CoV.351** (группы F-I) индуцировала титры связывающих шиповидный белок антител при применении доз 0,5 мкг, 2 мкг, 8 мкг и 40 мкг у крыс на 14 день.

Как показано на **ФИГ. 5 Е (IgG1), ФИГ. 5 F (IgG2a)** (покрытие RBD SARS-CoV-2-предшественника), а также **ФИГ. 5 G (IgG1) и 5 Н (IgG2a)** (покрытие RBD варианта В.1.351 К417N, Е484К, N501Y), вакцинация **CV2CoV** (группы В-Е) и **CV2CoV.351** (группы F-I) индуцировала титры связывающих шиповидный белок антител у крыс при применении доз 0,5 мкг, 2 мкг, 8 мкг и 40 мкг на 21 день.

Как показано на **ФИГ. 6 А**, вакцина **CV2CoV.351** против варианта В.1.351 (группы В-Е) индуцировала дозозависимые VNT против SARS-CoV-2-предшественника (гетерологичный ответ) на **14 день** в группах для всех доз. По сравнению с ответами после вакцинации **CV2CoV** (гомологичный ответ), на **14 день** VNT в группах, вакцинированных **CV2CoV.351**, снижаются примерно в 2 раза. На **ФИГ. 6 В** показано, что **CV2CoV.351** (группы В-Е) индуцирует дозозависимые VNT против SARS-CoV-2 В.1.351 (гомологичный ответ) на **14 день** в группах для всех доз. Вакцинация **CV2CoV.351** вызывала высокие уровни VNT против гомологичного вируса, которые на **14 день** были повышены в 45 раз по сравнению с гетерологичными VNT против вируса-предшественника (среднее различие между группами для всех доз). По сравнению с вакцинацией **CV2CoV** (группы F-I), VNT, индуцированные **CV2CoV.351**, на **14 день** были повышены в 41 раз (среднее различие между группами для всех доз).

Как показано на **ФИГ. 6 С**, вакцина **CV2CoV.351** против варианта В.1.351 индуцирует дозозависимые VNT против SARS-CoV-2-предшественника (гетерологичный ответ) на **21 день** в группах для всех доз. По сравнению с ответами после вакцинации **CV2CoV** (гомологичный ответ), на 21 день VNT в группах, вакцинированных **CV2CoV.351**, снижаются примерно в 2 раза. Как показано на **ФИГ. 6 D**, **CV2CoV.351** индуцирует незначительно зависящие от дозы VNT против SARS-CoV-2 В.1.351 (гомологичный ответ) на **21 день** в группах для всех доз. Вакцинация **CV2CoV.351** вызывала высокие уровни VNT против гомологичного вируса, которые на

**21 день** были повышены в 35 раз по сравнению с гетерологичными VNT против вируса-предшественника (среднее различие между группами для всех доз). По сравнению с вакцинацией CV2CoV, VNT, индуцированные CV2CoV.351, на **21 день** были повышены в 42 раза (среднее различие между группами для всех доз). Как показано на ФИГ. 6 Е, вакцина CV2CoV.351 против варианта В.1.351 индуцировала VNT против SARS-CoV-2-предшественника (гетерологичный ответ) на 41 день в группах для всех доз. Незначительно более высокие ответы, за исключением группы с дозой 0,5 мкг (группа F), были показаны после вакцинации CV2CoV (гомологичный ответ). Как показано на ФИГ. 6 F, CV2CoV.351 индуцировала VNT против SARS-CoV-2 В.1.351 (гомологичный ответ) на **42 день** в группах для всех доз. По сравнению с вакцинацией CV2CoV, VNT, индуцированные CV2CoV.351, на **42 день** были повышены. Как показано на ФИГ. 6 G показано, что вакцина CV2CoV.351 против варианта В.1.351 индуцировала VNT против варианта SARS-CoV-2 В. 1.1.7 (гетерологичный ответ) на 42 день в группах для всех доз. Схожие ответы были показаны при вакцинации CV2CoV (гетерологичный ответ). Как показано на ФИГ. 6 H, CV2CoV.351 индуцировала VNT против SARS-CoV-2 В.1.1.28 P.1 (гомологичный ответ) на 42 день в группах для всех доз. Более низкие ответы обнаруживали при вакцинации CV2CoV (гетерологичный ответ).

В целом, кандидатная мРНК-вакцина CV2CoV.351 против варианта SARS-CoV-2 В.1.351 индуцировала устойчивые гуморальные иммунные ответы у крыс, о чем свидетельствуют титры связывающих и вируснейтрализующих антител. Титры вируснейтрализующих антител против В.1.351 были существенно повышены при вакцинации CV2CoV.351 по сравнению с вакцинацией CV2CoV.

**Пример 4: Расширенное исследование поливалентной вакцинации: Имуногенность двухвалентной вакцины CV2CoV и CV2CoV.351 при в/м введении крысам Wistar (пример возможного применения)**

Цель этого исследования заключается в оценке иммуногенности и стимуляции раннего врожденного иммунного ответа двухвалентной вакциной CV2CoV/CV2CoV.351 при третьей вакцинации крыс.

**Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:**

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (приготовленная в LNP вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2-предшественника, и **приготовленная в LNP**



вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV.351, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2 B.1.351) получают, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовят совместно с LNP согласно **примеру 1.4** и **примеру 1.5** (отдельно смешивают или готовят в случае двухвалентных мРНК-вакцин), после чего применяют в экспериментах по вакцинации *in vivo*.

#### Иммунизация:

Крысам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводят композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **Таблице 9**. Вакцинированные буфером животные служат отрицательным контролем (группа А). Всех животных вакцинируют на неделе 0, неделе 3 (день 21), и в случае группы В дополнительно на неделе 15 (день 105). Образцы крови для определения титра антител собирают в день 0, день 14, день 21, день 42, день 77, день 105, день 119 и день 133.

**Таблица 9:** Схема вакцинации (пример 4)

Группа	Животные	1-ая вакцинация неделя 0	2-ая вакцинация неделя 3	3-я вакцинация неделя 15	Выделение сыворотки
А	N = 4	NaCl	NaCl	NaCl	День 0 (18 ч)
В	Wistar Самки N = 6	CV2CoV 8 мкг	CV2CoV 8 мкг	CV2CoV + CV2CoV.351 8 мкг (совместно смешанные (mixed 2) с LNP)	Неделя 2 (день 14) Неделя 3 (день 21) Неделя 6 (день 42)
С		CV2CoV.351 8 мкг	CV2CoV.351 8 мкг		Неделя 11 (день 77)
Д		CV2CoV 8 мкг	CV2CoV.351 8 мкг		Неделя 15 (день 105)
Е		CV2CoV.351 8 мкг	CV2CoV.351 8 мкг		Неделя 17 (день 119)
Ф		CV2CoV+ CV2CoV.351 отдельно смешанные (mixed 1) с LNP 8 мкг	CV2CoV + CV2CoV.351 отдельно смешанные (mixed 1) с LNP 8 мкг		Неделя 19 (день 133)
Г		CV2CoV + CV2CoV.351 совместно смешанные (mixed 2) с LNP	CV2CoV+ CV2CoV.351 : совместно смешанные		

		<b>8 мкг</b>	(mixed 2) с LNP <b>8 мкг</b>		
Н		CV2CoV (левая конечность) <b>4 мкг</b> CV2CoV.351 (правая конечность) <b>4 мкг</b>	CV2CoV (левая конечность) <b>4 мкг</b> CV2CoV.351 (правая конечность) <b>4 мкг</b>		

CV2CoV представлена как R9709 в Таблице 4, и CV2CoV.351 представлена как R10384 в Таблице 4.

Определение титров связывающих шиповидный белок антител IgG1 и IgG2 с помощью ELISA и определение VNT выполняют, как описано в примере 2.

**Пример 5:** Совместная доставка вакцин: Вакцинация крыс мРНК, кодирующей антиген SARS-CoV2-предшественника (CV2CoV) и антиген варианта SARS-CoV2 B.1.351 (CV2CoV.351)

В этом исследовании определяли ответ в виде выработки антител как против SARS-CoV2-предшественника, так и против SARS-CoV-2 B.1.351.

Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2-предшественника, и вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV.351, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2 B.1.351) получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4** и **примеру 1.5** (отдельно смешивали или готовили в случае двухвалентных мРНК-вакцин), после чего применяли *in vivo*.

Иммунизация:

Крысам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 10**. В качестве отрицательного контроля одну группу крыс вакцинировали буфером (группа А). Всех животных вакцинировали в неделю 0 и неделю 3 (день 21). Образцы крови для определения титра антител собирали в день 0, день 14, день 21 и день 42.

**Таблица 10:** Схема вакцинации (пример 5)

Группа	Животные	1-ая вакцинация неделя 0	2-ая вакцинация неделя 3	План иммунизации	Выделение сыворотки
A	Wistar Самки N = 4	NaCl	NaCl	Неделя 0 Неделя 3	День 0 (18 ч) Неделя 2 (день 14) Неделя 3 (день 21) Неделя 6 (день 42)
B	Wistar Самки N = 6	CV2CoV + CV2CoV.351 <b>8 мкг</b>	CV2CoV + CV2CoV.351 <b>8 мкг</b>		
C		CV2CoV + CV2CoV.351 <b>8 мкг</b>	CV2CoV + CV2CoV.351 <b>8 мкг</b>		
D		CV2CoV + CV2CoV.351 <b>0,5 мкг</b>	CV2CoV + CV2CoV.351 <b>0,5 мкг</b>		

CV2CoV представлена как R9709, CV2CoV.351 как R10384 в таблице 4.

Определение титров связывающих шиповидный белок антител IgG1 и IgG2a с помощью ELISA и определение VNT выполняли, как описано в примере 2.

#### Результаты:

В целом, двухвалентная вакцинная композиция CV2CoV + CV2CoV.351 индуцировала сопоставимые уровни связывающих шиповидный белок антител к RBD предшественника и варианта B.1.351 на 14 день (ФИГ. 7 А – 7 D). Значимые уровни связывающих шиповидный белок антител обнаруживались у всех животных, вакцинированных 2 мкг или 8 мкг двухвалентной вакцинной композиции CV2CoV + CV2CoV.351 на 14 день после инъекции. Дозозависимые уровни титров связывающих шиповидный белок антител IgG1 и IgG2a были индуцированы во всех группах, которым вводили 0,5 мкг, 2 мкг или 8 мкг двухвалентной вакцинной композиции CV2CoV + CV2CoV.351. Отношение между антителами IgG1 и IgG2a показало несколько более низкую индукцию антител IgG2a по сравнению с IgG1 для дозы 2 мкг. На ФИГ. 7 А и 7 В показаны связывающие антитела к RBD SARS-CoV-2-предшественника, а на ФИГ. 7 С и 7 D - к RBD варианта B.1.351. В случае групп с дозой 2 и 8 мкг с течением времени дозозависимым образом были индуцированы устойчивые VNT против SARS-CoV-2-предшественника (Фиг. 7Е (день 14), 7F (день 21) и 7I (день 42)) и против варианта SARS-CoV-2 B.1.351 (Фиг. 7G (день 14), 7H (день 21) и 7J (день 42)). На ФИГ. 7 К и 7 L показана дозозависимая индукция VNT против варианта B.1.1.7 и P.1, соответственно, для групп с дозами 2 мкг и 8 мкг.

Пример 6: Исследование бустерной иммунизации: Вакцинация крыс двухвалентной вакциной CVnCoV и CVnCoV.351 при в/м введении крысам Wistar

Это исследование выполнено с возможностью определения, способна ли гомологичная бустерная иммунизация вызывать значимое повышение иммунного ответа против гетерологичного варианта (B.1.351).

Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (приготовленная в LNP вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2-предшественника, и приготовленная в LNP вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV.351, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2 B.1.351) получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Как указано в таблицах 4 и 11, в некоторых конструкциях уридин был заменен на 1-метилпсевдоуридин. Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4**, после чего применяли *in vivo*.

Иммунизация:

Крысам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 11**. В качестве отрицательного контроля одну группу крыс вакцинировали буфером (группа А). Всех животных вакцинировали в неделю 0 (день 1) и неделю 3 (день 21) одной и той же вакцинной композицией. В неделю 15 животные получали третью вакцинацию, часть - другой вакцинной композицией. Образцы крови для определения VNT собирали в день 0, день 15, день 21, день 42, день 77, день 105, день 119 и день 133.

**Таблица 11:** Схема вакцинации (пример 6)

Группа	Животные	1-ая вакцинация неделя 0	2-ая вакцинация неделя 3	3-я вакцинация неделя 15	Доза	План иммунизации	Выделение сыворотки
А	N = 4	NaCl	NaCl	NaCl	/		
В	Wistar Самки N = 6	m1Ψ S предшественника (R10162)	m1Ψ S предшественника (R10162)	CV2CoV S предшественника	8 мкг	День 0, день 21, День 105 (3M)	День 0, День 15 День 21 День 42
С		m1Ψ S предшественника (R10162)	m1Ψ S предшественника (R10162)	CV2CoV 351 S варианта			День 119 День 105 День 133
Д		CV2CoV	CV2CoV	CV2CoV			

		S предшествен ника	S предшестве нника	S предшестве нника			
E		CV2CoV S предшествен ника	CV2CoV S предшестве нника	CV2CoV.35 1 S варианта			
F		CVnCoV S предшествен ника	CVnCoV S предшестве нника	CV2CoV S предшестве нника			
G		CVnCoV S предшествен ника	CVnCoV S предшестве нника	CV2CoV.35 1 S варианта			

CV2CoV представлена как R9709 в Таблице 4, и CV2CoV.351 представлена как R10384 в Таблице 4.

Определение VNT выполняли, как описано в примере 2.

Результаты:

В целом, бустерная иммунизация либо CV2CoV, либо CV2CoV.351 через три месяца после двух праймирующих вакцинаций CVnCoV, CV2CoV или «m1Ψ S предшественника» (R10162) индуцировала значимое повышение вируснейтрализующих антител как против SARS-CoV-2-предшественника, так и против SARS-CoV-2 B.1.351 (ФИГ. 8 А и 8 В, соответственно). Бустерная иммунизация как CV2CoV, так и CV2CoV.351 индуцировала VNT, которые были способны нейтрализовать SARS-CoV-2-предшественника и варианты SARS-CoV-2 B.1.351, B.1.1.7 и P.1 (ФИГ. 8 С – 8 F).

VNT против SARS-CoV-2-предшественника (ФИГ. 8 А):

CVnCoV индуцировала устойчивые VNT против SARS-CoV-2-предшественника у крыс после двух вакцинаций (группы G и F). Титры оставались легко определяемыми до бустерной иммунизации на 105 день при незначительном снижении определяемых титров с течением времени.

CV2CoV (гомологичная вакцина) показала высокую бустерную способность на фоне праймирующей вакцинации CVnCoV (группа F): VNT против SARS-CoV-2-предшественника были значимо повышены в 109 раз (день 105 по сравнению с днем 119) при бустерной иммунизации CV2CoV.

По сравнению с ответами при бустерной иммунизации CV2CoV, титры против SARS-CoV-2-предшественника, индуцированные бустерной иммунизацией

CV2CoV.351 (гетерологичной вакциной), были ниже (группа G). Наблюдаемое различие между титрами, обнаруживаемыми на 105 и 119 день, достигало 6-кратного увеличения. Однако различие не было статистически значимым.

Схожие результаты могут быть достигнуты при праймирующей вакцинации CV2CoV или «m1Ψ S предшественника» (R10162), при этом титры перед третьей («бустерной») вакцинацией на 105 день значимо повышаются по сравнению с VNT, индуцированными CVnCoV.

VNT против SARS-CoV-2 B.1.351 (ФИГ. 8 В):

CVnCoV индуцировала устойчивые VNT против SARS-CoV-2 B.1.351 у крыс после двух вакцинаций. Однако в целом титры были ниже, чем против SARS-CoV-2-предшественника (при сравнении ФИГ. 8 В с ФИГ. 8 А). Бустерная иммунизация CV2CoV.351 (гомологичной вакциной) индуцировала значимое повышение в 109 раз при сравнении VNT, обнаруживаемых на 105 день по сравнению с 119 днем (группа G).

CV2CoV (гетерологичная вакцина) показала высокую бустерную способность на фоне праймирующей вакцинации CVnCoV (группа F): VNT против SARS-CoV-2 B.1.351 были значимо повышены в 256 раз (день 105 по сравнению с днем 119) при бустерной иммунизации CV2CoV.

Схожие результаты могут быть достигнуты при праймирующей вакцинации CV2CoV или «m1Ψ S предшественника» (R10162), при этом титры перед третьей («бустерной») вакцинацией значимо повышаются по сравнению с VNT, индуцированными CVnCoV.

Вируснейтрализующие ответы против SARS-CoV-2-предшественника, а также против вариантов SARS-CoV-2 B.1.1.7 (альфа), B.1.351 (бета) и P.1 (гамма) исследовали через 14 дней после бустерной иммунизации (ФИГ. 8 С – 8 F).

Бустерная иммунизация CV2CoV.351 (гомологичной вакциной, группы С, Е и G) на 119 день индуцировала выраженные VNT не только против SARS-CoV-2 B.1.351 (ФИГ. 8 D), но и против SARS-CoV-2-предшественника (ФИГ. 8 С), SARS-CoV-2 B.1.1.7 (ФИГ. 8 Е) и P.1 (ФИГ. 8 F) (гетерологичная вакцина).

**Пример 7: Вакцинация мышей мРНК-вакцинами, кодирующими варианты SARS-CoV-2**

Это исследование выполнено с возможностью определения, индуцируют ли вакцинации мРНК-вакцинами, кодирующими варианты SARS-CoV-2, иммуногенность с перекрестной нейтрализующей способностью.

Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 вакцины против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующей полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния белок SARS-CoV-2-предшественника или варианта SARS-CoV-2, получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4**, после чего применяли *in vivo*.

Иммунизация:

Мышам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 12**. В качестве отрицательного контроля одну группу мышей вакцинировали буфером (группа 1). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 21. Образцы крови для определения титра антител собирали в день 0, день 14, день 21 и день 42.

**Таблица 12:** Схема вакцинации (пример 7)

Группа	Животные	мРНК	Доза	План иммунизации	Выделение сыворотки
1	N = 8  Самки Balb/c	Отр. контроль: NaCl	/	День 0, день 21	День 0 День 14 День 21 День 42
2		R9709 CV2CoV (предшественник)	1 мкг		
3		R10357 B1.1.7 (альфа)			
4		R10384 B1.351 (бета) CV2CoV.351			
5		R10410 B.1.1.7 + E484K			
6		R10385 P.1 (гамма)			
7		R10452 B.1.351 (бета)			

Определение титров антител IgG1 с помощью ELISA:

ELISA проводили с использованием рекомбинантного S-белка SARS-CoV-2 (RBD SARS-CoV-2-предшественника или RBD варианта B.1.351 (K427N, E484K, N501Y)) для покрытия. Планшеты с покрытием инкубировали с применением соответствующих разведений сыворотки, и связывание специфичных антител с RBD или вариантом RBD SARS-CoV-2 определяли с помощью биотинилированных специфичных к изотипу антител к иммуноглобулинам мыши с последующим применением стрептавидина-HRP (пероксидазы хрена) и Amplex в качестве субстрата. Титры антител в конечной точке определяли с помощью ELISA на 14 день после праймирующей вакцинации.

Определение VNT:

Определение VNT, оцениваемых с помощью анализа CPE, выполняли, как описано в **примере 2**. Для определения VNT против варианта SARS-CoV-2 дельта

использовали штамм вируса hCoV-19/France/IDF-APHP-HEGP-20-23-2131905084/2021|EPI\_ISL\_2029113|2021-04-27, содержащий следующие мутации: T19R, E156G, d157F, d158R, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N.

#### Внутриклеточное окрашивание цитокинов:

Спленоциты вакцинированных мышей выделяли в день 42 в соответствии со стандартным протоколом, известным в данной области техники. Кратко, изолированные селезенки измельчали через клеточное сито и промывали в PBS/1%FBS с последующим лизисом эритроцитов. После стадии длительной промывки PBS/1%FBS спленоциты высевали в 96-луночные планшеты ( $2 \times 10^6$  клеток на лунку). Клетки стимулировали смесью специфичных пептидов S-белка SARS-CoV-2-предшественника (1 мкг/мл) в присутствии 2,5 мкг/мл антитела к CD28 (BD Biosciences) в течение 6 часов при 37°C в присутствии ингибитора транспорта белка. Ту же процедуру повторяли для стимуляции спленоцитов смесью специфичных пептидов S-белка SARS-CoV-2 В.1.351. После стимуляции клетки промывали и окрашивали для выявления внутриклеточных цитокинов с помощью реагента Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Для окрашивания применяли следующие антитела: Thy1.2-FITC (1:200), CD8-APC-Cy7 (1:200), TNF-PE (1:100), IFN $\gamma$ -APC (1:100) (eBioscience), CD4-BD Horizon V450 (1:200) (BD Biosciences) и инкубировали с реагентом Fc $\gamma$ -block, разбавленным 1:100. Чтобы отличить живые клетки от мертвых, использовали реагент Aqua Dye (Invitrogen). Данные о клетках получали с помощью проточного цитометра ZE5 (Bio-Rad). Результаты проточной цитометрии анализировали с помощью пакета программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.).

#### Результаты:

На 14 день все исследуемые конструкции мРНК-вакцины против SARS-CoV-2, кодирующие полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния белок SARS-CoV-2-предшественника или варианта SARS-CoV-2, индуцировали высокий уровень ответа в виде выработки антител IgG к RBD SARS-CoV-2-предшественника (ФИГ. 9 А) и RBD варианта В.1.351 (K417N, E484K, N501Y) ФИГ. 9 В.

Все исследуемые конструкции мРНК-вакцины продемонстрировали выраженную индукцию VNT на 42 день, что является наиболее значимым, а также индукцию, обнаруживаемую в более ранние моменты времени (день 14, день 21) в случае гомологичной нейтрализации (ФИГ. 9 С: группа 2, предшественник; ФИГ. 9 D: группа 3, В.1.1.7; ФИГ. 9 Е: группы 4 и 7, В.1.351; ФИГ. F: группа 6, P1).



Как показано на ФИГ. 9 G-J, вакцинация мРНК, кодирующей различные варианты полноразмерных стабилизированных S-белков, индуцировала устойчивые уровни антиген-специфичных IFN $\gamma$ /TNF дважды положительных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток после двух вакцинаций на 42 день в схожей степени при стимуляции спленоцитов библиотеками пептидов предшественника (ФИГ. G и H) или B.1.351 (ФИГ. I и J).

**Пример 8: Вакцинация мышей мРНК-вакцинами, кодирующими варианты SARS-CoV-2**

Это исследование выполнено с возможностью определения, индуцирует ли вакцинация мРНК-вакцинами, кодирующими варианты SARS-CoV-2, иммуногенность с перекрестной нейтрализующей способностью.

**Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:**

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (приготовленная в LNP вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S (S\_stab) SARS-CoV-2-предшественника или варианта SARS-CoV-2) получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4**, после чего применяли *in vivo*.

**Иммунизация:**

Мышам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 13**. В качестве отрицательного контроля одну группу мышей вакцинировали буфером (группа 13). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 21. Образцы крови для определения титра антител собирали в день 0, день 14, день 21 и день 42.

**Таблица 13: Схема вакцинации (пример 8)**

Группа	Животные	мРНК	Доза	План иммунизации	Выделение сыворотки
1	N = 8  Самки Balb/c	R9709	1 мкг	День 0, день 21	День 0 День 14 День 21 День 42
2		R10384 B.1.351 (Бета, Южная Африка)			
3		R10631 E484K, D614G			
4		R10614 B.1.429 (Эпсилон, США)			
5		R10520 B.1.525 (Эта, различное происхождение)			
6		R10577 B.1.525_v2 (Эта, различное происхождение)			

7	R10575 B.1.258 (Чешская Республика)			
8	R10579 B.1.526_v1 (Йота, США)			
9	R10581 B.1.526_v2 (Йота, США)			
10	R10592 A.23.1_v1 (Руанда/Уганда)			
11	R10616 P.1_v2 (Гамма, Бразилия)			
12	R10360 B.1.617_v2 8 (Дельта, Индия)			
13	Отр. контроль: NaCl	-		

Определение VNT с гомологичным и гетерологичными вариантами может быть выполнено, как описано в **примере 2**. Для анализа Т-клеток спленоциты выделяли в день 42.

Анализ Т-клеток методом внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS):

Спленоциты вакцинированных мышей выделяли в соответствии со стандартным протоколом, известным в данной области техники. Кратко, изолированные селезенки измельчали через клеточное сито и промывали в PBS/1%FBS с последующим лизисом эритроцитов. После стадии длительной промывки PBS/1%FBS спленоциты высевали в 96-луночные планшеты ( $2 \times 10^6$  клеток на лунку). Клетки стимулировали смесью специфичных пептидов S-белка SARS-CoV-2-предшественника (1 мкг/мл) в присутствии 2,5 мкг/мл антитела к CD28 (BD Biosciences) в течение 6 часов при 37°C в присутствии ингибитора транспорта белка. После стимуляции клетки промывали и окрашивали для выявления внутриклеточных цитокинов с помощью реагента Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Для окрашивания применяли следующие антитела: Thy1.2-FITC (1:200), CD8-APC-Cy7 (1:200), TNF-PE (1:100), IFN $\gamma$ -APC (1:100) (eBioscience), CD4-BD Horizon V450 (1:200) (BD Biosciences) и инкубировали с реагентом Fc $\gamma$ -block, разбавленным 1:100. Чтобы отличить живые клетки от мертвых, использовали реагент Aqua Dye (Invitrogen). Данные о клетках получали с помощью проточного цитометра ZE5 (Bio-Rad). Результаты проточной цитометрии анализировали с помощью пакета программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.).

Результаты:

Как показано на **ФИГ. 10**, вакцинация мРНК, кодирующей различные варианты полноразмерных стабилизированных S-белков, индуцировала устойчивые уровни антиген-специфичных IFN $\gamma$ /TNF дважды положительных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (**ФИГ. 10 А и В**, соответственно) после двух вакцинаций на 42 день при стимуляции спленоцитов библиотекой пептидов предшественника. Представляется вероятным, что

гуморальные ответы (ELISA или VNT) будут реагировать схожим образом, как показано в **примере 7** (исследование для конструкций вакцин из **таблицы 13** еще не проводилось).

**Пример 9А: Вакцинация мышей мРНК-вакцинами, кодирующими варианты SARS-CoV-2 (пример возможного применения)**

В рамках этого исследования можно определить, индуцирует ли вакцинация мРНК-вакцинами, кодирующими варианты SARS-CoV-2, иммуногенность с перекрестной нейтрализующей способностью.

**Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP**

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S (S\_stab) SARS-CoV-2-предшественника или варианта SARS-CoV-2 получают, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовят совместно с LNP согласно **примеру 1.4**, после чего применяют *in vivo*.

**Иммунизация:**

Мышам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводят композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 14А**. В качестве отрицательного контроля одну группу мышей вакцинируют буфером (группа 1). Всех животных вакцинируют в день 0 и день 21. Образцы крови для определения титра антител собирают в день 0, день 14, день 21 и день 42.

**Таблица 14А: Схема вакцинации**

Группа	Животные	мРНК	Доза	План иммунизации	Выделение сыворотки
1	N = 8 Самки Balb/c	Отр. контроль:0,9% NaCl	-		
2		R9709 (предшественник)	1 мкг	День 0 День 21	День 0 День 14 День 21 День 42
3		R10800 C37.1 (Лямбда, Перу)			
4		R10679 B.1.621 (Мю, Колумбия)			
5		R10630 B.1.617.2 (Дельта)			
6		R10884 B.1.617.2.v2 (Дельта)			
7		R10801 AY.1			
8		R10802 AY.2			
9		R11036 AY.4.2			

Определение VNT с гомологичным и гетерологичными вариантами выполняют, как описано в **примере 2** и **примере 7**. Для анализа Т-клеток спленоциты выделяют в день 42. Анализ Т-клеток методом внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS)

проводят, как описано в **примере 8**. Другие конструкции, кодирующие новые появляющиеся варианты, могут быть исследованы схожим образом.

**Пример 9В: Вакцинация крыс мРНК-вакцинами, кодирующими варианты SARS-CoV-2 (пример возможного применения)**

В рамках этого исследования можно определить, индуцирует ли вакцинация мРНК-вакцинами, кодирующими варианты SARS-CoV-2, иммуногенность с перекрестной нейтрализующей способностью.

**Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:**

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S (S\_stab) варианта омикрон SARS-CoV-2 получают, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовят совместно с LNP согласно **примеру 1.4**, после чего применяют *in vivo*.

**Иммунизация:**

Крысам Wistar путем внутримышечной (в/м) инъекции вводят композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 14В**. В качестве отрицательного контроля одну группу крыс вакцинируют буфером (группа 1). Всех животных вакцинируют в день 0 и день 21. Образцы крови для определения титра антител собирают в день 0, день 14, день 21 и день 42.

**Таблица 14В: Схема вакцинации**

Группа	Животные	мРНК	Доза мРНК	План иммунизации	Выделение сыворотки
1	Wistar Самки N = 6	Отр. контроль: 0,9% NaCl	-	День 0 День 21	День 0 День 14 День 21 День 42
2	Wistar Самки N = 8	CV2CoV.529 (S варианта омикрон), прир. Nt	2 мкг		
3		CV2CoV.529 (S варианта омикрон), прир. Nt	8 мкг		
4		CV2CoV.529 (S варианта омикрон), прир. Nt	20 мкг		
5		CV2CoV.529 (S варианта омикрон) ψ	2 мкг		
6		CV2CoV.529 (S варианта омикрон) ψ	8 мкг		
7		CV2CoV.529 (S варианта омикрон) ψ	20 мкг		
8		CV2CoV.529 (S варианта омикрон) m1ψ	2 мкг		

9		CV2CoV.529 (S варианта омикрон) ml $\psi$	8 мкг		
10		CV2CoV.529 (S варианта омикрон) ml $\psi$	20 мкг		

CV2CoV.529 представлена, например, как R11175, R11176, R11177\*\*, R11178\*\* в таблице 4.

Определение VNT с гомологичным и гетерологичными вариантами SARS-CoV-2 выполняют, как описано в **примере 2**. Для анализа Т-клеток спленоциты выделяют в день 42. Анализ Т-клеток методом внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) проводят, как описано в **примере 8**. Другие конструкции, кодирующие новые появляющиеся варианты, могут быть исследованы схожим образом.

**Пример 10:** Расширенное исследование поливалентной вакцинации: Иммуногенность двухвалентной вакцины CV2CoV и CV2CoV.351 при в/м введении крысам Wistar

Целью этого исследования является оценка вторичного иммунного ответа после вакцинации CVnCoV при третьей вакцинации поливалентной CV2CoV/CV2CoV.351.

Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2-предшественника, и вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК CV2CoV.351, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S SARS-CoV-2 B.1.351) получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4** и **примеру 1.5** (отдельно смешивали или готовили в случае двухвалентных мРНК-вакцин), после чего применяли в экспериментах по вакцинации *in vivo*.

Иммунизация:

Крысам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 14**. Вакцинированные буфером животные служили отрицательным контролем (группа С). Всех животных вакцинировали в неделю 0, неделю 3 (день 21) и неделю 15 (день 105). Образцы крови для определения титра антител собирали в день 0, день 14, день 21, день 42, день 77, день 105, день 119 и день 133.

**Таблица 15:** *Схема вакцинации (пример 10)*

Группа	Животные	1-ая вакцинация неделя 0	2-ая вакцинация неделя 3	3-я вакцинация неделя 15	Выделение сыворотки
А	N = 4	NaCl	NaCl	NaCl	День 0 (18 ч) Неделя 2 (день 14) Неделя 3 (день 21) Неделя 6 (день 42) Неделя 11 (день 77) Неделя 15 (день 105) Неделя 17 (день 119) Неделя 19 (день 133)
В	Wistar Самки N = 6	CVnCoV 16 мкг	CVnCoV 16 мкг	CV2CoV + CV2CoV.351 8 мкг (совместно смешанные (mixed 2) с LNP)	
С		CV2CoV 8 мкг	CV2CoV 8 мкг	CV2CoV + CV2CoV.351 8 мкг (совместно смешанные (mixed 2) с LNP)	

CVnCoV представлена как R9515, CV2CoV как R9709, и CV2CoV.351 как

R10384 в таблице 4.

Определение VNT выполняли, как описано в **примере 2**.

#### Результаты:

Как показано на ФИГ. 11 А, CVnCoV и CV2CoV индуцировали устойчивые VNT против SARS-CoV-2-предшественника у крыс после двух вакцинаций. Титры оставались легко определяемыми до бустерной иммунизации на 105 день при незначительном снижении определяемых титров с течением времени в случае CVnCoV.

Двухвалентная вакцинная композиция CV2CoV + CV2CoV.351 показала высокую бустерную способность на фоне праймирующей вакцинации CVnCoV: VNT против SARS-CoV-2-предшественника были значимо повышены в 30 раз (день 105 по сравнению с днем 119) и в 45 раз (день 105 по сравнению с днем 133) при бустерной иммунизации CV2CoV + CV2CoV.351 (группа В). На фоне праймирующей вакцинации CV2CoV двухвалентная вакцинная композиция CV2CoV + CV2CoV.351 показала дополнительную бустерную способность в отношении уже высоких VNT на 105 день.

Как показано на ФИГ. 11 В, CVnCoV индуцировала устойчивые VNT против SARS-CoV-2 В.1.351 у крыс после двух вакцинаций. Титры против В.1.351 были в целом ниже, чем титры против вируса-предшественника. Титры оставались легко определяемыми до бустерной иммунизации на 105 день при незначительном снижении определяемых VNT с течением времени в случае животных, вакцинированных

CVnCoV и CV2CoV. Двухвалентная вакцинная композиция CV2CoV + CV2CoV.351 показала высокую бустерную способность на фоне праймирующей вакцинации CVnCoV: VNT против SARS-CoV-2 B.1.351 были значимо повышены в 19 раз (день 105 по сравнению с днем 119) и в 75 раз (день 105 по сравнению с днем 133) при бустерной иммунизации CV2CoV + CV2CoV.351. На фоне праймирующей вакцинации CV2CoV двухвалентная вакцинная композиция CV2CoV + CV2CoV.351 показала дополнительную бустерную способность в отношении уже высоких VNT против SARS-CoV-2 B.1.351 на 105 день.

Тогда как обнаруживаемые титры нейтрализующих антител против B.1.351 оставались ниже, чем титры, индуцированные против SARS-CoV-2-предшественника, до 105 дня эксперимента, VNT против обоих вирусов, определенные при бустерной иммунизации вакцинной композицией CV2CoV + CV2CoV.351, достигали сопоставимых уровней к 133 дню (ФИГ. 11 А по сравнению с ФИГ. 11 В).

Как показано на ФИГ. 11 С– 11 F, на 119 день как в группе В, так и в группе С были индуцированы устойчивые и высокие VNT не только против SARS-CoV-2-предшественника и SARS-CoV-2 B.1.351, но и против вариантов SARS-CoV-2 B.1.1.7 и P.1 (ФИГ. 11 С: предшественник, ФИГ. 11 D: B.1.351, ФИГ. 11 E: B.1.1.7, ФИГ. 11 F: P.1).

В заключение, бустерная иммунизация двухвалентной вакцинной композицией CV2CoV + CV2CoV.351 через три месяца после двух праймирующих вакцинаций CVnCoV или CV2CoV индуцировала значимое повышение VNT против SARS-CoV-2-предшественника и SARS-CoV-2 B.1.351, а также вызывала высокие уровни VNT против вариантов B.1.1.7 и P.1.

#### **Пример 11: Вакцинация крыс мРНК, кодирующей антиген S<sub>stab</sub> варианта SARS-CoV-2 B1.617.2**

##### Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:

Конструкции мРНК, кодирующие стабилизированный шиповидный белок (S<sub>stab</sub>) варианта дельта (B1.617.2), получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Как указано в таблицах 4 и 11, в некоторых конструкциях уридин был заменен на псевдоуридин ( $\psi$ ) или 1-метилпсевдоуридин (m1 $\psi$ ). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4**, после чего применяли в экспериментах по вакцинации *in vivo*.

##### Иммунизация:

Крысам Wistar (n = 8) путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 13**. В качестве отрицательного контроля одну группу крыс вакцинировали буфером (группа 1, n = 6). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 21. Образцы крови для определения титра антител собирали в день 21 (после праймирующей иммунизации) и день 42 (после бустерной иммунизации).

**Таблица 16: Схема вакцинации (пример 11)**

Группа	Вакцинная композиция	ID мРНК	CDS opt.	SEQ ID NO: Белок	SEQ ID NO: РНК	Доза
1	буфер		--	--	--	--
2	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта)	R10630	opt1	27095	27394	2 мкг
3	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта)	R10630	opt1	27095	27394	8 мкг
4	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта)	R10630	opt1	27095	27394	20 мкг
5	CVCoV.617.2 без hsl (S варианта дельта)	R10824	opt1	27095	27532	2 мкг
6	CVCoV.617.2 без hsl (S варианта дельта)	R10824	opt1	27095	27532	8 мкг
7	CVCoV.617.2 без hsl (S варианта дельта)	R10824	opt1	27095	27532	20 мкг
8	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта) ψ	R10827	opt1	27095	28762	2 мкг
9	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта) ψ	R10827	opt1	27095	28762	8 мкг
10	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта) ψ	R10827	opt1	27095	28762	20 мкг
11	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта) m1ψ	R10828	opt1	27095	28762	2 мкг
12	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта)	R10828	opt1	27095	28762	8 мкг



	дельта) m1ψ					
13	CV2CoV.617.2 (S варианта дельта) m1ψ	R10828	opt1	27095	28762	20 мкг

CV2CoV.617.2 представлена как R10630, CVCov.617.2 без hsl как R10824, CV2CoV.617.2 ψ как R10827, и CV2CoV.617.2 m1ψ как R10828 в таблице 4. В случае R10827 уридин был заменен на ψ (псевдоуридин), а в случае R10828 уридин был заменен на m1ψ (1-метилпсевдоуридин).

Определение титров связывающих шиповидный белок антител-общего IgG с помощью ELISA и определение VNT выполняли, как описано в **примере 2**. Для определения IgG методом ELISA использовали рекомбинантный белок-RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 B.1.617.2 (L452R, T478K, вариант дельта). (Для определения VNT против B.1.617.2 дельта использовали следующий штамм: генетическая линия: дельта - B.1.617.2, штамм: hCoV-19/France/IDF-APHP-HEGP-20-23-2131905084/2021|EPI\_ISL\_2029113|2021-04-27 (T19R E156G d157F d158R L452R T478K D614G P681R D950N).

#### Результаты:

Как показано на **ФИГ. 12 А и В**, вакцинация различными форматами мРНК, кодирующей полноразмерный стабилизированный S-белок (варианта дельта B1.617.2), приготовленной в LNP, индуцировала у крыс значимые уровни титров связывающих шиповидный белок антител на 14 день и 42 день при применении доз 2 мкг, 8 мкг и 20 мкг. Вторая вакцинация приводила к дальнейшему повышению титров антител.

В случае групп с дозой 2, 8 и 20 мкг были дозозависимым образом индуцированы устойчивые VNT против варианта SARS-CoV-2 B1.617.2, которые с течением времени временем повышались. VNT обнаруживались уже на 14 день после первой инъекции во всех группах, включая дозу 2 мкг (**ФИГ. 12 А**, день 14), **ФИГ. 12 В** (день 21) и **ФИГ. 12 С** (день 42). Также были индуцированы устойчивые гетерологичные VNT против SARS-CoV-2-предшественника (**ФИГ. 12F**), против варианта SARS-CoV-2 B.1.351 (**ФИГ. 12G**) и против варианта SARS-CoV-2 P.1 (**ФИГ. 12H**).

Полученные результаты показывают, что введение природных нуклеотидов (группы 2-7) или химически модифицированных нуклеотидов ((ψ (псевдоуридин, группы 8-10) или m1ψ (1-метилпсевдоуридин, группы 11-13)) в конструкции мРНК индуцирует сопоставимые уровни VNT против различных вариантов на 42 день с

тенденцией к улучшению VNT при применении химически модифицированных нуклеотидов (группы 8-13).

**Пример 12: Исследование поливалентности у крыс: Иммуногенность двухвалентных вакцинных композиций при в/м введении крысам Wistar**

В этом исследовании оценивали гуморальную иммуногенность у крыс Wistar, индуцированную различными приготовленными в LNP двухвалентными композициями мРНК-вакцин.

**Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP**

Конструкции мРНК SARS-CoV-2 (вакцина против SARS-CoV-2 на основе мРНК, кодирующая полноразмерный стабилизированный в конформации до слияния S варианта SARS-CoV-2) получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4** и **примеру 1.5** (отдельно смешивали или готовили в случае двухвалентных мРНК-вакцин), после чего применяли в экспериментах по вакцинации *in vivo*.

**Иммунизация:**

Крысам путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили двухвалентные композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 6**. Вакцинированные буфером животные служили отрицательным контролем (группа 1). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 21. Образцы крови для определения гуморального иммунного ответа собирали в день 14, день 21 и день 42.

**Таблица 17: Схема вакцинации (пример 12)**

Группа	Животные	Вакцинная композиция	ID мРНК	SEQ ID NO: Белок	SEQ ID NO: РНК	Доза	План иммунизации	Выделение сыворотки
1	N = 4	Отр. контроль (буфер)		--	--	--	День 0 День 21	День 1 День 14 День
2	Wistar Самки N = 6	CV2CoV.617.2	R10630	27095	27394	8 мкг		
3		CV2CoV.617.2 m1ψ	R10828	27095	28762	8 мкг		
4		CV2CoV +CV2CoV.617.2	R9709 + R10630	10 + 27095	149 + 27394	8 мкг		
5		CV2CoV m1ψ. + CV2CoV.617.2 m1ψ	R10159 + R10828	10 + 27095	149 + 28762	8 мкг		

6	CV2CoV.351 + CV2CoV.617.2	R10384 + R10630	22961 + 27095	23531 + 27394	8 мкг	21 День 42
7	CV2CoV D614G + CV2CoV.617.2	R10166 + R10630	22738 + 27095	22792 + 27394	8 мкг	
8	CV2CoV D614G m1ψ + CV2CoV.617.2 m1ψ	R10813 + R10828	22738 + 27095	28737 + 28762	8 мкг	

В случае некоторых конструкций уридин был заменен на m1ψ (1-метилпсевдоуридин): R10828, R10159, R10813.

Определение титров связывающих шиповидный белок антител-общего IgG с помощью ELISA выполняли, как описано в **примере 2**. Для покрытия использовали рекомбинантный белок-RBD шиповидного белка SARS-CoV-2-предшественника, RBD варианта В.1.617.2 (L452R, T478K: дельта) или RBD В.1.351 (K417N, E484K, N501Y: бета).

#### Результаты:

Вакцинация двухвалентными вакцинными композициями, содержащими различные форматы мРНК, содержащей природные или химически модифицированные нуклеотиды (m1ψ (1-метилпсевдоуридин)), кодирующей полноразмерный стабилизированный шиповидный белок различных вариантов (более подробно см. **таблицу 17**), приготовленной в LNP, индуцировала у крыс устойчивые и высокие уровни титров связывающих шиповидный белок антител на 14 день. На **ФИГ. 13** представлены как гомологичные, так и гетерологичные ответы. (**ФИГ. 13 А**: RBD SARS-CoV-2-предшественника; **ФИГ. 13 В**: RBD В.1.617.2 (L452R, T478K, дельта); **ФИГ. 13 С**: RBD В.1.351 (K417N, E484K, N501Y, бета). Конструкции с модифицированными нуклеотидами индуцируют более высокий титр общего IgG, чем конструкции с природными нуклеотидами, в случае как гомологичных, так и гетерологичных ответов.

#### **Пример 13: Исследование заражения SARS-CoV-2 В.1.351 и В.1.617.2 у мышей k18-hACE2**

Как правило, мыши не восприимчивы к инфекции SARS-CoV-2, однако была разработана генетически модифицированная модель у мышей, которые экспрессируют рецептор ACE2 (hACE2) человека, необходимый для проникновения вируса в клетку-хозяина, под промотором K18. Исходно указанная модель была разработана для

исследования возбудителя SARS (SARS-CoV) (MCCRAY, Paul B., et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology*, 2007, 81. Jg., Nr. 2, S. 813-821), однако в настоящее время ее также используют в качестве подходящей модели у мелких животных для COVID-19. Ранее было показано, что мыши hACE2 восприимчивы к SARS-CoV-2 и демонстрируют течение заболевания, сопровождающееся снижением массы тела, легочной патологией и симптомами, схожими с таковыми у людей (например, BAO, Linlin, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*, 2020, 583. Jg., Nr. 7818, S. 830-833, или YINDA, Claude Kwe, et al. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. *PLoS pathogens*, 2021, 17. Jg., Nr. 1, S. e1009195; DE ALWIS, Ruklanthi M., et al. A Single Dose of Self-Transcribing and Replicating RNA Based SARS-CoV-2 Vaccine Produces Protective Adaptive Immunity In Mice. *BioRxiv*, 2020.). По существу, мыши K18-hACE2 являются подходящими для исследований вакцин с целью изучения предупреждения инфекции SARS-CoV-2 или вариантами SARS-CoV-2 или снижения вирусной нагрузки, и вместе с тем для изучения коррелятов и причин защитного действия мРНК-вакцины против COVID-19 с помощью общепринятых иммунологических методов, которые обычно доступны для моделей у мышей.

Настоящий пример показывает, что мРНК-вакцины против S вариантов SARS-CoV-2 способны защищать мышей K18-hACE2 от заражения вирусом SARS-CoV-2, что может быть продемонстрировано, например, путем определения вирусной нагрузки инфицированных животных, наблюдения за прогрессированием заболевания, сопровождающимся снижением массы тела, легочной патологией и другими симптомами, или с помощью патогистологического исследования и оценки выживаемости.

#### Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:

Конструкции мРНК для вакцины против SARS-CoV-2 получали, как описано в **примере 1.2** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4** и **примеру 1.5** (отдельно смешивали или готовили в случае двухвалентных мРНК-вакцин), после чего применяли в экспериментах по вакцинации *in vivo*.

#### Иммунизация и заражение:

Трансгенным мышам K18-hACE2 (самки,  $n=2 \times 10$ ) путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин, указанные в **таблице 18** (группы 1-4). В

качестве отрицательного контроля одна группа мышей получала буфер (группа 5). Животных вакцинировали в день 0 и день 28 указанными дозами в объеме 20 мкл. Образцы крови для определения титра антител собирали в день 0, день 28 (после праймирующей иммунизации), день 56 (после бустерной иммунизации) и день 66 (после заражения). Животных интраназально (и/н) заражали/инфицировали вирусом SARS-CoV-2 ( $10^{4,375}$  TCID<sub>50</sub> на мышь SARS-CoV-2 B.1.351 и  $10^{4,375}$  TCID<sub>50</sub> SARS-CoV-2 B.1.617.2, рассчитано на основе обратного титрования исходного материала) на 56 день и в течение 10 дней отслеживали изменения массы тела, общее состояние здоровья и выживаемость, являющиеся показателями защиты от заражения. Дополнительные показатели защиты включают снижение вирусной нагрузки в легких и других органах, а также снижение легочной патологии. Выделение РНК, а также RT-qPCR и sgRNA RT-PCR проводили, как описано в источнике Hoffmann et al 2021 (Hoffmann, D., Corleis, B., Rauch, S. et al. CVnCoV and CV2CoV protect human ACE2 transgenic mice from ancestral B BavPat1 and emerging B.1.351 SARS-CoV-2. Nat Commun 12, 4048 (2021)).

**Таблица 18:** Схема вакцинации (пример 13)

Группа	Вакцинная композиция	ID мРНК	5'-UTR/ 3'-UTR; Конструкция UTR	3'- конец	SEQ ID NO: Белок	SEQ ID NO: РНК	Доза
1	CV2CoV	R9709	HSD17B4/ PSMB3; a-1	hSL- A100	10	149	0,5 мкг
2	CV2CoV.351	R10384	HSD17B4/ PSMB3; a-1	hSL- A100	22961	23531	0,5 мкг
3	CV2CoV.617.2	R10630	HSD17B4/ PSMB3; a-1	hSL- A100	27095	27394	0,5 мкг
4	CV2CoV.351 + CV2CoV.617.2	R10384 + R10630	HSD17B4/ PSMB3; a-1	hSL- A100	22961 + 27095	23531 + 27394	0,25 мкг + 0,25 мкг
5	Буфер с NaCl						

Твердофазный иммуноферментный анализ антител к RBD (ELISA)

Сыворотки анализировали с помощью непрямого многовидового ELISA на основе RBD (предшественника) SARS-CoV-2. Для этого планшеты для ELISA (Greiner Bio-One GmbH) покрывали RBD в количестве 100 нг/лунку в течение ночи при 4°C в 0,1 М карбонатном буфере (1,59 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 2,93 г NaHCO<sub>3</sub>, до 1 л дист. воды, pH 9,6) или обрабатывали только буфером для иммобилизации. После этого планшеты блокировали в течение 1 ч. при 37°C с применением 5% обезжиренного молока в PBS. Сыворотки предварительно разводили 1/100 в TBS-Tween (TBST) и инкубировали в лунках с покрытием и без покрытия в течение 1 ч. при к. т. Многовидовой конъюгат (SBVMILK; получен из ID Screen® Schmallenberg virus Milk Indirect ELISA; IDvet) разводили 1/80, и затем добавляли на 1 ч. при к. т. После добавления субстрата-тетраметилбензидина (IDEXX) данные ELISA регистрировали при длине волны 450 нм на приборе Tecan Spectra Mini (Tecan Group Ltd.). После каждой стадии планшеты три раза промывали TBST. Поглощение рассчитывали путем вычитания оптической плотности, определенной в лунках без покрытия, из значений, полученных в лунках, покрытых белком, для соответствующего образца. Следует отметить, что ELISA определяет относительную величину уровней Ig к RBD и, следовательно, не позволяет проводить прямое сравнение между различными исследованиями.

#### Тест на нейтрализацию вируса (VNT)

Сыворотки предварительно разводили 1/16 или 1/32 DMEM в исходном 96-луночном планшете с глубокими лунками. В трех повторных исследованиях 100 мкл этих предварительно разведенных образцов переносили в 96-луночный планшет. Разведение log<sub>2</sub> проводили путем переноса 50 мкл разведения сыворотки в 50 мкл DMEM, оставляя по 50 мкл разведения сыворотки в каждой лунке. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл разведения соответствующего вируса SARS-CoV-2 (B.1.351 или B.1.617.2) (100 TCID<sub>50</sub>/лунку) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. В конце в каждую лунку добавляли 100 мкл обработанных трипсином клеток VeroE6 (клетки из одного содержащего конфлюэнтный слой флакона TC175 на 100 мл) в DMEM с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина. Через 72 часа инкубирования при 37°C лунки оценивали с помощью световой микроскопии. Разведение сыворотки считали нейтрализующим при отсутствии видимого специфичного CPE. Титр вируса подтверждали титрованием вируса, включали положительные и отрицательные образцы сыворотки.

#### Результаты:

Эффективность вакцины оценивали путем заражения мышей либо вариантом SARS-CoV-2 В.1.351, либо вариантом SARS-CoV-2 В.1.627.2. Как показано на ФИГ. 14, мыши во всех группах вакцинации (группы 1-4) получают пользу от вакцинации композицией, содержащей мРНК, кодирующую шиповидные белки SARS-CoV-2-предшественника или варианта. На ФИГ. 14 А и В показана выживаемость зараженных мышей по дням после инфицирования/заражения (ФИГ. 14 А: заражение В.1.351, ФИГ. 14 В: заражение В.1.617.2). Вакцинация всеми исследуемыми мРНК-вакцинами приводила к полной защите мышей (100% выживаемости) от обоих протестированных вариантов SARS-CoV-2, независимо от кодируемого варианта шиповидного белка (группа 1: предшественник, группа 2: В.1.351, группа 3 В.1.617.2, группа 4 В.1.351 +3 В.1.617.2). На ФИГ. 14С и D показано изменение массы тела в процентах по дням после инфицирования/заражения. (ФИГ. 14 С: заражение В.1.351, ФИГ. 14 D: заражение В.1.617.2, среднее значение массы тела в процентах). Мыши во всех группах вакцинации (группы 1-4) не показали существенного снижения массы тела.

Для исследования того, предупреждала ли вакцинация продуктивную инфекцию или распространение реплицирующегося SARS-CoV-2, на 4 день после инфицирования брали мазки со слизистой оболочки полости рта для наблюдения за нагрузкой вирусной РНК в слюне. В группе имитации 8/9 или 6/9 образцов были положительными по вирусному геному после инфицирования вариантом SARS-CoV-2 В.1.351 или SARS-CoV-2 В.1.617.2, соответственно (ФИГ. 14 Е: группа заражения В.1.351, ФИГ. 14 F: группа заражения В.1.617.2). Напротив, после вакцинации мРНК в мазках со слизистой оболочки полости рта не было обнаружено вирусных геномов ни в одной из групп заражения независимо от группы вакцины (только у одной мыши в группе вакцинации CV2CoV были обнаружены вирусные геномы, ФИГ. 14 Е, группа 1). Для дальнейшего изучения предупреждения репликации вируса после заражения через 10 дней после инфицирования анализировали вирусную нагрузку в верхних дыхательных путях (ВДП) (раковинах) и нижних дыхательных путях (НДП) (легких), а также в центральной нервной системе (головном мозге, мозжечке/большом мозге). У мышей, зараженных SARS-CoV-2 В.1.351, во всех группах вакцинации наблюдали снижение определяемой репликации вируса по сравнению с невакцинированными мышами (группа 5) в ВДП (ФИГ. 14 G). Этот эффект был более заметным у мышей, зараженных вариантом SARS-CoV-2 В.1.617.2 (ФИГ. 14 H). У мышей, вакцинированных LNP-мРНК, кодирующей шиповидный белок варианта SARS-CoV-2 В.1.617.2 (группа 3), не

наблюдали репликации в раковинах после заражения гомологичным вирусом (ФИГ. 14 Н). Ни одно животное не было положительным при низком уровне РНК SARS-CoV-2 в нижних дыхательных путях (НДП), что указывает на защиту от инфекции вариантом SARS-CoV-2 В.1.351 и вариантом SARS-CoV-2 В.1.617.2 во всех группах (ФИГ. 14 I и J, соответственно). Схожие результаты были получены для мозга (ФИГ. 14 K и L для мозжечка, ФИГ. 14 M и N для большого мозга (для группы заражения В.1.351: ФИГ. 14 K и M, для В.1.617.2: ФИГ. 14 L и N).

Двухвалентная вакцина (группа 4) индуцировала защиту от обоих вариантов вируса (В.1.351 и В.1.617.2), сопоставимую с таковой для моновалентных вакцин (группы 1-3), несмотря на применение более низких доз каждой вакцины.

В сыворотках всех вакцинированных мышей, собранных в день 28 (тестировали только для группы заражения В.1.351) и день 56 (для обеих групп), была показана выраженная индукция общего иммуноглобулина (Ig) к RBD независимо от того, шиповидный белок какого варианта кодировала мРНК (ФИГ. 14 O: группа заражения В.1.351, ФИГ. 14 P: группа заражения В.1.617.2). О выраженной индукции антител к RBD в группах, получавших мРНК-вакцину, свидетельствовали высокие титры вируснейтрализующих антител (VNT) (ФИГ. 14 Q: группа В.1.351 после заражения, ФИГ. 14 R: группа В.1.617.2 до заражения, ФИГ. 14 S: группа В.1.617.2 после заражения). В целом, при применении схемы праймирующей-бустерной вакцинации исследуемые мРНК-вакцины индуцировали устойчивый ответ в виде выработки антител, способных эффективно нейтрализовать как вариант SARS-CoV-2 В.1.351, так и вариант SARS-CoV-2 В.1.617.2 *in vitro*.

#### Пример 14: Исследование заражения хомячков, вакцинированных CV2CoV или CV2CoV.351

Профилактическую эффективность LNP-мРНК, кодирующей S<sub>stab</sub> варианта В.1.351, приготовленной в LNP (CV2CoV.351), изучали на сирийских хомячках. Эта модель соответствует легкой - умеренной степени патологии, связанной с заболеванием легких, у человека и является одной из общепризнанных и принятых моделей для исследования иммуногенности и патогенеза, относящихся к человеку (Muñoz-Fontela *et al.*, PMID 32967005). Хомячки восприимчивы к инфекции SARS-CoV-2 дикого типа, что приводит к высокому уровню репликации вируса и патогистологическим изменениям в органах-мишенях вируса.

#### Получение мРНК-вакцины, приготовленной в LNP:



Конструкции мРНК S SARS-CoV-2 получали, как описано в **примере 1** (транскрипция РНК *in vitro*). Очищенную с помощью HPLC мРНК готовили совместно с LNP согласно **примеру 1.4**, после чего применяли в экспериментах по вакцинации *in vivo*.

#### Иммунизация и заражение:

Сирийским золотистым хомячкам (n=9/группу) путем внутримышечной (в/м) инъекции вводили композиции мРНК-вакцин в дозах, указанных в **таблице 19**. В качестве отрицательного контроля одна группа хомячков не получала лечения и подвергалась имитации инфицирования (буфером) (группа А), другой группе вводили NaCl в качестве контроля буфера. Животных под кратковременной ингаляционной анестезией интраназально заражали с применением 70 мкл варианта SARS-CoV-2 B.1.351 в дозе  $10^{5.25}$  TCID<sub>50</sub> на хомячка (рассчитано на основе обратного титрования исходного материала) на 56 день. В течение нескольких дней после инфицирования помимо ежедневного стандартного физического обследования и оценки массы тела отслеживали выделение вируса. Для оценки выделения вируса у каждого хомячка отдельно собирали назальные смывы под кратковременной анестезией изофлураном. Образцы крови для определения титра антител собирали в день 28 (после праймирующей иммунизации), день 55 (после бустерной иммунизации) и день 60 (после заражения).

**Таблица 19: Схема вакцинации (пример 14):**

Группа	Вакцинная композиция	ID мРНК	доза	вакцинация	SEQ ID NO: Белок	SEQ ID NO: РНК
1	NaCl	-	-	день 0, день 28		
2	CV2CoV.351	R10384	1 мкг	день 0, день 28	22961	23531
3	CV2CoV.351	R10384	4 мкг	день 0, день 28	22961	23531
4	CV2CoV.351	R10384	12 мкг	день 0, день 28	22961	23531

#### Анализ антител

Образцы крови для определения антител-общего IgG с помощью ELISA собирали в дни 0, 28, 55 и 60. Планшеты покрывали 1 мкг/мл RBD S SARS-CoV-2-предшественника в течение 4-5 ч. при 37°C. Планшеты блокировали в 10% молоке в течение ночи, промывали и инкубировали с сывороткой в течение 2 ч при комнатной

температуре. Для детекции сыворотки хомячков инкубировали с биотинилированным антителом козы к IgG (сирийского) хомячка (BioLegend, Cat: 405601) с последующим инкубированием с HRP-стрептавидином (BD, Cat: 554066). Детекцию специфичных сигналов проводили на планшетном анализаторе BioTek SynergyHTX с возбуждением при длине волны 530/25, детектированием испускания при длине волны 590/35 и чувствительностью 45.

Титры вируснейтрализующих антител (VNT) в образцах сыворотки хомячков анализировали, как описано в **примере 13**, с использованием только варианта вируса SARS-CoV-2 B.1.351.

#### Вирусная нагрузка в дыхательных путях

РНК выделяли из назального смыва в различные моменты времени и из образцов ткани легкого (краниальной, медиальной, каудальной) через 4 дня после заражения. Выделение РНК с последующим обнаружением субгеномной РНК (sgRNA) с помощью RT-qPCR проводили, как описано в источнике Hoffmann et al 2021 (Hoffmann, D., Corleis, B., Rauch, S. *et al.* CVnCoV and CV2CoV protect human ACE2 transgenic mice from ancestral B BvPat1 and emerging B.1.351 SARS-CoV-2. *Nat Commun* 12, 4048 (2021)).

#### Результаты

Эффективность вакцины исследовали путем заражения хомячков дозой  $10^{5.25}$  TCID<sub>50</sub>/хомячка варианта SARS-CoV-2 B.1.351. На **ФИГ. 15 А** показано изменение массы тела в процентах по дням после заражения. Мыши во всех группах вакцинации (группы 2-4) не показали существенного снижения массы тела. Масса тела не получавших лечения мышей с течением временем снижалась до 90% массы тела (группа 1).

Для исследования того, предупреждала ли вакцинация продуктивную инфекцию SARS-CoV-2, анализировали назальные смывы на 2, 4, 8 и 12 дни после заражения для наблюдения за нагрузкой вирусной РНК у инфицированного животного. В группах вакцинации (группы 2-4) вирусная нагрузка, определенная путем обнаружения sgRNA, была незначительно снижена по сравнению с не получавшим лечения контролем (группа 1) (**ФИГ. 15 В**). Что более показательно, было обнаружено значительное снижение уровня вирусных геномов (при определении по sgRNA) в нижних дыхательных путях (НДП) (краниальной, медиальной, каудальной долях легкого) после вакцинации мРНК-вакциной. Только одно животное было в небольшой степени

положительным по РНК SARS-CoV-2 B.1.351 в группе с дозой 12 мкг вакцины CV2CoV.351 (группа 4), что указывает на защиту от инфекции вариантом SARS-CoV-2 B.1.351 (ФИГ. 15 С).

В сыворотках мышей, собранных в день 28, день 55 и день 60, была показана выраженная индукция общего иммуноглобулина (Ig) к RBD (ФИГ. 15 D). Об указанной индукции антител к RBD в группах, получавших мРНК-вакцину, свидетельствовали устойчивые титры вируснейтрализующих антител (VNT) (см. ФИГ. 15 E (незаштрихованные символы - до заражения (день 55), заштрихованные символы - после заражения в день 60)). В целом, при применении схемы праймирующей-бустерной вакцинации исследуемые мРНК-вакцины индуцировали устойчивый ответ в виде выработки антител, способных эффективно нейтрализовать вариант SARS-CoV-2 B.1.351.

**Пример 15 (пример возможного применения):**

Чтобы продемонстрировать безопасность и эффективность композиции (композиций) мРНК-вакцин, инициируют клиническое исследование (фазы I). В указанном клиническом исследовании когорте людей-добровольцев по меньшей мере два раза (например, в день 0 и день 28) внутримышечно вводят кодирующую шиповидный белок варианта SARS-CoV-2 мРНК, приготовленную в LNP согласно настоящему изобретению. Для того, чтобы оценить профиль безопасности вакцинных композиций согласно настоящему изобретению, после введения осуществляют наблюдение за субъектами (показатели жизненно важных функций, оценка переносимости в месте вакцинации, анализ крови). Эффективность иммунизации анализируют путем определения титров вируснейтрализующих антител (VNT) в сыворотке вакцинированных субъектов. Образцы крови собирают в день 0 в качестве образцов на исходном уровне, а также после завершения вакцинации. Сыворотки анализируют с целью определения вируснейтрализующих антител.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**1.** РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем: K986, V987, A67, H69, V70, T95, G142, V143, Y144, Y145, N211, L212, 214, G339, S371, S373, S375, S477, T478, E484, Q493, G496, Q498, N501, Y505, T547, D614, H655, N679, P681, N764, D796, N856, Q954, N969, L981, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**2.** РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем: K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, N212del, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**3.** РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем:

K986, V987, A67, H69, V70, T95, G142, V143, Y144, Y145, N211, L212, 214, G339, S371, S373, S375, S477, T478, E484, Q493, G496, Q498, N501, Y505, T547, D614, H655, N679, P681, N764, D796, N856, Q954, N969, L981, относительно последовательности SEQ ID NO: 1; и

по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем:

L452, E484, P681, E154, D614 и Q1071; или

L452, P681, T19, E156, F157, R158, T478, D614 и D950, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

4. ПНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем:

K986P, V987P, A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, 655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K и L981F, относительно последовательности SEQ ID NO: 1; и

по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем:

L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H; или

L452R, P681R, T19R, E156G, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

5. ПНК по любому из пп. 1-4, где указанный по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 28540-28588, 28917-28920.

6. ПНК по любому из пп. 1-5, где указанный шиповидный белок (S) содержит или состоит из фрагмента S1 шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта.

7. ПНК по любому из пп. 1-6, где указанный по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или на 95% идентичных любой из SEQ ID NO: 28540-28588, 28917-28920.

**8.** РНК по любому из пп. 1-7, где указанный шиповидный белок (S) представляет собой стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (S\_stab), содержащий по меньшей мере одну мутацию, стабилизирующую конформацию до слияния.

**9.** РНК по п. 8, где указанная по меньшей мере одна стабилизирующая конформацию до слияния мутация включает следующие аминокислотные замены: K986P и V987P.

**10.** РНК по любому из пп. 1-9, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность дополнительно кодирует один или более гетерологичных пептидных или белковых элементов, выбранных из сигнального пептида, линкера, хелперного эпитопа, элемента кластеризации антигена, элемента тримеризации, трансмембранного элемента и/или образующей вирусоподобные частицы (VLP) последовательности.

**11.** РНК по п. 10, где по меньшей мере один гетерологичный пептидный или белковый элемент представляет собой гетерологичный элемент кластеризации антигена, гетерологичный элемент тримеризации и/или образующую VLP последовательность.

**12.** РНК по любому из пп. 1-11, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность представляет собой кодирующую последовательность с модифицированными кодонами, где аминокислотная последовательность, кодируемая указанной по меньшей мере одной кодирующей последовательностью с модифицированными кодонами, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой соответствующей кодирующей последовательностью дикого типа или референсной кодирующей последовательностью.

**13.** РНК по п. 12, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность с модифицированными кодонами выбрана из кодирующей последовательности с максимизированным содержанием C, кодирующей последовательности с максимизированным индексом адаптации кодонов (CAI), кодирующей последовательности, адаптированной по частоте использования кодонов человека, кодирующей последовательности с модифицированным содержанием G/C и кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C или любой их комбинации.

**14.** РНК по п. 12 или п. 13, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность с модифицированными кодонами представляет собой кодирующую последовательность с оптимизированным содержанием G/C, кодирующую последовательность, адаптированную по частоте использования кодонов человека, или кодирующую последовательность с модифицированным содержанием G/C.

**15.** РНК по любому из пп. 1-14, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность имеет содержание G/C, составляющее по меньшей мере примерно 50%, 55% или 60%.

**16.** РНК по любому из пп. 1-15, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность кодирует S-белок, содержащий стабилизирующую конформацию до слияния мутацию K986P и V987P, где кодирующая последовательность содержит или состоит из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 28589-28637, 28921-28924.

**17.** РНК по любому из пп. 1-16, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну поли(A)-последовательность, предпочтительно содержащую от 30 до 200 аденозиновых нуклеотидов, и/или по меньшей мере одну поли(C)-последовательность, предпочтительно содержащую от 10 до 40 цитозиновых нуклеотидов.

**18.** РНК по любому из пп. 1-17, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну гистоновую структуру «стебель-петля».

**19.** РНК по любому из пп. 1-18, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну поли(A)-последовательность, содержащую от 30 до 200 аденозиновых нуклеотидов, где 3'-концевой нуклеотид указанной РНК представляет собой аденозин.

**20.** РНК по любому из пп. 1-19, где по меньшей мере одна гетерологичная 3'-нетранслируемая область (3'-UTR) содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 3'-UTR гена, выбранного из PSMB3, ALB7, CASP1, COX6B1, GNAS, NDUFA1 и RPS9, или из гомолога, фрагмента или варианта любого из этих генов.

**21.** РНК по любому из пп. 1-20, где по меньшей мере одна гетерологичная 5'-нетранслируемая область (5'-UTR) содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 5'-UTR гена, выбранного из HSD17B4, RPL32,

ASAHI, ATP5A1, MP68, NDUFA4, NOSIP, RPL31, SLC7A3, TUBB4B и UBQLN2, или из гомолога, фрагмента или варианта любого из этих генов.

**22.** РНК по любому из пп. 1-21, содержащая по меньшей мере одну гетерологичную 5'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 5'-UTR HSD17B4, и по меньшей мере одну гетерологичную 3'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 3'-UTR PSMB3.

**23.** РНК по любому из пп. 1-22, содержащая, от 5'-конца к 3'-концу:

- i) структуру 5'-cap1;
- ii) 5'-нетранслируемую область (UTR), полученную из 5'-UTR гена HSD17B4, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 232;
- iii) указанную по меньшей мере одну кодирующую последовательность;
- iv) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 254;
- v) возможно, гистоновую последовательность структуры «стебель-петля»; и
- vi) поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов А, где 3'-концевой нуклеотид указанной РНК представляет собой аденозин.

**24.** РНК по любому из пп. 1-23, где указанная РНК представляет собой мРНК (матричную РНК), самореплицирующуюся РНК, кольцевую РНК или РНК-репликон.

**25.** РНК по любому из пп. 1-24, где указанная РНК представляет собой мРНК.

**26.** РНК по п. 25, где указанная мРНК не является РНК-репликоном или самореплицирующейся РНК.

**27.** РНК по любому из пп. 1-26, где указанная РНК содержит 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7G, cap0, cap1, cap2, модифицированную структуру cap0 или модифицированную структуру cap1, предпочтительно структуру 5'-cap1.

**28.** РНК по любому из пп. 1-27, где указанная РНК не содержит замены на 1-метилпсевдоуридин.

**29.** РНК по любому из пп. 1-28, где указанная РНК не содержит химически модифицированных нуклеотидов.

**30.** РНК по любому из пп. 1-29, где указанная РНК содержит замену на псевдоуридин или 1-метилпсевдоуридин.



**31.** РНК по любому из пп. 1-30, где указанная РНК представляет собой РНК, полученную путем транскрипции *in vitro*, где транскрипция РНК *in vitro* была выполнена в присутствии оптимизированной по последовательности смеси нуклеотидов и аналога кэпа, предпочтительно где оптимизированная по последовательности смесь нуклеотидов не содержит химически модифицированных нуклеотидов.

**32.** РНК по любому из пп. 1-31, где указанная РНК представляет собой очищенную РНК, предпочтительно РНК, которая была очищена с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) и/или тангенциальной поточной фильтрации (TFF).

**33.** РНК по любому из пп. 1-32, где РНК представляет собой очищенную РНК, которая была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF и содержит примерно на 5%, 10% или 20% меньше побочных продуктов двухцепочечной РНК, чем РНК, которая не была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF.

**34.** РНК по любому из пп. 1-33, где РНК представляет собой очищенную РНК, которая была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF и содержит примерно на 5%, 10% или 20% меньше побочных продуктов двухцепочечной РНК, чем РНК, которая была очищена с помощью очистки на Oligo dT, преципитации, фильтрации и/или анионообменной хроматографии.

**35.** Композиция, содержащая РНК, определенную в любом из предшествующих пунктов, где указанная композиция, возможно, содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

**36.** Композиция по п. 35, где указанная композиция представляет собой поливалентную композицию, содержащую множество или по меньшей мере одну дополнительную РНК наряду с РНК, определенной в любом из пп. 1-34.

**37.** Композиция по п. 36, где каждая из множества или по меньшей мере более чем одной РНК поливалентной композиции кодирует отличный от других шиповидный белок, предпочтительно стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок.

**38.** Композиция по п. 37, где различные шиповидные белки или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки получены из различных вариантов/изолятов вируса SARS-CoV-2.

**39.** Композиция по п. 38, где различные шиповидные белки или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки получены из варианта В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), В.1.351 (Южная Африка), В.1.1.7 (Великобритания), Р.1 (Бразилия), В.1.429 (Калифорния), В.1.525 (Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Нью-Йорк), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Индия), В.1.617.2 (Индия), В.1.617.3 (Индия), Р.2 (Бразилия), С37.1 (Перу) или В.1.1.621.

**40.** Композиция по п. 38 или п. 39, где различные шиповидные белки или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки получены по меньшей мере из варианта В.1.1.529, ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4 и/или ВА.1\_v5 и В.1.617.2

**41.** Композиция по любому из пп. 35-40, где указанная композиция содержит РНК с целостностью РНК 70% или более.

**42.** Композиция по любому из пп. 35-40, где указанная композиция содержит РНК со степенью кэпирования 70% или более, предпочтительно где по меньшей мере 70%, 80% или 90% молекул РНК содержат структуру Cap1.

**43.** Композиция по любому из пп. 35-40, где РНК находится в комплексе или ассоциирована, или по меньшей мере частично находится в комплексе или частично ассоциирована с одним или более катионным или поликатионным соединением, предпочтительно катионным или поликатионным полимером, катионным или поликатионным полисахаридом, катионным или поликатионным липидом, катионным или поликатионным белком, катионным или поликатионным пептидом или любыми их комбинациями.

**44.** Композиция по п. 43, где РНК находится в комплексе или ассоциирована с одним или более липидами или носителями на основе липидов, тем самым образуя липосомы, липидные наночастицы (LNP), липоплексы и/или нанолипосомы, предпочтительно инкапсулирующие по меньшей мере одну РНК.

**45.** Композиция по п. 43 или п. 44, где РНК находится в комплексе с одним или более липидами, тем самым образуя липидные наночастицы.

**46.** Композиция по п. 44 или п. 45, где LNP содержит катионный липид согласно формуле III-3:

(III-3).

**47.** Композиция по любому из пп. 44-45, где LNP содержит PEG-липид формулы (IVa):

(IVa),

где  $n$  имеет среднее значение в диапазоне от 30 до 60, предпочтительно где  $n$  имеет среднее значение примерно 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, наиболее предпочтительно где  $n$  имеет среднее значение 49 или 45.

**48.** Композиция по любому из пп. 44-47, где LNP содержит PEG-липид формулы (IVa):

(IVa),

где  $n$  представляет собой целое число, выбранное таким образом, чтобы средняя молекулярная масса PEG-липида составляла примерно 2500 г/моль.

**49.** Композиция по любому из пп. 44-48, где LNP содержит один или более нейтральных липидов и/или один или более стероидов или аналогов стероидов.

**50.** Композиция по п. 49, где нейтральный липид представляет собой 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), предпочтительно где молярное отношение катионного липида к DSPC находится в диапазоне от примерно 2:1 до примерно 8:1.

**51.** Композиция по п. 49, где стероид представляет собой холестерин, предпочтительно где молярное отношение катионного липида к холестерину находится в диапазоне от примерно 2:1 до примерно 1:1.

**52.** Композиция по любому из пп. 44-51, где LNP содержит

(i) по меньшей мере один катионный липид, предпочтительно липид формулы (III), более предпочтительно липид III-3;

(ii) по меньшей мере один нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC);

(iii) по меньшей мере один стероид или аналог стероида, предпочтительно холестерин; и

(iv) по меньшей мере один конъюгированный с полимером липид, предпочтительно PEG-липид, полученный из соединения формулы (IVa при  $n = 49$ ),

где (i) - (iv) находятся в следующем молярном отношении: примерно 20-60% катионного липида, 5-25% нейтрального липида, 25-55% стерола и 0,5-15% PEG-липида.

**53.** Композиция по любому из пп. 44-51, где LNP содержит

(i) по меньшей мере один катионный липид, предпочтительно липид формулы (III), более предпочтительно липид III-3;

(ii) по меньшей мере один нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC);

(iii) по меньшей мере один стероид или аналог стероида, предпочтительно холестерин; и

(iv) по меньшей мере один конъюгированный с полимером липид, предпочтительно PEG-липид, полученный из соединения формулы (IVa при  $n = 45$ ),

где (i) - (iv) находятся в следующем молярном отношении: примерно 20-60% катионного липида, 5-25% нейтрального липида, 25-55% стерола и 0,5-15% PEG-липида.

**54.** Композиция по п. 52 или п. 53, где (i) - (iv) находятся в молярном отношении, составляющем примерно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7.

**55.** Композиция по любому из пп. 45-54, содержащая менее примерно 20% свободной (не находящейся в комплексе или не инкапсулированной) РНК, предпочтительно менее примерно 15% свободной РНК, более предпочтительно менее примерно 10% свободной РНК.

**56.** Композиция по любому из пп. 45-55, где массовое отношение липида к РНК составляет от примерно 10:1 до примерно 60:1, предпочтительно от примерно 20:1 до примерно 30:1, например, примерно 25:1.

**57.** Композиция по любому из пп. 45-56, где отношение  $n/p$  для LNP, инкапсулирующих РНК, находится в диапазоне от примерно 1 до примерно 10, предпочтительно в диапазоне от примерно 5 до примерно 7, более предпочтительно составляет примерно 6.

**58.** Композиция по любому из пп. 45-57, где указанная композиция имеет значение индекса полидисперсности (PDI) менее примерно 0,4, предпочтительно менее примерно 0,3, более предпочтительно менее примерно 0,2, наиболее предпочтительно менее примерно 0,1.

**59.** Композиция по любому из пп. 44-58, где LNP:

(a) имеют Z-средний размер в диапазоне от примерно 60 нм до примерно 120 нм, предпочтительно менее примерно 120 нм, более предпочтительно менее примерно 100 нм, наиболее предпочтительно менее примерно 80 нм;

(b) содержат менее примерно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% LNP, имеющих размер частиц, превышающий примерно 500 нм; и/или

(c) содержат менее примерно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% LNP, имеющих размер частиц менее примерно 20 нм.

**60.** Композиция по любому из пп. 44-59, где по меньшей мере примерно 80%, 85%, 90%, 95% носителей на основе липидов имеют сферическое строение, предпочтительно включающее твердое ядро или частично твердое ядро.

**61.** Композиция по любому из пп. 44-60, где указанная композиция имеет мутность в диапазоне от примерно 150 единиц мутности по формазину (FNU) до примерно 0,0 FNU, предпочтительно примерно 50 FNU или менее, более предпочтительно примерно 25 FNU или менее.

**62.** Композиция по любому из пп. 35-61, дополнительно содержащая:

(a) сахар в концентрации от примерно 50 до примерно 300 мМ, предпочтительно сахарозу в концентрации примерно 150 мМ;

(b) соль в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ, предпочтительно NaCl в концентрации примерно 75 мМ; и/или

(c) буферный агент в концентрации от 1 мМ до примерно 100 мМ, предпочтительно  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  в концентрации примерно 10 мМ.

**63.** Композиция по любому из пп. 35-62, где указанная композиция имеет pH в диапазоне от pH примерно 7,0 до pH примерно 8,0, предпочтительно pH примерно 7,4.

**64.** Композиция по любому из пп. 35-60, где указанная композиция представляет собой лиофилизированную композицию.

**65.** Композиция по п. 64, где содержание воды в указанной лиофилизированной композиции составляет менее примерно 10%, предпочтительно где содержание воды в указанной лиофилизированной композиции составляет от примерно 0,5% до 5%.

**66.** Композиция по любому из пп. 35-63, где по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% РНК остается интактной в течение по меньшей мере примерно двух недель после хранения в виде жидкости при температуре примерно 5°C.

**67.** Композиция по п. 66, где по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% РНК остается интактной в течение от примерно 2 недель до примерно 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или 1 года после хранения в виде жидкости при температуре примерно 5°C.

**68.** Композиция по п. 66, где по меньшей мере 80% РНК остается интактной после примерно двух недель хранения в виде жидкости при температуре примерно 5°C.

**69.** Композиция по любому из пп. 35-68, где РНК и носитель на основе липида, инкапсулирующий РНК, были очищены с применением по меньшей мере одной стадии очистки, предпочтительно по меньшей мере одной стадии TFF, и/или по меньшей мере одной стадии осветления, и/или по меньшей мере одной стадии фильтрации.

**70.** Вакцина, содержащая РНК по любому из пп. 1-34 и/или композицию по любому из пп. 35-69.

**71.** Вакцина по п. 70, где указанная вакцина вызывает адаптивный иммунный ответ, предпочтительно защитный адаптивный иммунный ответ против коронавируса, предпочтительно против коронавируса SARS-CoV-2.

**72.** Вакцина по п. 70 или п. 71, где указанная вакцина представляет собой поливалентную вакцину, содержащую множество или по меньшей мере более одной из РНК, определенных в любом из пп. 1-34, или множество или по меньшей мере более одной из композиций, определенных в любом из пп. 35-69.

**73.** Набор или составной набор, содержащий РНК по любому из пп. 1-34, и/или композицию по любому из пп. 35-69, и/или вакцину по пп. 70-72, возможно, содержащий жидкий носитель для сольубилизации, и, возможно, технические инструкции, содержащие информацию о введении и дозе компонентов.

**74.** РНК по любому из пп. 1-34, композиция по любому из пп. 35-69, вакцина по пп. 70-72, набор или составной набор по п. 73 для применения в качестве лекарственного средства.

**75.** РНК по любому из пп. 1-34, композиция по любому из пп. 35-69, вакцина по пп. 70-72, набор или составной набор по п. 73 для применения для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройства, связанного с такой инфекцией, предпочтительно COVID-19.

**76.** Способ лечения или предупреждения расстройства, где указанный способ включает нанесение или введение нуждающемуся в этом субъекту РНК по любому из пп. 1-34, композиции по любому из пп. 35-69, вакцины по пп. 70-72, применение набора или составного набора по п. 73.

**77.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 76, где указанное расстройство представляет собой инфекцию коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройство, связанное с такой инфекцией, предпочтительно COVID-19.

**78.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 76 или п. 77, дополнительно определяемый как способ предупреждения инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 или расстройства, связанного с такой инфекцией, предпочтительно COVID-19.

**79.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 76, дополнительно определяемый как способ предупреждения инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 или расстройства, связанного с такой инфекцией, где инфекция обусловлена изолятом SARS-CoV-2, выбранным из В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), В.1.351 (Южная Африка), В.1.1.7 (Великобритания), Р.1 (Бразилия), В.1.429 (Калифорния), В.1.525 (Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Нью-Йорк), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Индия), В.1.617.2 (Индия), В.1.617.3 (Индия), Р.2 (Бразилия), С37.1 (Перу) и В.1.1.621.

**80.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 76, дополнительно определяемый как способ предупреждения инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 или расстройства, связанного с такой инфекцией, где инфекция обусловлена изолятом SARS-CoV-2, содержащим аминокислотную замену, делецию или вставку в соответствии с любым из пп. 1-4.

**81.** Способ лечения или предупреждения расстройства по любому из пп. 76-80, где нуждающийся субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

**82.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 81, где субъект-человек представляет собой субъекта-человека старшего возраста, предпочтительно в возрасте по меньшей мере 50, 60, 65 или 70 лет.

**83.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 81, где субъект-человек представляет собой новорожденного или ребенка раннего возраста, предпочтительно в возрасте не более 3 лет, не более 2 лет, не более 1,5 лет, не более 1 года (12 месяцев), не более 9 месяцев, 6 месяцев или 3 месяцев, или в возрасте от 6 месяцев до 2 лет.

**84.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 81, где возраст субъекта-человека составляет от 18 до 60 лет.

**85.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 81, где возраст субъекта-человека составляет менее 60, 55, 50, 45 или 40 лет.

**86.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 85, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 12 до 60; от 12 до 55; от 12 до 50; от 12 до 45 или от 12 до 40 лет.

**87.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 81, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 18 до 55; от 18 до 50; от 18 до 45 или от 18 до 40 лет.

**88.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 81, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 12 до 60; от 12 до 55; от 12 до 50; от 12 до 45 или от 12 до 40 лет.

**89.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 81, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 18 до 60; от 18 до 55; от 18 до 50; от 18 до 45 или от 18 до 40 лет.

**90.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 81, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 18 до 50 лет.

**91.** Способ по п. 82, где указанный способ снижает тяжесть одного или более симптомов заболевания COVID-19.

**92.** Способ по п. 91, где указанный способ снижает вероятность того, что субъекту потребуется госпитализация, госпитализация в отделение интенсивной терапии, лечение с помощью кислородной терапии и/или лечение с помощью аппарата искусственной вентиляции легких.

**93.** Способ по п. 91, где указанный способ снижает вероятность того, что у субъекта разовьется тяжелое или умеренное заболевание COVID-19.



**94.** Способ по п. 91, где указанный способ обеспечивает предупреждение тяжелого заболевания COVID-19 у субъекта в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев.

**95.** Способ по п. 91, где указанный способ снижает вероятность того, что у субъекта разовьется лихорадка, затрудненность дыхания; снижение обоняния и/или снижение вкусовой чувствительности.

**96.** Способ по любому из пп. 81-95, дополнительно определяемый как способ стимулирования выработки антител, CD4+ Т-клеточного ответа или CD8+ Т-клеточного ответа у субъекта.

**97.** Способ по любому из пп. 81-96, дополнительно определяемый как способ стимулирования ответа в виде выработки нейтрализующих антител у субъекта.

**98.** Способ по любому из пп. 81-97, где субъекту вводят композицию, содержащую от примерно 1 мкг до примерно 50 мкг РНК; от примерно 2 мкг до примерно 50 мкг РНК; от примерно 2 мкг до примерно 25 мкг РНК; от примерно 5 мкг до примерно 50 мкг РНК; от примерно 5 мкг до примерно 25 мкг РНК; от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг РНК; от примерно 10 мкг до примерно 30 мкг РНК; или примерно 12 мкг РНК.

**99.** Способ по п. 98, где указанное введение обеспечивает сероконверсию у 100% субъектов, которым вводят композицию.

**100.** Способ по любому из пп. 81-97, где субъект ранее был инфицирован SARS CoV-2.

**101.** Способ по любому из пп. 81-97, где субъекту ранее вводили по меньшей мере первую вакцинную композицию против SARS CoV-2.

**102.** Способ по п. 101, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой вакцину на основе мРНК.

**103.** Способ по п. 102, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой CVnCoV; BNT162 и/или mRNA-1273.

**104.** Способ по п. 102, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой белковую субъединичную вакцину.

**105.** Способ по п. 102, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой NVX-CoV2373 или COVAX.

**106.** Способ по п. 102, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой вакцину на основе аденовирусного вектора.

**107.** Способ по п. 106, где первая вакцинальная композиция против SARS CoV-2 представляла собой ADZ1222 или Ad26.COV-2.S.

**108.** Способ по любому из пп. 81-97, где субъект имеет обнаруживаемый уровень связывающих S-белок антител к SARS CoV-2.

**109.** РНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент или иммуногенный вариант, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485; F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505; Q506; Y144; A570; P681; T716; S982; D1118; L18; D80; D215; L242; A243; L244; R246; A701; T20; P26; D138; R190; H655; T1027; S13; W152; L452; R346; P384; G447; G502; T748; A522; V1176; T859; S247; Y248; L249; T250; P251; G252; G75; T76; D950; E154; G769; S254; Q613; F157; R158; Q957; D253; T95; F888; Q677; A67; Q414; N450; V483; G669; T732; Q949; Q1071; E1092; H1101; N1187; W258; T19; V126; H245; S12; A899; G142; E156; K558 и/или Q52, относительно последовательности SEQ ID NO: 1, где РНК содержит по меньшей мере одну гетерологичную нетранслируемую область (UTR).

**110.** РНК по п. 109, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69del; V70del; A222V; Y453F; S477N; I692V; R403K; K417N; N437S; N439K; V445A; V445I; V445F; G446V; G446S; G446A; L455F; F456L; K458N; A475V; G476S; G476A; S477I; S477R; S477G; S477T; T478I; T478K; T478R; T478A; E484Q; E484K; E484A; E484D; G485R; G485S; F486L; N487I; Y489H; F490S; F490L; Q493L; Q493K; S494P; S494L; P499L; T500I; N501Y; N501T; N501S; V503F; V503I; G504D; Y505W; Q506K; Q506H; Y144del; A570D; P681H; T716I; S982A; D1118H; L18F; D80A; D215G; L242del; A243del; L244del; L242del; A243del; L244del; R246I; A701V; T20N; P26S; D138Y; R190S; H655Y; T1027I; S13I; W152C; L452R; R346T; P384L; L452M; F456A; F456K; F456V; E484P; K417T; G447V; L452Q; A475S; F486I; F490Y; Q493R; S494A; P499H; P499S; G502V; T748K; A522S; V1176F; T859N; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; R246del; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; G75V; T76I; G75V; T76I; D950N; P681R;

E154K; G769V; S254F; Q613H; F157L; F157del; R158del; Q957R; D253G; T95I; F888L; Q677H; A67V; Q414K; N450K; V483A; G669S; T732A; Q949R; Q1071H; E1092K; H1101Y; N1187D; W258L; V70F; T19R; Y144T; Y145S; ins145N; R346K; R346S; V126A; H245Y; ins214TDR; S12F; W152R; A899S; G142D; E156G; K558N и/или Q52R, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**111.** PHK по п. 109, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485, F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505 и/или Q506, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**112.** PHK по п. 111, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69del; V70del; A222V; Y453F; S477N; I692V; R403K; K417N; N437S; N439K; V445A; V445I; V445F; G446V; G446S; G446A; L455F; F456L; K458N; A475V; G476S; G476A; S477I; S477R; S477G; S477T; T478I; T478K; T478R; T478A; E484Q; E484K; E484A; E484D; G485R; G485S, F486L; N487I; Y489H; F490S; F490L; Q493L; Q493K; S494P; S494L; P499L; T500I; N501Y; N501T; N501S; V503F; V503I; G504D; Y505W; Q506K и/или Q506H, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**113.** PHK по п. 109, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485, F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505; Q506; Y144; A570; P681; T716; S982; D1118; L18; D80; D215; L242; A243; L244; R246; A701; T20; P26; D138; R190; H655; T1027; S13; W152; L452; R346; P384; G447; G502; T748; A522 или V1176, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**114.** PHK по п. 113, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем H69del; V70del; A222V; Y453F; S477N; I692V; R403K; K417N; N437S; N439K; V445A; V445I; V445F; G446V; G446S; G446A; L455F; F456L; K458N; A475V; G476S; G476A; S477I; S477R; S477G; S477T; T478I; T478K; T478R; T478A; E484Q; E484K; E484A; E484D; G485R; G485S, F486L; N487I; Y489H; F490S; F490L; Q493L; Q493K; S494P; S494L; P499L;

T500I; N501Y; N501T; N501S; V503F; V503I; G504D; Y505W; Q506K; Q506H; Y144del; A570D; P681H; T716I; S982A; D1118H; L18F; D80A; D215G; L242del; A243del; L244del; L242del; A243del; L244del; R246I; A701V; T20N; P26S; D138Y; R190S; H655Y; T1027I; S13I; W152C; L452R; R346T; P384L; L452M; F456A; F456K; F456V; E484P; K417T; G447V; L452Q; A475S; F486I; F490Y; Q493R; S494A; P499H; P499S; G502V; T748K; A522S и/или V1176F, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**115.** ПНК по п. 109, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем T859; R246; S247; Y248; L249; T250; P251; G252; G75; T76; D950; E154; G769; S254; Q613; F157; Q957; D253; T95; F888; Q677; A67; Q414; N450; V483; G669; T732; Q949; Q1071; E1092; H1101; N1187; F157; R158; W258; T19; H245; S12; A899; G142; E156; K558 и/или Q52, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**116.** ПНК по п. 115, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем T859N; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; R246del; S247del; Y248del; L249del; T250del; P251del; G252del; G75V; T76I; G75V; T76I; D950N; P681R; E154K; G769V; S254F; Q613H; F157L; Q957R; D253G; T95I; F888L; Q677H; A67V; Q414K; N450K; V483A; G669S; T732A; Q949R; Q1071H; E1092K; H1101Y; N1187D; F157del; R158del; W258L; V70F; T19R; Y144T; Y145S; ins145N; R346K; R346S; V126A; H245Y; ins214TDR; S12F; W152R; A899S; G142D; E156G; K558N и/или Q52R, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**117.** ПНК по п. 109, где шиповидный белок SARS-CoV-2 дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем D614; H49; V367; P1263; V483; S939; S943; L5; L8; S940; C1254; Q239; M153; V1040; A845; Y145; A831 и/или M1229, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**118.** ПНК по п. 117, где шиповидный белок SARS-CoV-2 дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, соответствующем D614G; H49Y; V367F; P1263L; V483A; S939F; S943P; L5F; L8V; S940F; C1254F; Q239K; M153T; V1040F; A845S; Y145H; A831V; и/или M1229I, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**119.** РНК по любому из пп. 1-118, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в положении, расположенном в домене RBD (положение аминокислот от aa 319 до aa 541; положения аминокислот относительно референсной последовательности SEQ ID NO: 1) или домене СND (положения аминокислот от aa 329 до aa 529; положения аминокислот относительно референсной последовательности SEQ ID NO: 1).

**120.** РНК по любому из пп. 1-119, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену или делецию в положении, соответствующем H69; V70; A222; Y453; S477; I692; R403; K417; N437; N439; V445; G446; L455; F456; K458; A475; G476; T478; E484; G485, F486; N487; Y489; F490; Q493; S494; P499; T500; N501; V503; G504; Y505; Q506; Y144; A570; P681; T716; S982; D1118; L18; D80; D215; L242; A243; L244; R246; A701; T20; P26; D138; R190; H655; T1027; S13; W152; L452; R346; P384; G447; G502; T748; A522; V1176; T859; S247; Y248; L249; T250; P251; G252; G75; T76; D950; E154; G769; S254; Q613; F157; Q957; D253; T95; F888; Q677; A67; Q414; N450; V483; G669; T732; Q949; Q1071; E1092; H1101; N1187 и/или Q52, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**121.** РНК по п. 109, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, соответствующем K417, E484, N501 и/или L452, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**122.** РНК по п. 21, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем K417, представляет собой замену на S, T, Q или N.

**123.** РНК по п. 122, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем K417, представляет собой замену K417N.

**124.** РНК по п. 121, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем E484, представляет собой замену на K, P, Q, A или D.

**125.** РНК по п. 124, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем E484, представляет собой замену E484K или E484Q.

**126.** РНК по п. 125, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем E484, представляет собой замену E484K.

**127.** РНК по п. 121, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем N501, представляет собой замену на Y, T или S.

**128.** РНК по п. 127, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем N501, представляет собой замену N501Y.

**129.** РНК по п. 121, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем L452, представляет собой замену на R или Q.

**130.** РНК по п. 129, где по меньшей мере одна аминокислотная замена в положении, соответствующем L452, представляет собой замену L452R.

**131.** РНК по любому из пп. 1-130, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотные замены в положениях, соответствующих N501 и E484, предпочтительно замены N501Y и E484K.

**132.** РНК по любому из пп. 1-131, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, расположенную в области сайта расщепления фурином.

**133.** РНК по п. 132, где аминокислотная замена в сайте расщепления фурином расположена в положении, соответствующем P681, относительно SEQ ID NO: 1.

**134.** РНК по п. 133, где аминокислотная замена для аминокислоты в положении, соответствующем P681, представляет собой замену на R или Q.

**135.** РНК по п. 134, где аминокислотная замена для аминокислоты в положении, соответствующем P681, представляет собой замену P681R.

**136.** РНК по любому из пп. 1-135, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положениях, соответствующих L452 и P681, предпочтительно L452R и P681R.

**137.** РНК по любому из пп. 1-136, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положениях, соответствующих L452, T478 и P681, предпочтительно L452R, T478K и P681R.

**138.** РНК по любому из пп. 1-137, где шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит по меньшей мере одну дополнительную аминокислотную замену или делецию, выбранную из следующих изолятов SARS-CoV-2: В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), В.1.351 (Южная Африка), В.1.1.7 (Великобритания), Р.1 (Бразилия), В.1.429 (Калифорния), В.1.525 (Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Нью-Йорк), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Индия), В.1.617.2 (Индия), В.1.617.3 (Индия), Р.2 (Бразилия), С37.1 (Перу) и В.1.1.621.

**139.** РНК по любому из пп. 1-138, где указанный шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотные замены, делеции или вставки в сравнении с последовательностью SEQ ID NO: 1, выбранные из:

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V;
- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V;
- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y и T1027I;
- E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, D614G, H655Y, T1027I и V1176F;
- L452R, P681R и D614G;
- L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H;
- L452R, P681R, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N;
- T19R, L452R, E484Q, D614G, P681R и D950N;
- G75V, T76I, S247del, Y248del, L249del, T250del, P251del, G252del, D253del, L452Q, F490S, D614G и/или T859N;
- T95I, Y145N, R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H и D950N;
- T95I, Y144T, Y145S, ins145N, R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H и D950N;
- H69del, V70del, Y144del, E484K, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A и D1118H;
- S13I, W152C, L452R и D614G;
- L452R; и D614G;
- 69del; 70del; N439K; D614G;
- T95I; E484K; D614G; и A701V;
- L5F, T95I, D253G, E484K, D614G и A701V;
- L5F, T95I, D253G, S477N, D614G и Q957R;
- F157L, V367F, Q613H и P681R;
- S254F, D614G, P681R и G769V;
- T478K, D614G, P681H и T732A;

- P26S, H69del, V70del, V126A, Y144del, L242del, A243del, L244del, H245Y, S477N, E484K, D614G, P681H, T1027I и D1118H;
- ins214TDR, Q414K, N450K, D614G и T716I;
- S12F, H69del, V70del, W152R, R346S, L452R, D614G, Q677H и A899S;
- E484K, D614G и V1176F;
- Q52R, A67V, H69del, V70del, F157del, R158del, E484K, D614G, Q677H и F888L;
- Q52R, A67V, H69del, V70del, Y144del, E484K, D614G, Q677H и F888L;
- A67V, H69del, V70del, Y144del, E484K, D614G, Q677H и F888L;
- T19R, T95I, G142D, E156G, F157del, R158del, W258L, K417N, L452R, T478K, K558N, D614G, P681R и D950N;
- T19R, V70F, G142D, E156G, F157del, R158del, A222V, K417N, L452R, T478K, D614G, P681R и D950N;
- T19R, T95I, F157del, R158del, W258L, K417N, L452R, T478K, D614G, P681R и D950N;
- T19R, V70F, F157del, R158del, A222V, K417N, L452R, T478K, D614G, P681R и D950N;
- H69del, V70del и D614G;
- D614G и M1229I;
- A222V и D614G;
- S477N и D614G;
- N439K и D614G;
- H69del, V70del, Y453F, D614G и I692I;
- Y453F и D614G;
- D614G и I692V;
- H69del, V70del, A222V, Y453F, D614G и I692I;
- N501Y и D614G;
- K417N, E484K, N501Y и D614G; и
- E484K и D614G.



**140.** РНК по любому из пп. 1-139, где указанный шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотные замены или делеции в сравнении с последовательностью SEQ ID NO: 1, выбранные из:

- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V; и
- E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V.

**141.** РНК по любому из пп. 1-140, где указанный шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит следующие аминокислотные замены или делеции в сравнении с последовательностью SEQ ID NO: 1, выбранные из:

- K986P, V987P, E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, D614G и A701V; и
- K986P, V987P, E484K, N501Y, L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, K417N, D614G и A701V.

**142.** РНК по любому из пп. 109-139, где указанный шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит аминокислотные замены или делеции в сравнении с последовательностью SEQ ID NO: 1, выбранные из:

- L452R, P681R и D614G;
- L452R, E484Q, P681R, E154K, D614G и Q1071H;
- L452R, P681R, T19R, F157del, R158del, T478K, D614G и D950N; и
- T19R, L452R, E484Q, D614G, P681R и D950N.

**143.** РНК по любому из пп. 1-142, где указанный по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичных любой из SEQ ID NO: 1, 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109, или иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта любой из указанных последовательностей.

**144.** РНК по любому из пп. 129-143, где указанный шиповидный белок (S) содержит или состоит из фрагмента S1 шиповидного белка или его иммуногенного фрагмента или иммуногенного варианта.

145. РНК по любому из пп. 1-144, где указанный по меньшей мере один шиповидный белок SARS-CoV-2 содержит или состоит из по меньшей мере одной из аминокислотных последовательностей, идентичных или на 95% идентичных любой из SEQ ID NO: 1, 10, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22959-22964, 27087-27109.

146. РНК по любому из пп. 129-145, где указанный шиповидный белок (S) представляет собой стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок (S\_stab), содержащий по меньшей мере одну стабилизирующую конформацию до слияния мутацию.

147. РНК по п. 146, где указанная по меньшей мере одна стабилизирующая конформация до слияния мутация включает следующие аминокислотные замены: K986P и V987P.

148. РНК по любому из пп. 1-147, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность дополнительно кодирует один или более гетерологичных пептидных или белковых элементов, выбранных из сигнального пептида, линкера, хелперного эпитопа, элемента кластеризации антигена, элемента тримеризации, трансмембранного элемента и/или образующей VLP последовательности.

149. РНК по п. 148, где по меньшей мере один гетерологичный пептидный или белковый элемент представляет собой гетерологичный элемент кластеризации антигена, гетерологичный элемент тримеризации и/или образующую VLP последовательность.

150. РНК по любому из пп. 1-149, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность представляет собой кодирующую последовательность с модифицированными кодонами, где аминокислотная последовательность, кодируемая указанной по меньшей мере одной кодирующей последовательностью с модифицированными кодонами, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой соответствующей кодирующей последовательностью дикого типа или референсной кодирующей последовательностью.

151. РНК по п. 150, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность с модифицированными кодонами выбрана из кодирующей последовательности с максимизированным содержанием С, кодирующей последовательности с

максимизированным CAI, кодирующей последовательности, адаптированной по частоте использования кодонов человека, кодирующей последовательности с модифицированным содержанием G/C и кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C или любой их комбинации.

**152.** РНК по п. 150 или п. 151, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность с модифицированными кодонами представляет собой кодирующую последовательность с оптимизированным содержанием G/C, кодирующую последовательность, адаптированную по частоте использования кодонов человека, или кодирующую последовательность с модифицированным содержанием G/C.

**153.** РНК по любому из пп. 1-152, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность содержит или состоит из последовательности, идентичной или по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 136, 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247, или фрагмента или варианта любой из указанных последовательностей.

**154.** РНК по любому из пп. 1-153, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность содержит или состоит из последовательности, идентичной или по меньшей мере на 90 % идентичной любой из SEQ ID NO: 136, 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247.

**155.** РНК по любому из пп. 1-154, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность имеет содержание G/C, составляющее по меньшей мере примерно 50%, 55% или 60%.

**156.** РНК по любому из пп. 1-155, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность кодирует S-белок, содержащий стабилизирующую конформацию до слияния мутацию K986P и V987P, где кодирующая последовательность содержит или состоит из кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием G/C, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 136, 137, 146, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785, 23089-23148, 23150-23184, 27110-27247.

**157.** РНК по любому из пп. 1-156, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую от 30 до 200 аденозиновых нуклеотидов, и/или по меньшей мере одну поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую от 10 до 40 цитозиновых нуклеотидов.

**158.** РНК по любому из пп. 1-157, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну гистоновую структуру «стебель-петля».

**159.** РНК по любому из пп. 1-158, где указанная РНК содержит по меньшей мере одну поли(А)-последовательность, содержащую от 30 до 200 аденозиновых нуклеотидов, где 3'-концевой нуклеотид указанной РНК представляет собой аденозин.

**160.** РНК по любому из пп. 1-159, где по меньшей мере одна гетерологичная 3'-UTR содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 3'-UTR гена, выбранного из PSMB3, ALB7, CASP1, COX6B1, GNAS, NDUFA1 и RPS9, или из гомолога, фрагмента или варианта любого из этих генов.

**161.** РНК по любому из пп. 1-160, где по меньшей мере одна гетерологичная 5'-UTR содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 5'-UTR гена, выбранного из HSD17B4, RPL32, ASAH1, ATP5A1, MP68, NDUFA4, NOSIP, RPL31, SLC7A3, TUBB4B и UBQLN2, или из гомолога, фрагмента или варианта любого из этих генов.

**162.** РНК по любому из пп. 1-161, содержащая по меньшей мере одну гетерологичную 5'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 5'-UTR HSD17B4, и по меньшей мере одну гетерологичную 3'-UTR, которая содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, полученной из 3'-UTR PSMB3.

**163.** РНК по любому из пп. 1-162, содержащая, от 5'-конца к 3'-концу:

- i) структуру 5'-cap1;
- ii) 5'-UTR, полученную из 5'-UTR гена HSD17B4, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 232;
- iii) указанную по меньшей мере одну кодирующую последовательность;
- iv) 3'-UTR, полученную из 3'-UTR гена PSMB3, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 254;
- v) возможно, гистоновую последовательность структуры «стебель-петля»; и

vi) поли(А)-последовательность, содержащую примерно 100 нуклеотидов А, где 3'-концевой нуклеотид указанной РНК представляет собой аденозин.

**164.** РНК по любому из пп. 1-163, где указанная РНК представляет собой мРНК, самореплицирующуюся РНК, кольцевую РНК или РНК-репликон.

**165.** РНК по любому из пп. 1-164, где указанная РНК представляет собой мРНК.

**166.** РНК по п. 165, где указанная мРНК не является РНК-репликоном или самореплицирующейся РНК.

**167.** РНК по любому из пп. 1-166, где указанная РНК содержит 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7G, cap0, cap1, cap2, модифицированную структуру cap0 или модифицированную структуру cap1, предпочтительно структуру 5'-cap1.

**168.** РНК по любому из пп. 1-167, где указанная РНК не содержит замены на 1-метилпсевдоуридин.

**169.** РНК по любому из пп. 1-168, где указанная РНК не содержит химически модифицированных нуклеотидов.

**170.** РНК по любому из пп. 109-167, где указанная РНК содержит замену на псевдоуридин или 1-метилпсевдоуридин.

**171.** РНК по любому из пп. 1-170, где указанная РНК представляет собой РНК, полученную путем транскрипции *in vitro*, где транскрипция РНК *in vitro* была выполнена в присутствии оптимизированной по последовательности смеси нуклеотидов и аналога кэпа, предпочтительно где оптимизированная по последовательности смесь нуклеотидов не содержит химически модифицированных нуклеотидов.

**172.** РНК по любому из пп. 1-171, где указанная РНК представляет собой очищенную РНК, предпочтительно РНК, которая была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF.

**173.** РНК по любому из пп. 1-172, где РНК представляет собой очищенную РНК, которая была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF и содержит примерно на 5%, 10% или 20% меньше побочных продуктов двухцепочечной РНК, чем РНК, которая не была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF.

**174.** РНК по любому из пп. 1-173, где РНК представляет собой очищенную РНК, которая была очищена с помощью RP-HPLC и/или TFF и содержит примерно на 5%, 10% или 20% меньше побочных продуктов двухцепочечной РНК, чем РНК, которая была

очищена с помощью очистки на Oligo dT, преципитации, фильтрации и/или анионообменной хроматографии.

**175.** Композиция, содержащая РНК, определенную в любом из пп. 1-66, где указанная композиция, возможно, содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

**176.** Композиция по п. 175, где указанная композиция представляет собой поливалентную композицию, содержащую множество или по меньшей мере более одной РНК, определенной в любом из пп. 1-56.

**177.** Композиция по п. 176, где каждая из множества или по меньшей мере более чем одной РНК поливалентной композиции кодирует отличный от других шиповидный белок, предпочтительно стабилизированный в конформации до слияния шиповидный белок.

**178.** Композиция по п. 177, где различные шиповидные белки или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки получены из различных вариантов/изолятов вируса SARS-CoV-2.

**179.** Композиция по п. 178, где различные шиповидные белки или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки получены из варианта В.1.351 (Южная Африка), В.1.1.7 (Великобритания), Р.1 (Бразилия), В.1.429 (Калифорния), В.1.525 (Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Нью-Йорк), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Индия), В.1.617.2 (Индия), В.1.617.3 (Индия), Р.2 (Бразилия), С37.1 (Перу) или В.1.1.621.

**180.** Композиция по п. 178 или п. 179, где различные шиповидные белки или стабилизированные в конформации до слияния шиповидные белки получены по меньшей мере из В.1.1.7, В.1.351, Р.1, CAL.20С, В.1.1.519, В.1.621 или С.37.

**181.** Композиция по п. 178, где по меньшей мере один из различных шиповидных белков или стабилизированных в конформации до слияния шиповидных белков содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, соответствующем Е484, N501, Р681, D614 и/или L452, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**182.** Композиция по п. 181, где по меньшей мере один из различных шиповидных белков или стабилизированных в конформации до слияния шиповидных белков содержит

по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, соответствующем E484K, N501Y, P681R, D614G и/или L452R, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**183.** Композиция по п. 182, где по меньшей мере один из различных шиповидных белков или стабилизированных в конформации до слияния шиповидных белков содержит аминокислотные замены в положениях, соответствующих L452R, P681R и D614G, относительно последовательности SEQ ID NO: 1.

**184.** Композиция по любому из пп. 175-180, где указанная композиция содержит РНК с целостностью РНК 70% или более.

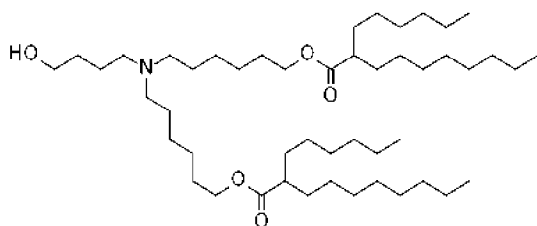
**185.** Композиция по любому из пп. 175-184, где указанная композиция содержит РНК со степенью кэпирования 70% или более, предпочтительно где по меньшей мере 70%, 80% или 90% молекул РНК содержат структуру Cap1.

**186.** Композиция по любому из пп. 175-185, где РНК находится в комплексе или ассоциирована, или по меньшей мере частично находится в комплексе или частично ассоциирована с одним или более катионным или поликатионным соединением, предпочтительно катионным или поликатионным полимером, катионным или поликатионным полисахаридом, катионным или поликатионным липидом, катионным или поликатионным белком, катионным или поликатионным пептидом или любыми их комбинациями.

**187.** Композиция по п. 186, где РНК находится в комплексе или ассоциирована с одним или более липидами или носителями на основе липидов, тем самым образуя липосомы, липидные наночастицы (LNP), липоплексы и/или нанолипосомы, предпочтительно инкапсулирующие по меньшей мере одну РНК.

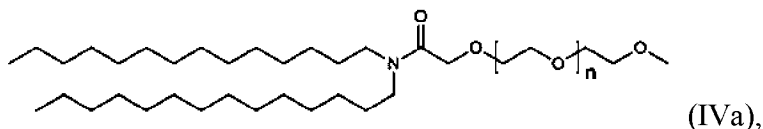
**188.** Композиция по п. 186 или п. 187, где РНК находится в комплексе с одним или более липидами, тем самым образуя липидные наночастицы.

**189.** Композиция по п. 187 или п. 188, где LNP содержит катионный липид согласно формуле III-3:



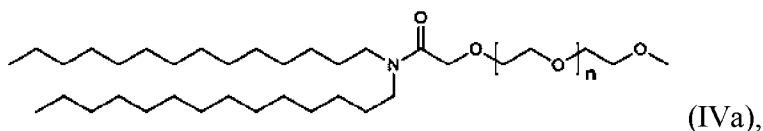
(III-3).

**190.** Композиция по любому из пп. 187-189, где LNP содержит PEG-липид формулы (IVa):



где  $n$  имеет среднее значение в диапазоне от 30 до 60, предпочтительно где  $n$  имеет среднее значение примерно 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, наиболее предпочтительно где  $n$  имеет среднее значение 49 или 45.

**191.** Композиция по любому из пп. 187-189, где LNP содержит PEG-липид формулы (IVa):



где  $n$  представляет собой целое число, выбранное таким образом, чтобы средняя молекулярная масса PEG-липида составляла примерно 2500 г/моль.

**192.** Композиция по любому из пп. 187-191, где LNP содержит один или более нейтральных липидов и/или один или более стероидов или аналогов стероидов.

**193.** Композиция по п. 192, где нейтральный липид представляет собой 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), предпочтительно где молярное отношение катионного липида к DSPC находится в диапазоне от примерно 2:1 до примерно 8:1.

**194.** Композиция по п. 192, где стероид представляет собой холестерин, предпочтительно где молярное отношение катионного липида к холестерину находится в диапазоне от примерно 2:1 до примерно 1:1.

**195.** Композиция по любому из пп. 187-194, где LNP содержит:

(i) по меньшей мере один катионный липид, предпочтительно липид формулы (III), более предпочтительно липид III-3;

(ii) по меньшей мере один нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC);

(iii) по меньшей мере один стероид или аналог стероида, предпочтительно холестерин; и



(iv) по меньшей мере один конъюгированный с полимером липид, предпочтительно PEG-липид, полученный из соединения формулы (IVa при  $n = 49$ ),

где (i) - (iv) находятся в следующем молярном отношении: примерно 20-60% катионного липида, 5-25% нейтрального липида, 25-55% стерола и 0,5-15% PEG-липид.

**196.** Композиция по любому из пп. 187-194, где LNP содержит:

(i) по меньшей мере один катионный липид, предпочтительно липид формулы (III), более предпочтительно липид III-3;

(ii) по меньшей мере один нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC);

(iii) по меньшей мере один стероид или аналог стероида, предпочтительно холестерин; и

(iv) по меньшей мере один конъюгированный с полимером липид, предпочтительно PEG-липид, полученный из соединения формулы (IVa при  $n = 45$ ),

где (i) - (iv) находятся в следующем молярном отношении: примерно 20-60% катионного липида, 5-25% нейтрального липида, 25-55% стерола и 0,5-15% PEG-липид.

**197.** Композиция по п. 195 или п. 196, где (i) - (iv) находятся в молярном отношении, составляющем примерно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7.

**198.** Композиция по любому из пп. 188-197, содержащая менее примерно 20% свободной (не находящейся в комплексе или не инкапсулированной) РНК, предпочтительно менее примерно 15% свободной РНК, более предпочтительно менее примерно 10% свободной РНК.

**199.** Композиция по любому из пп. 188-198, где массовое отношение липида к РНК составляет от примерно 10:1 до примерно 60:1, предпочтительно от примерно 20:1 до примерно 30:1, например, примерно 25:1.

**200.** Композиция по любому из пп. 188-199, где отношение  $n/p$  для LNP, инкапсулирующих РНК, находится в диапазоне от примерно 1 до примерно 10, предпочтительно в диапазоне от примерно 5 до примерно 7, более предпочтительно составляет примерно 6.

**201.** Композиция по любому из пп. 188-200, где указанная композиция имеет значение PDI менее примерно 0,4, предпочтительно менее примерно 0,3, более предпочтительно менее примерно 0,2, наиболее предпочтительно менее примерно 0,1.

**202.** Композиция по любому из пп. 187-201, где LNP:

(а) имеют Z-средний размер в диапазоне от примерно 60 нм до примерно 120 нм, предпочтительно менее примерно 120 нм, более предпочтительно менее примерно 100 нм, наиболее предпочтительно менее примерно 80 нм;

(b) содержат менее примерно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% LNP, имеющих размер частиц, превышающий примерно 500 нм; и/или

(с) содержат менее примерно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% LNP, имеющих размер частиц менее примерно 20 нм.

**203.** Композиция по любому из пп. 187-202, где по меньшей мере примерно 80%, 85%, 90%, 95% носителей на основе липидов имеют сферическое строение, предпочтительно включающее твердое ядро или частично твердое ядро.

**96.** Композиция по любому из пп. 187-203, где указанная композиция имеет мутность в диапазоне от примерно 150 FNU до примерно 0,0 FNU, предпочтительно примерно 50 FNU или менее, более предпочтительно примерно 25 FNU или менее.

**204.** Композиция по любому из пп. 175-204, дополнительно содержащая:

(а) сахар в концентрации от примерно 50 до примерно 300 мМ, предпочтительно сахарозу в концентрации примерно 150 мМ;

(b) соль в концентрации от примерно 10 мМ до примерно 200 мМ, предпочтительно NaCl в концентрации примерно 75 мМ; и/или

(с) буферный агент в концентрации от 1 мМ до примерно 100 мМ, предпочтительно Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в концентрации примерно 10 мМ.

**205.** Композиция по любому из пп. 175-204, где указанная композиция имеет pH в диапазоне от pH примерно 7,0 до pH примерно 8,0, предпочтительно pH примерно 7,4.

**206.** Композиция по любому из пп. 175-200, где указанная композиция представляет собой лиофилизированную композицию.

**207.** Композиция по п. 206, где содержание воды в указанной лиофилизированной композиции составляет менее примерно 10%, предпочтительно где содержание воды в указанной лиофилизированной композиции составляет от примерно 0,5% до 5%.

**208.** Композиция по любому из пп. 187-205, где по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% РНК остается интактной в течение по меньшей мере примерно двух недель после хранения в виде жидкости при температуре примерно 5°C.

**209.** Композиция по п. 208, где по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% РНК остается интактной в течение от примерно 2 недель до примерно 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или 1 года после хранения в виде жидкости при температуре примерно 5°C.

**210.** Композиция по п. 208, где по меньшей мере 80% РНК остается интактной после примерно двух недель хранения в виде жидкости при температуре примерно 5°C.

**211.** Композиция по любому из пп. 187-210, где РНК и носитель на основе липида, инкапсулирующий РНК, были очищены с применением по меньшей мере одной стадии очистки, предпочтительно по меньшей мере одной стадии TFF, и/или по меньшей мере одной стадии осветления, и/или по меньшей мере одной стадии фильтрации.

**212.** Вакцина, содержащая РНК по любому из пп. 109-174 и/или композицию по любому из пп. 165-200.

**213.** Вакцина по п. 212, где указанная вакцина вызывает адаптивный иммунный ответ, предпочтительно защитный адаптивный иммунный ответ против коронавируса, предпочтительно против коронавируса SARS-CoV-2.

**214.** Вакцина по п. 212 или п. 213, где указанная вакцина представляет собой поливалентную вакцину, содержащую множество или по меньшей мере более одной из РНК, определенных в любом из пп. 109-181, или множество или по меньшей мере более одной из композиций, определенных в любом из пп. 182-104.

**215.** Набор или составной набор, содержащий РНК по любому из пп. 109-174, и/или композицию по любому из пп. 182-104, и/или вакцину по пп. 105-107, возможно, содержащий жидкий носитель для солиubilизации, и, возможно, технические инструкции, содержащие информацию о введении и дозе компонентов.

**216.** РНК по любому из пп. 109-174, композиция по любому из пп. 175-211, вакцина по пп. 212-214, набор или составной набор по п. 215 для применения в качестве лекарственного средства.

**217.** РНК по любому из пп. 109-174, композиция по любому из пп. 175-211, вакцина по пп. 212-214, набор или составной набор по п. 215 для применения для лечения или профилактики инфекции коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройства, связанного с такой инфекцией, предпочтительно COVID-19.

**218.** Способ лечения или предупреждения расстройства, где указанный способ включает нанесение или введение нуждающемуся в этом субъекту РНК по любому из пп. 109-174, композиции по любому из пп. 175-211, вакцины по пп. 212-214 и/или применение набора или составного набора по п. 215.

**219.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 218, где указанное расстройство представляет собой инфекцию коронавирусом, предпочтительно коронавирусом SARS-CoV-2, или расстройство, связанное с такой инфекцией, предпочтительно COVID-19.

**220.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 218 или п. 219, дополнительно определяемый как способ предупреждения инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 или расстройства, связанного с такой инфекцией, предпочтительно COVID-19.

**221.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 212, дополнительно определяемый как способ предупреждения инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 или расстройства, связанного с такой инфекцией, где инфекция обусловлена изолятом SARS-CoV-2, выбранным из В.1.1.529 (Омикрон, Южная Африка) (включая ВА.1\_v1, ВА.1\_v0, В.1.1.529, ВА.2, ВА.1\_v2, ВА.1\_v3, ВА.1\_v4, ВА.1\_v5), В.1.351 (Южная Африка), В.1.1.7 (Великобритания), Р.1 (Бразилия), В.1.429 (Калифорния), В.1.525 (Нигерия), В.1.258 (Чешская Республика), В.1.526 (Нью-Йорк), А.23.1 (Уганда), В.1.617.1 (Индия), В.1.617.2 (Индия), В.1.617.3 (Индия), Р.2 (Бразилия), С37.1 (Перу) и В.1.1.621.

**223.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 212, дополнительно определяемый как способ предупреждения инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 или расстройства, связанного с такой инфекцией, где инфекция обусловлена изолятом SARS-CoV-2, содержащим аминокислотную замену, делецию или вставку в соответствии с любым из пп. 1-33.

**224.** Способ лечения или предупреждения расстройства по любому из пп. 218-219, где нуждающийся субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

**225.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 224, где субъект-человек представляет собой субъекта-человека старшего возраста, предпочтительно в возрасте по меньшей мере 50, 60, 65 или 70 лет.

**226.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 224, где субъект-человек представляет собой новорожденного или ребенка раннего возраста, предпочтительно в возрасте не более 3 лет, не более 2 лет, не более 1,5 лет, не более 1 года (12 месяцев), не более 9 месяцев, 6 месяцев или 3 месяцев, или в возрасте от 6 месяцев до 2 лет.

**227.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 224, где возраст субъекта-человека составляет от 18 до 60 лет.

**228.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 224, где возраст субъекта-человека составляет менее 60, 55, 50, 45 или 40 лет.

**229.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 228, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 12 до 60; от 12 до 55; от 12 до 50; от 12 до 45 или от 12 до 40 лет.

**230.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 228, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 18 до 55; от 18 до 50; от 18 до 45 или от 18 до 40 лет.

**231.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 224, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 12 до 60; от 12 до 55; от 12 до 50; от 12 до 45 или от 12 до 40 лет.

**232.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 224, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 18 до 60; от 18 до 55; от 18 до 50; от 18 до 45 или от 18 до 40 лет.

**233.** Способ лечения или предупреждения расстройства по п. 224, где возраст субъекта-человека составляет от примерно 18 до 50 лет.

**234.** Способ по п. 225, где указанный способ снижает тяжесть одного или более симптомов заболевания COVID-19.

**235.** Способ по п. 234, где указанный способ снижает вероятность того, что субъекту потребуется госпитализация, госпитализация в отделение интенсивной терапии, лечение с помощью кислородной терапии и/или лечение с помощью аппарата искусственной вентиляции легких.

**236.** Способ по п. 234, где указанный способ снижает вероятность того, что у субъекта разовьется тяжелое или умеренное заболевание COVID-19.

**237.** Способ по п. 234, где указанный способ обеспечивает предупреждение тяжелого заболевания COVID-19 у субъекта в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев.

**238.** Способ по п. 234, где указанный способ снижает вероятность того, что у субъекта разовьется лихорадка, затрудненность дыхания; снижение обоняния и/или снижение вкусовой чувствительности.

**239.** Способ по любому из пп. 218-238, дополнительно определяемый как способ стимулирования выработки антител, CD4+ Т-клеточного ответа или CD8+ Т-клеточного ответа у субъекта.

**240.** Способ по любому из пп. 218-238, дополнительно определяемый как способ стимулирования ответа в виде выработки нейтрализующих антител у субъекта.

**241.** Способ по любому из пп. 218-240, где субъекту вводят композицию, содержащую от примерно 1 мкг до примерно 50 мкг РНК; от примерно 2 мкг до примерно 50 мкг РНК; от примерно 2 мкг до примерно 25 мкг РНК; от примерно 5 мкг до примерно 50 мкг РНК; от примерно 5 мкг до примерно 25 мкг РНК; от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг РНК; от примерно 10 мкг до примерно 30 мкг РНК; или примерно 12 мкг РНК.

**242.** Способ по п. 241, где указанное введение обеспечивает сероконверсию у 100% субъектов, которым вводят композицию.

**243.** Способ по любому из пп. 218-240, где субъект ранее был инфицирован SARS CoV-2.

**244.** Способ по любому из пп. 218-240, где субъекту ранее вводили по меньшей мере первую вакцинную композицию против SARS CoV-2.

**245.** Способ по п. 244, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой вакцину на основе мРНК.

**246.** Способ по п. 245, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой CVnCoV; BNT162 и/или mRNA-1273.

**247.** Способ по п. 244, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой белковую субъединичную вакцину.

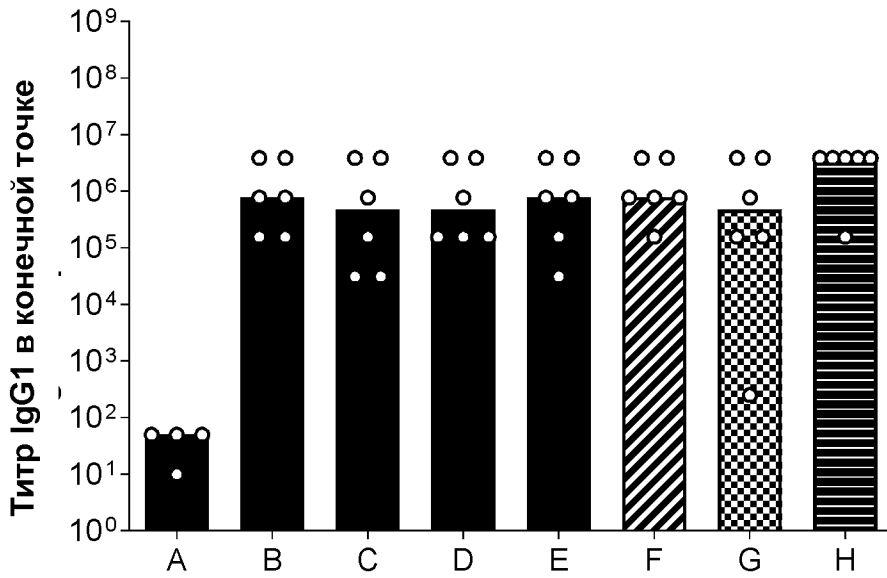
**248.** Способ по п. 247, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой NVX-CoV2373 или COVAX.

**249.** Способ по п. 244, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой вакцину на основе аденовирусного вектора.

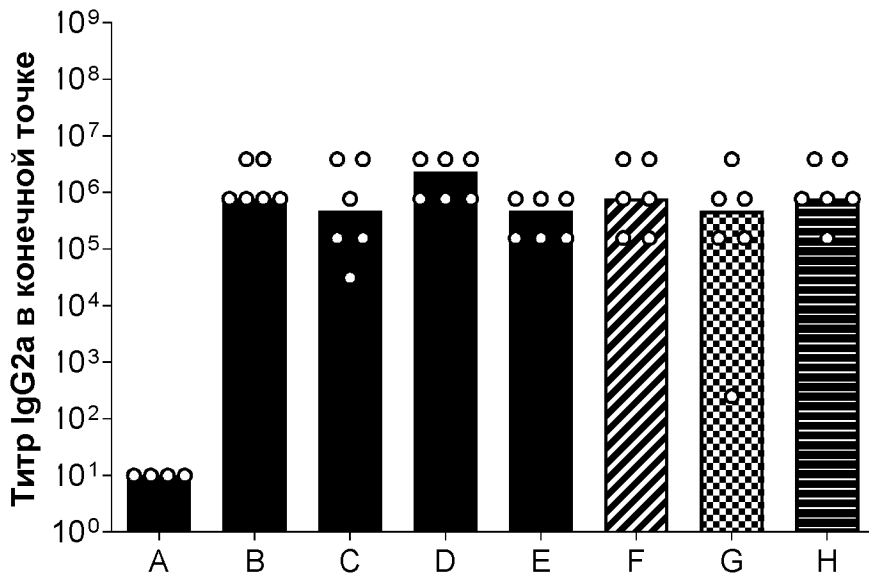
**250.** Способ по п. 249, где первая вакцинная композиция против SARS CoV-2 представляла собой ADZ1222 или Ad26.COV-2.S.

**251.** Способ по любому из пп. 218-240, где субъект имеет обнаруживаемый уровень связывающих S-белок антител к SARS CoV-2.

A



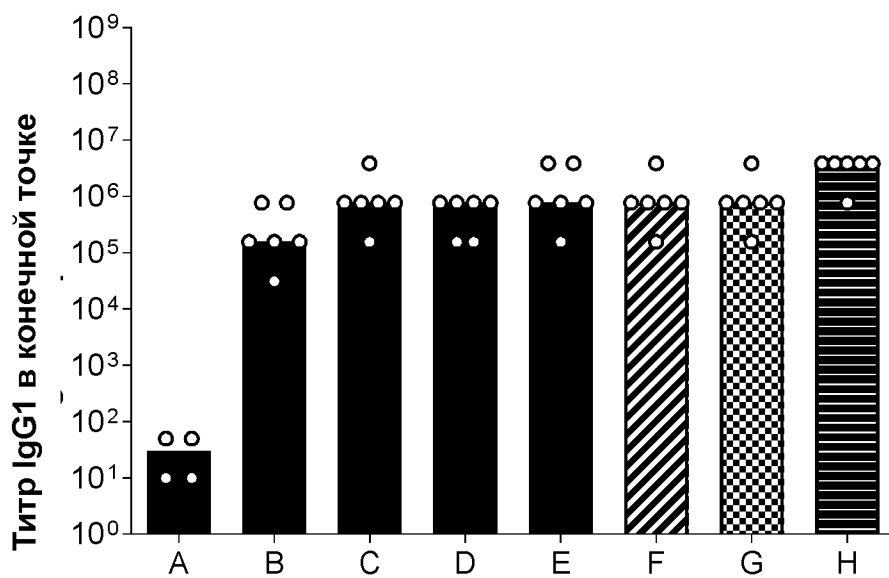
B



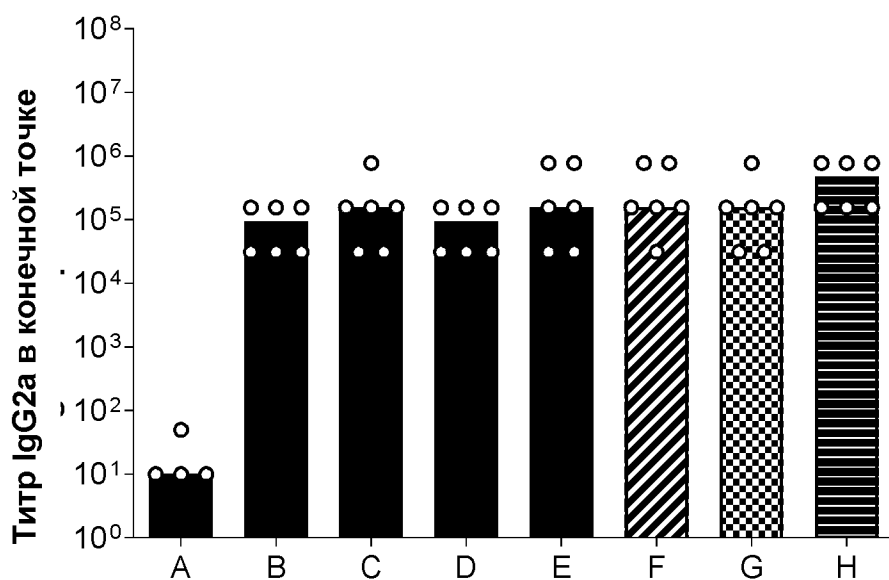
ФИГ. 1



С

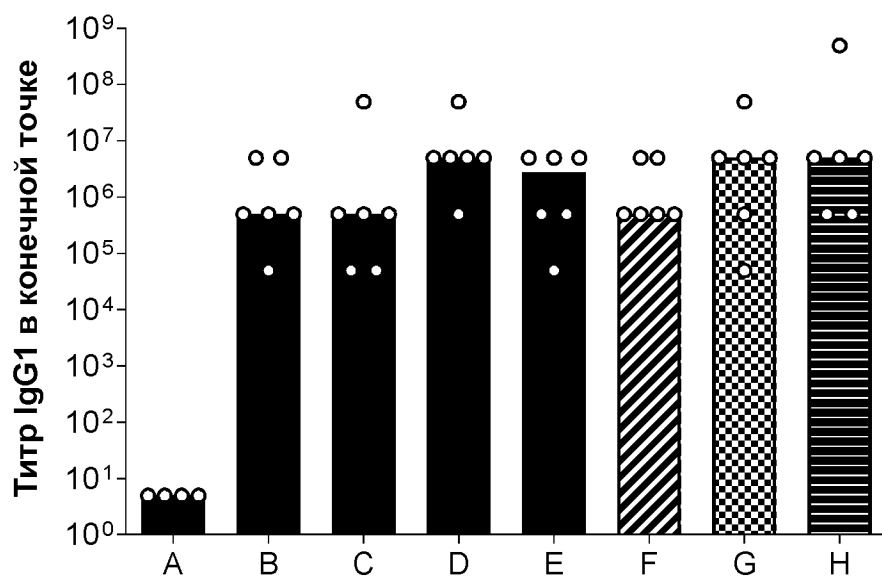


D

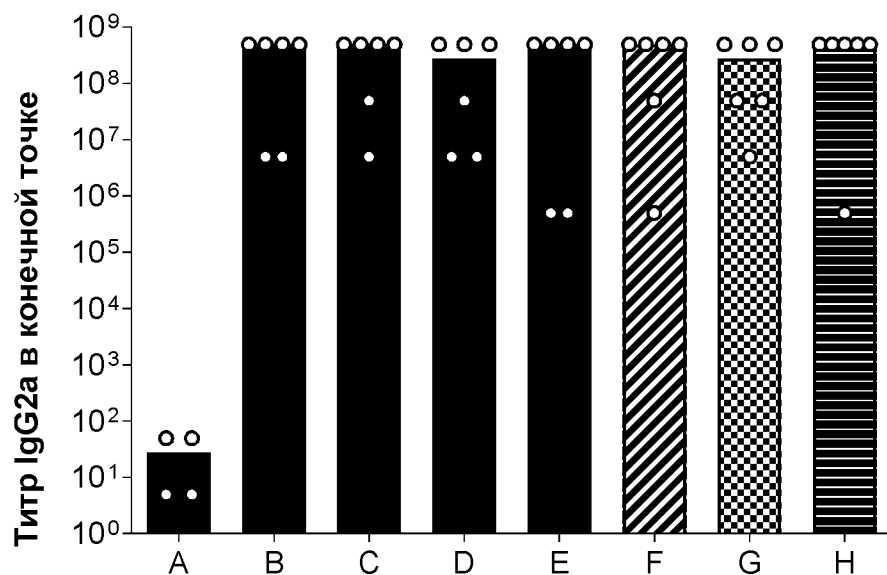


ФИГ. 1 (продолжение)

Е

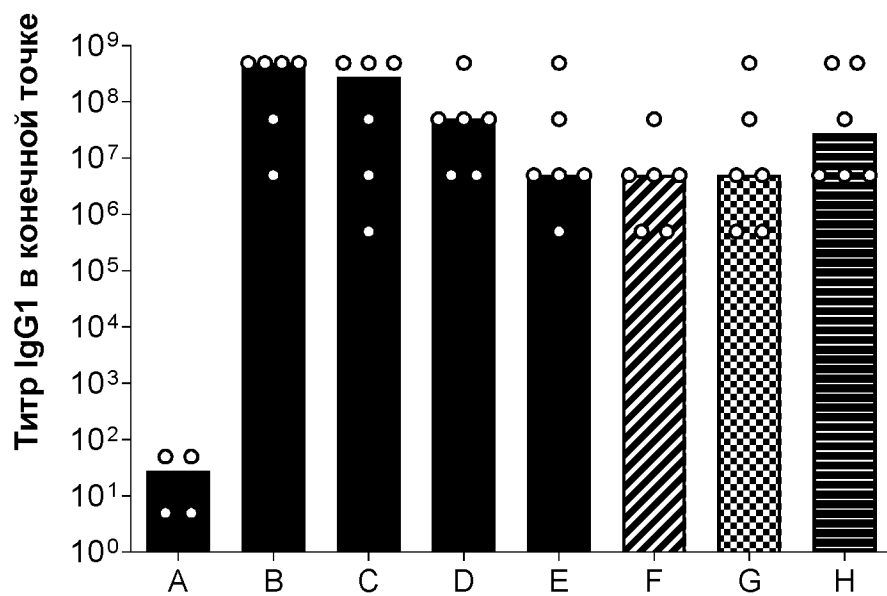


F

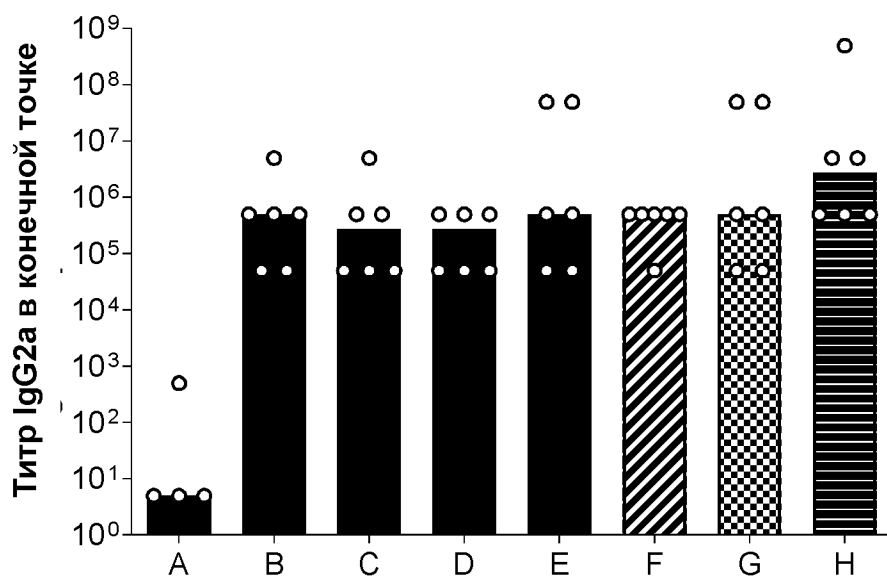


ФИГ. 1 (продолжение)

G

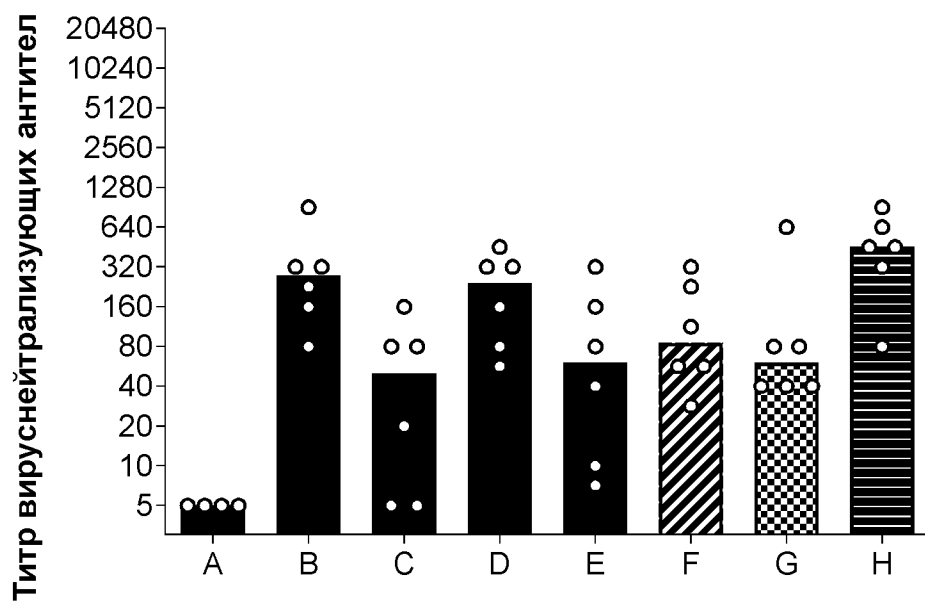


H

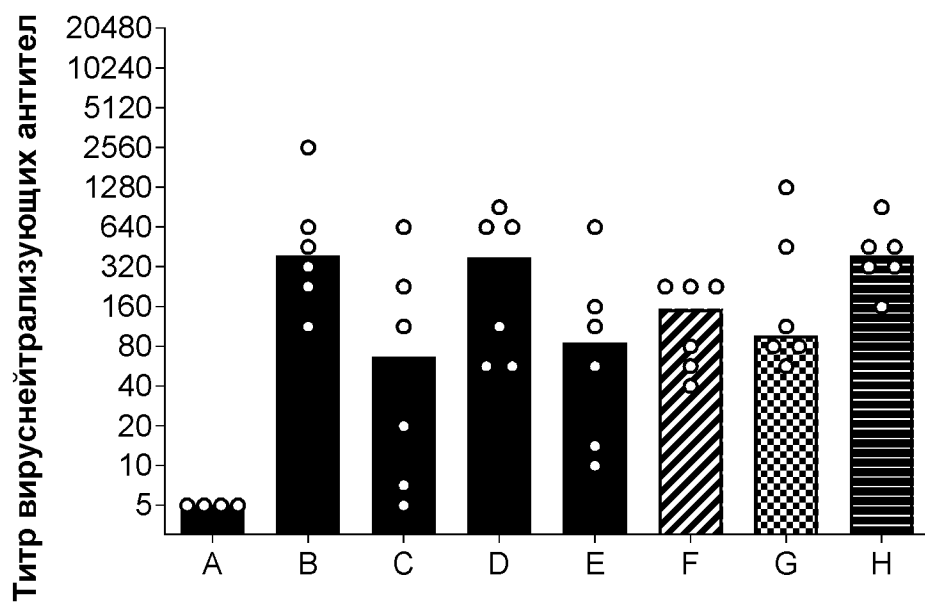


ФИГ. 1 (продолжение)

А

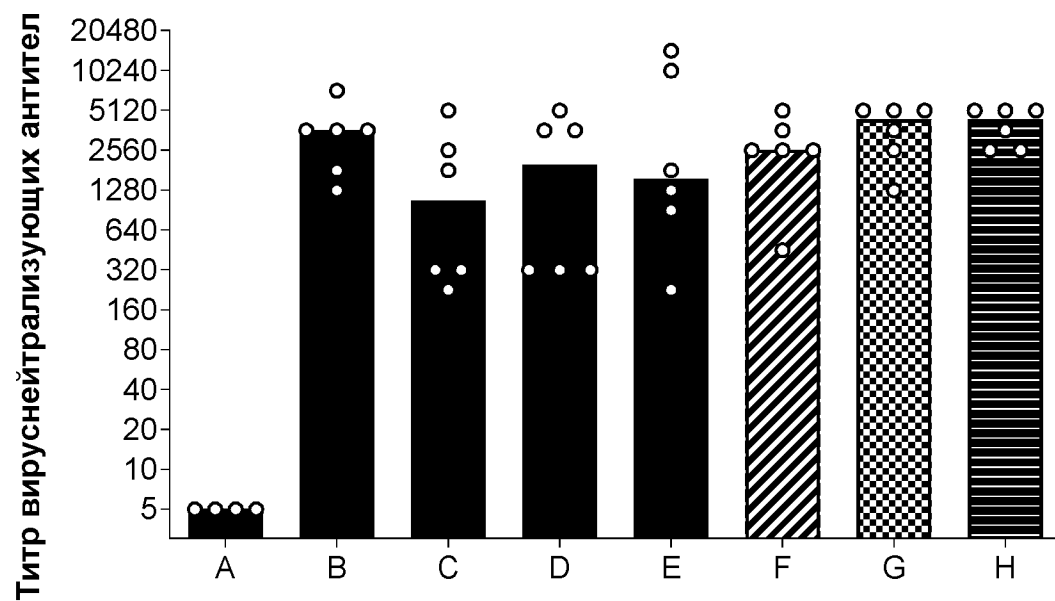


В



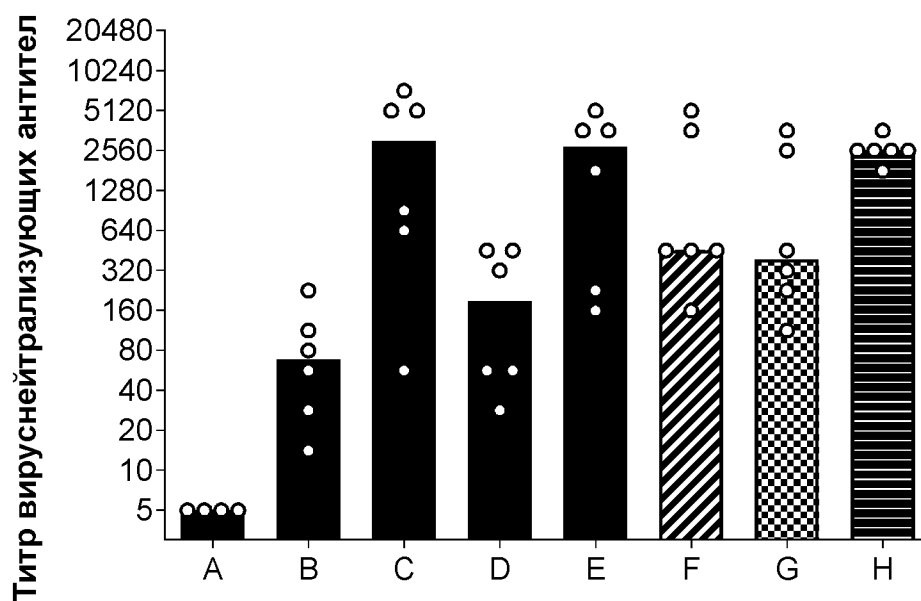
ФИГ. 2

С

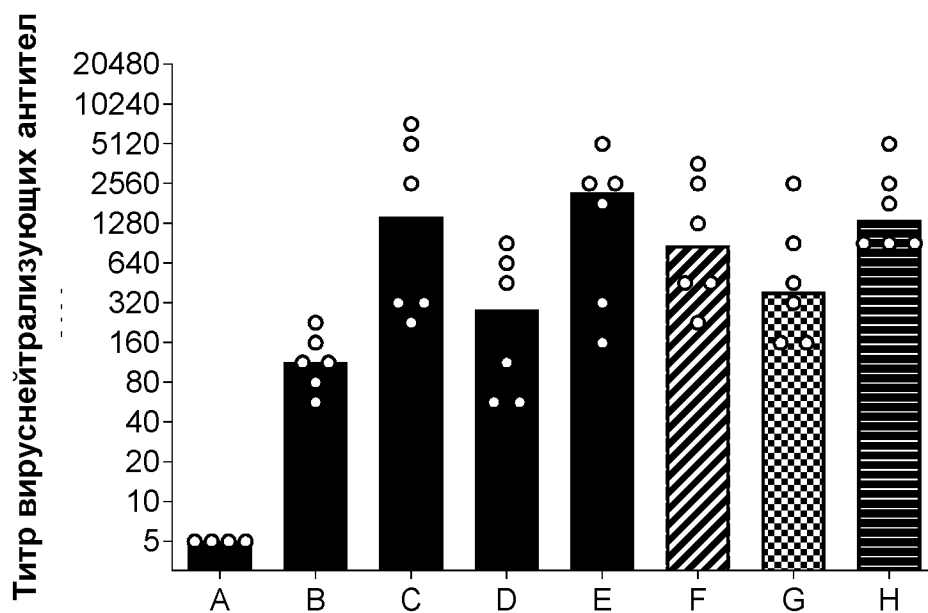


ФИГ. 2 (продолжение)

А

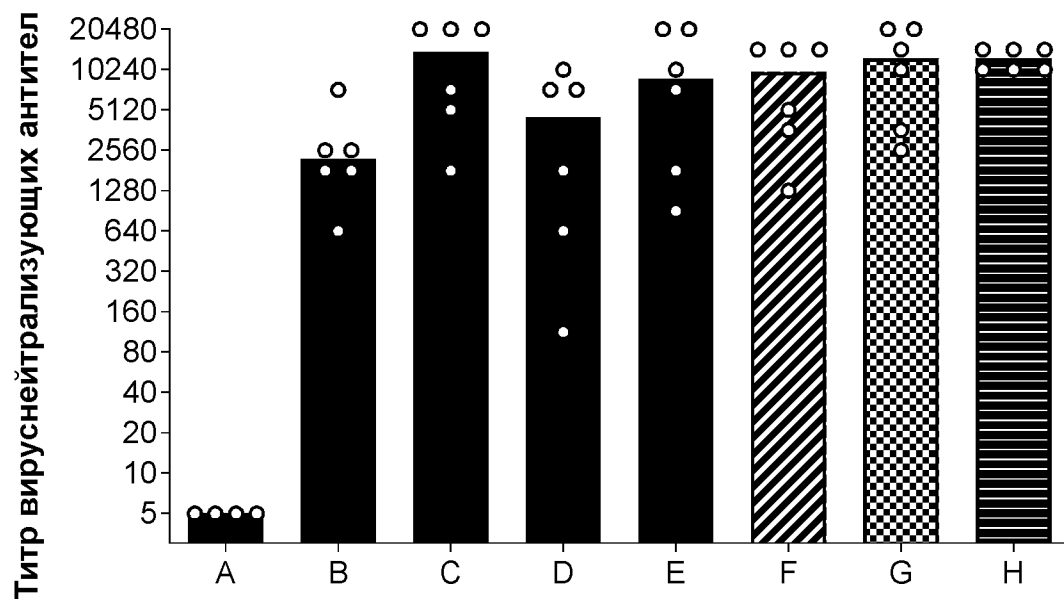


В



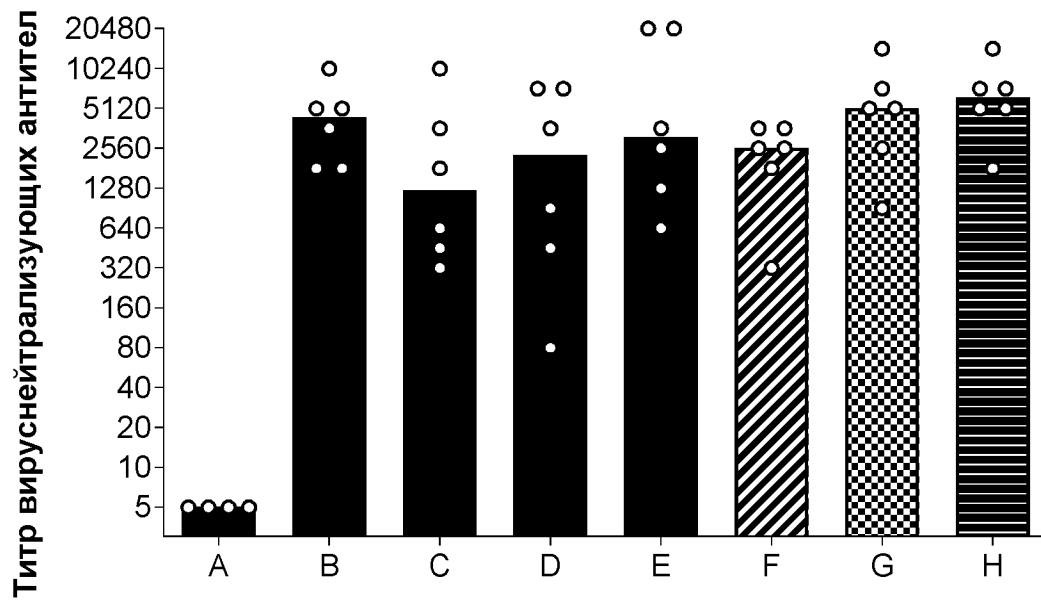
ФИГ. 3

С

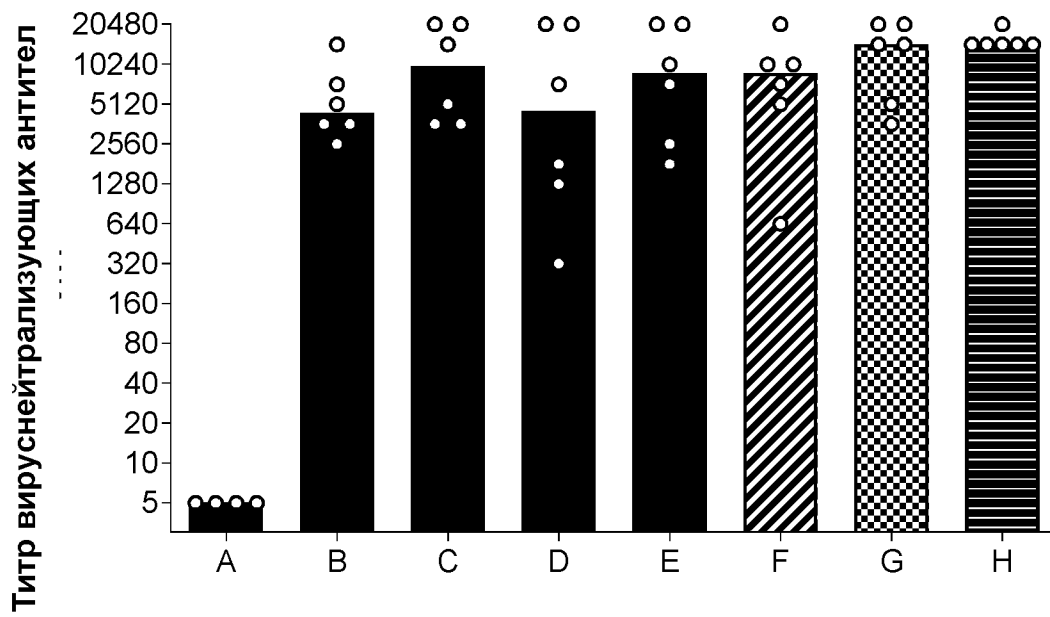


ФИГ. 3 (продолжение)

А



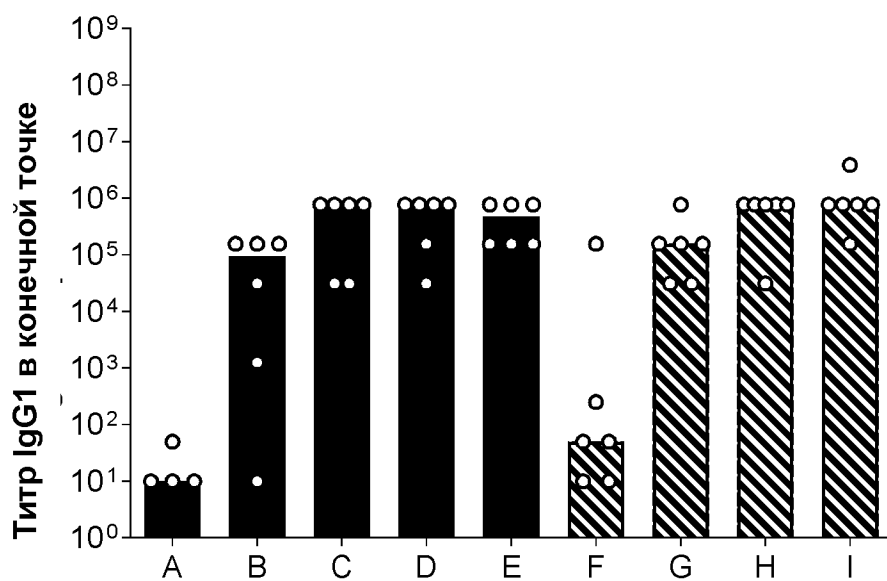
В



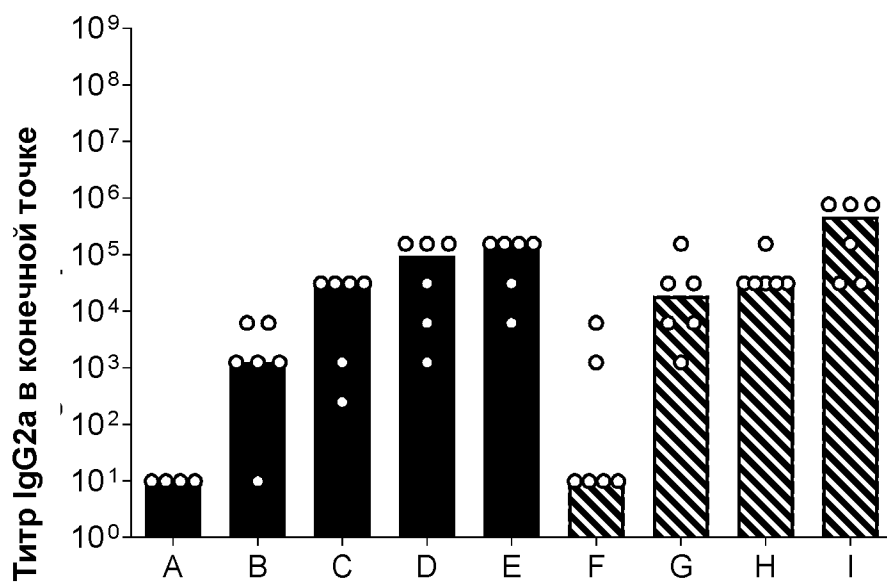
ФИГ. 4



А

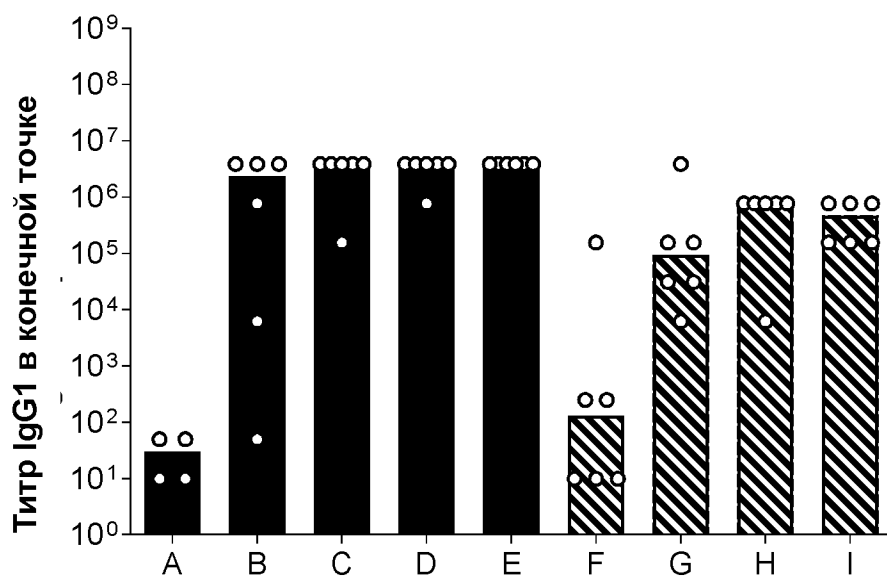


В

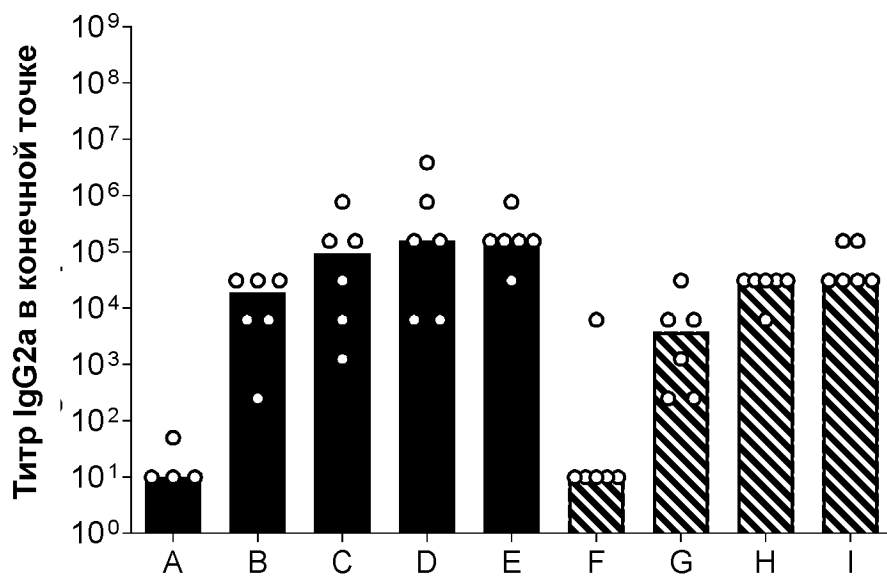


ФИГ. 5

С



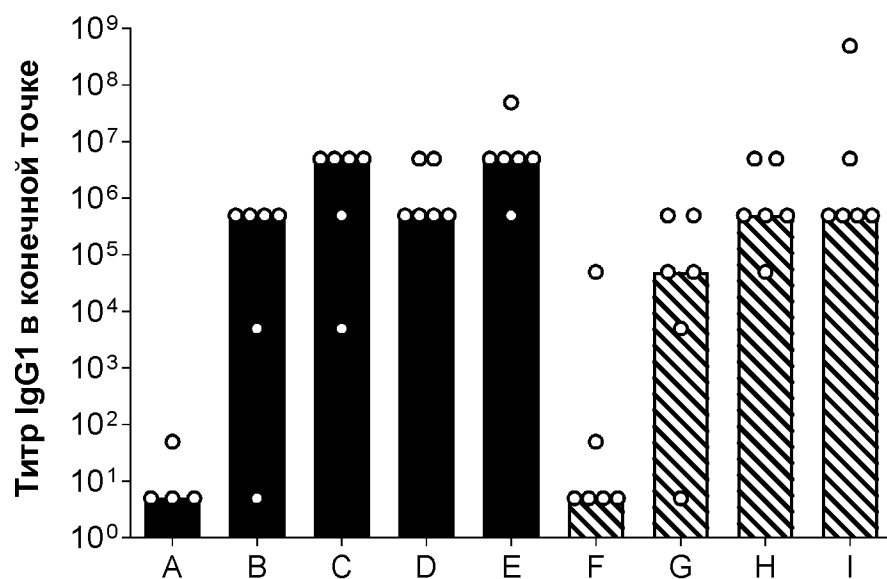
D



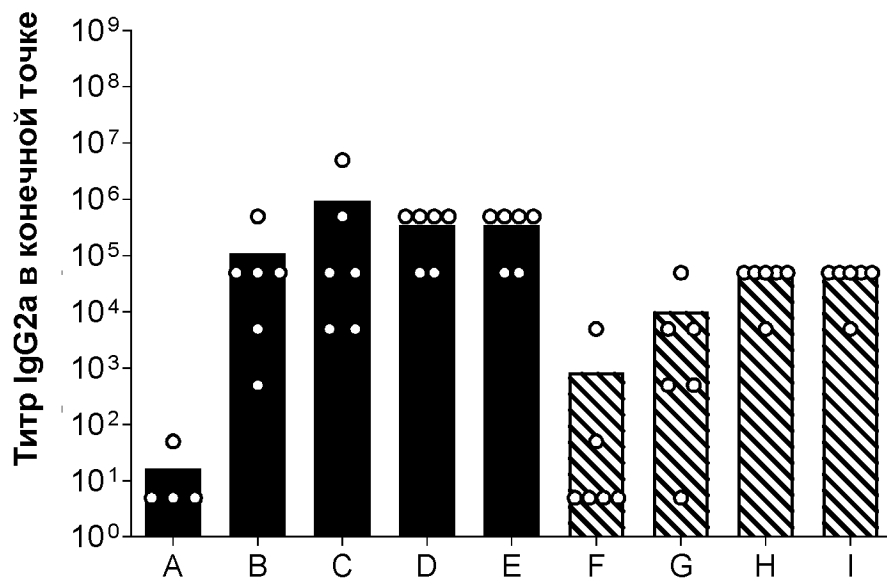
ФИГ. 5 (продолжение)



G

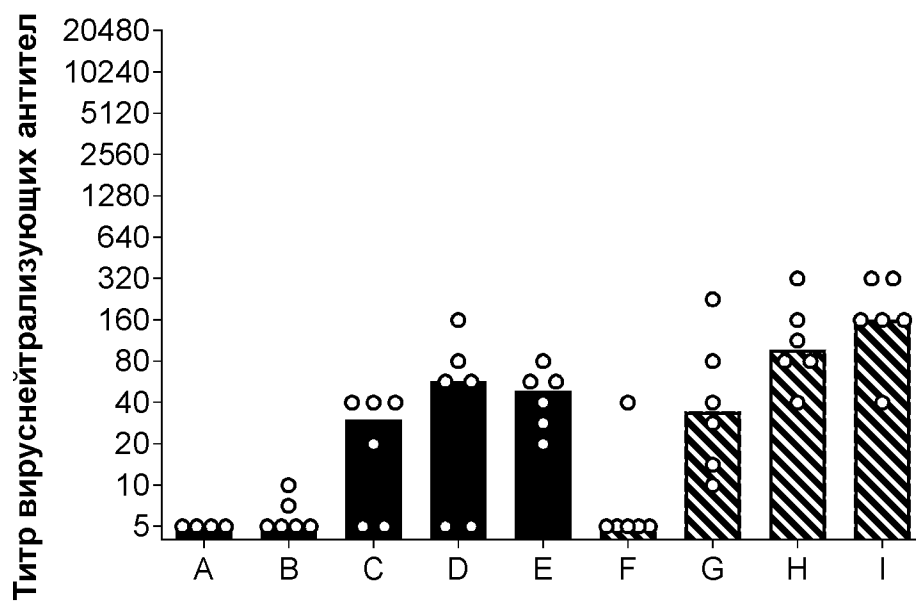


H

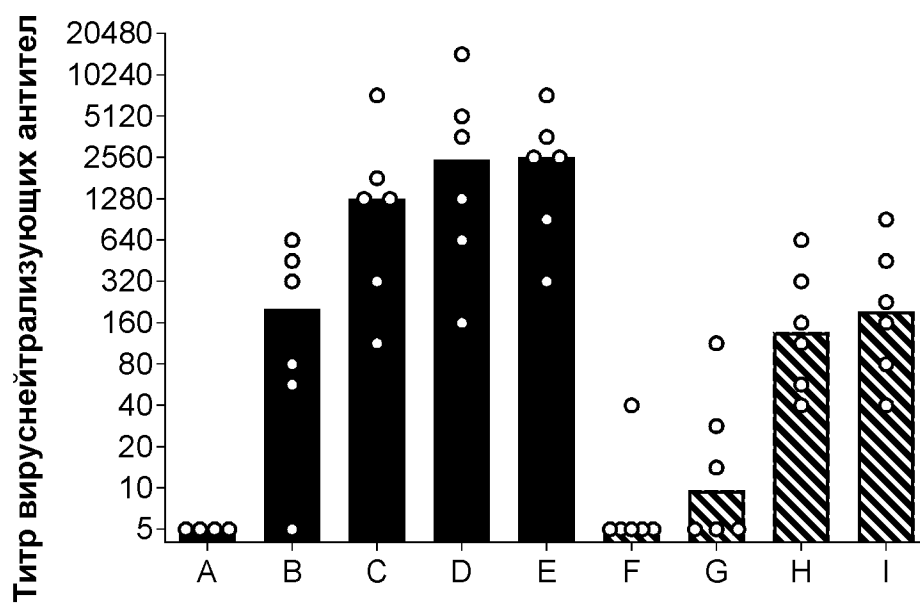


ФИГ. 5 (продолжение)

А

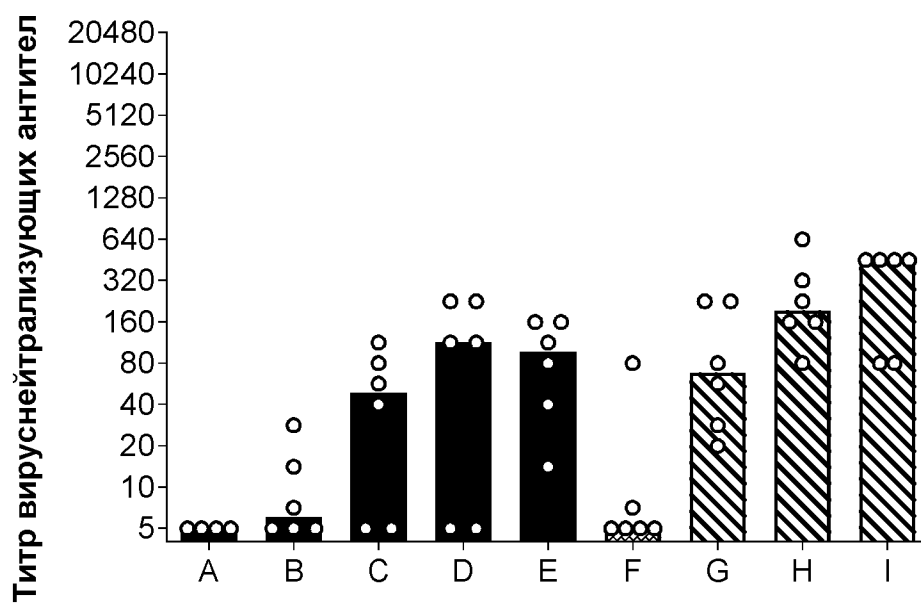


В

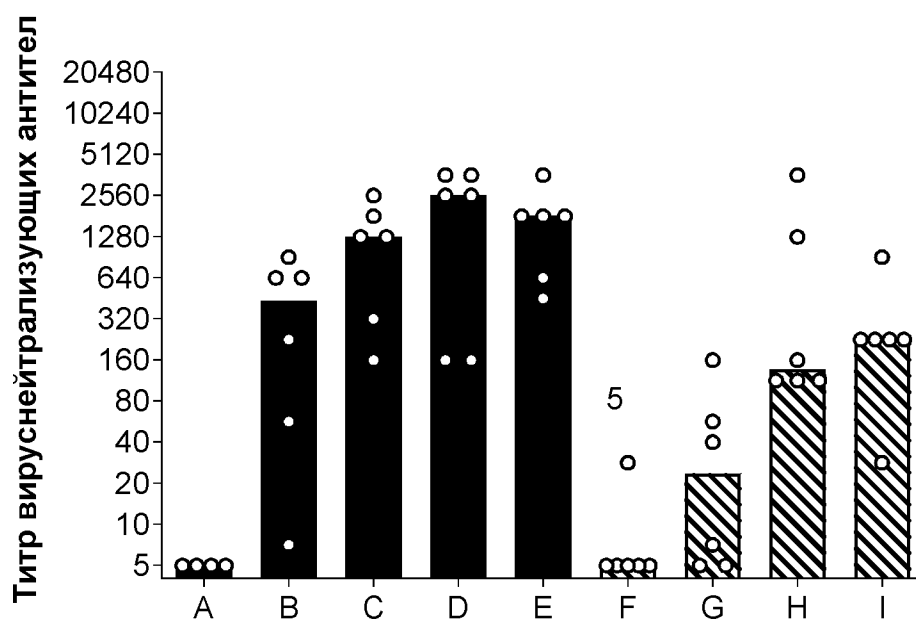


ФИГ. 6

С

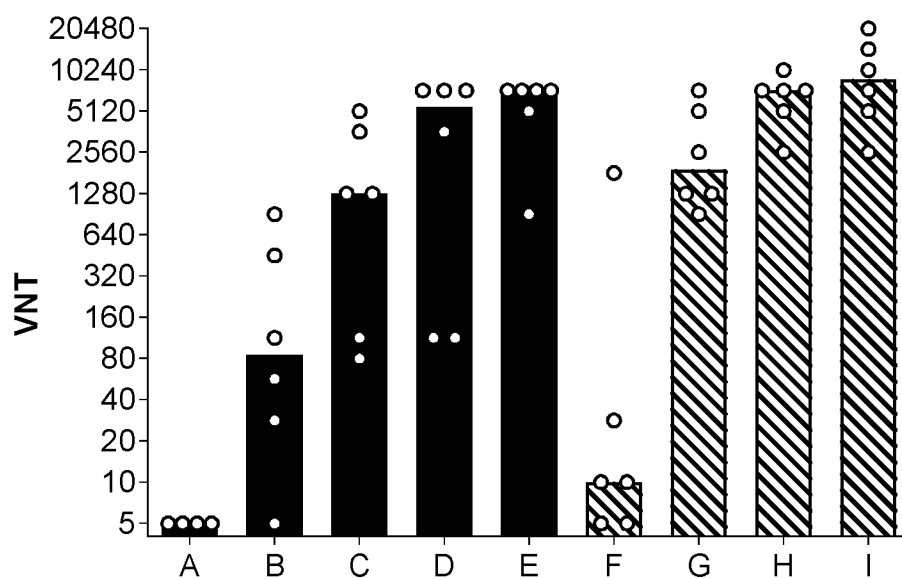


D

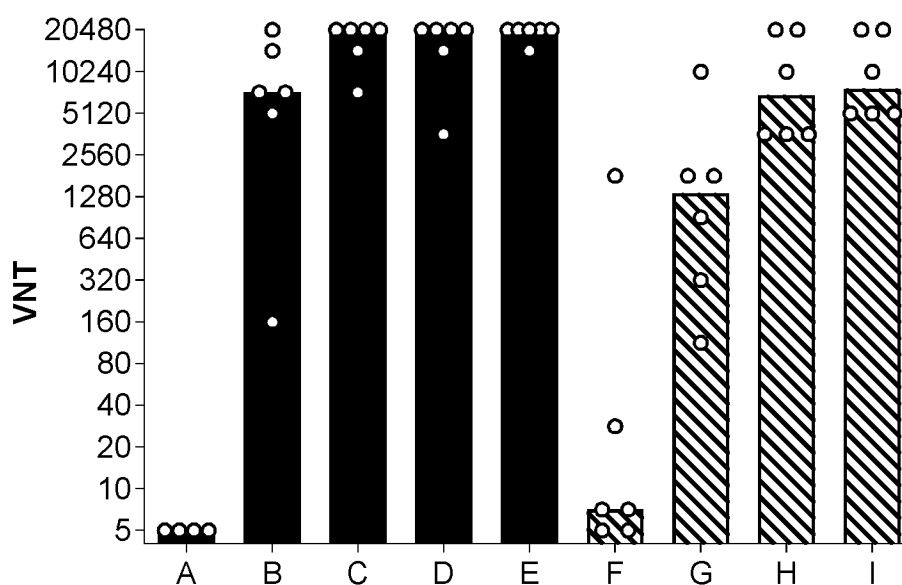


ФИГ. 6 (продолжение)

E

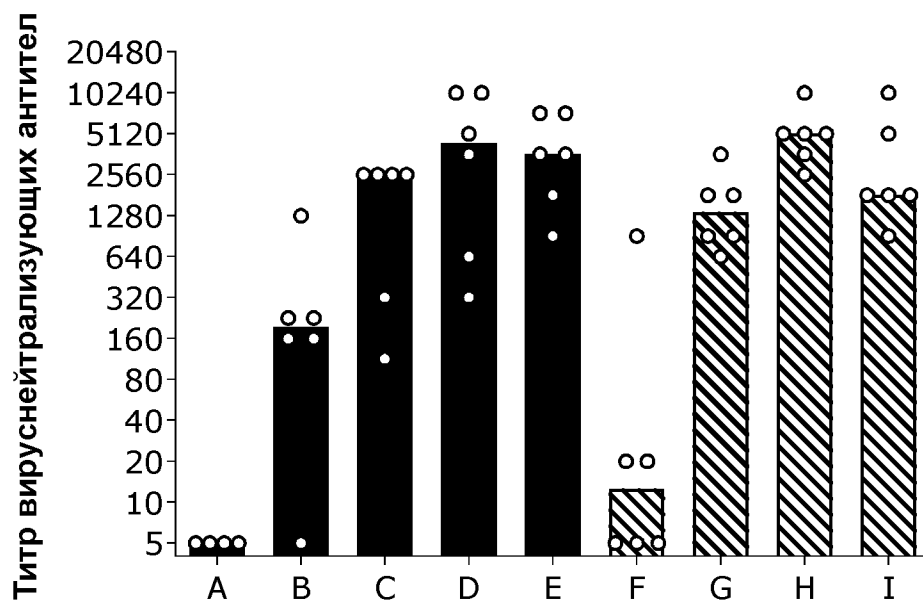


F

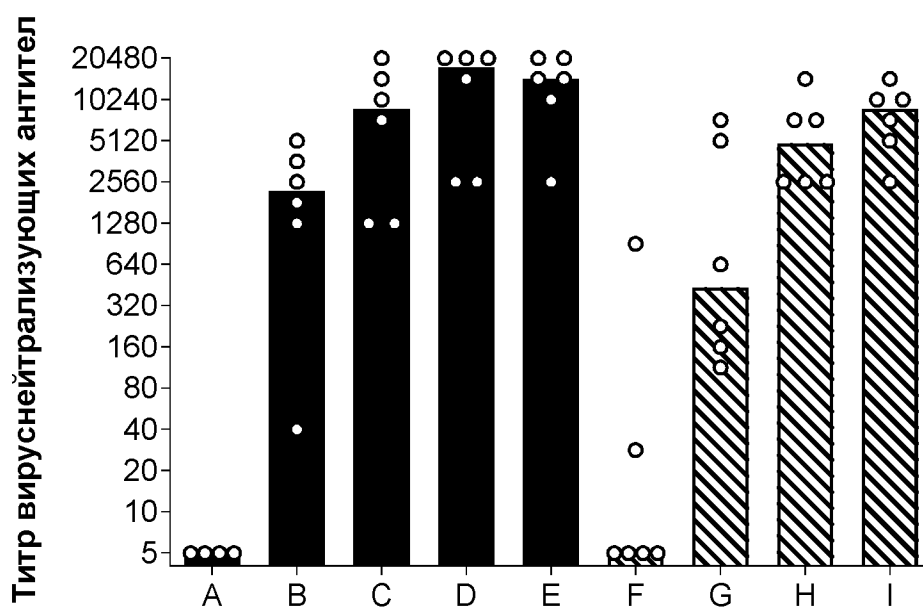


ФИГ. 6 (продолжение)

G



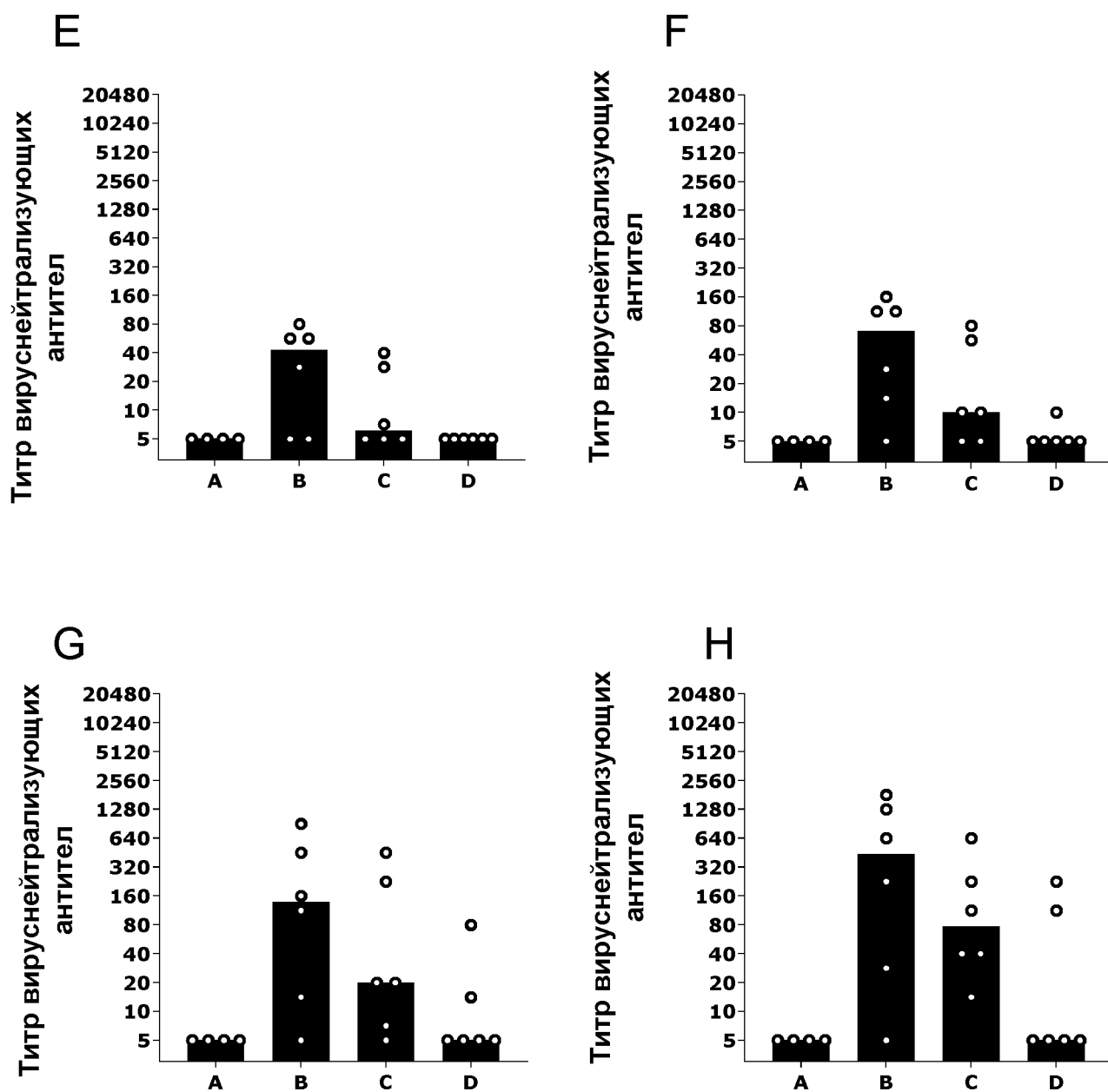
H



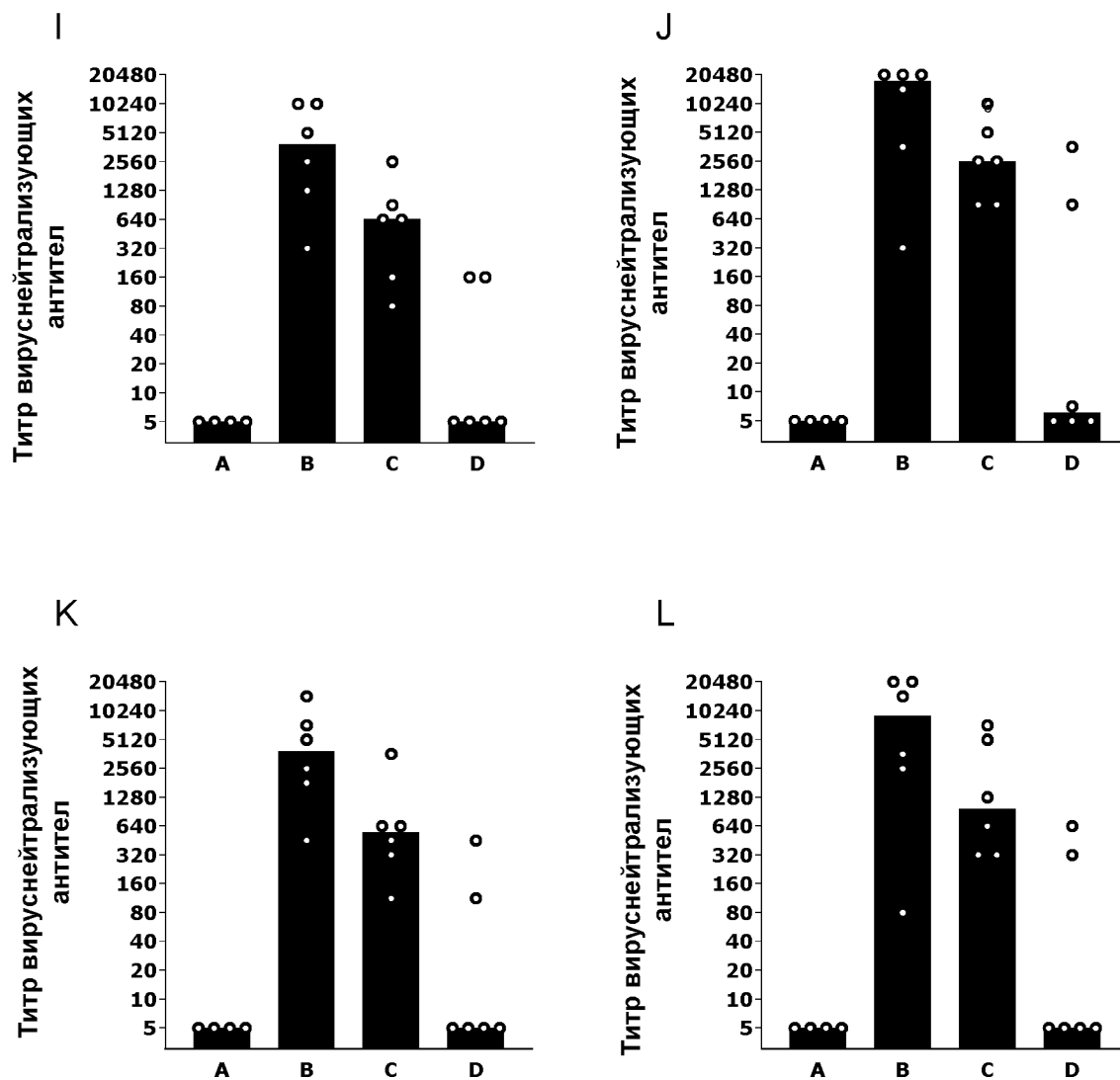
ФИГ. 6 (продолжение)



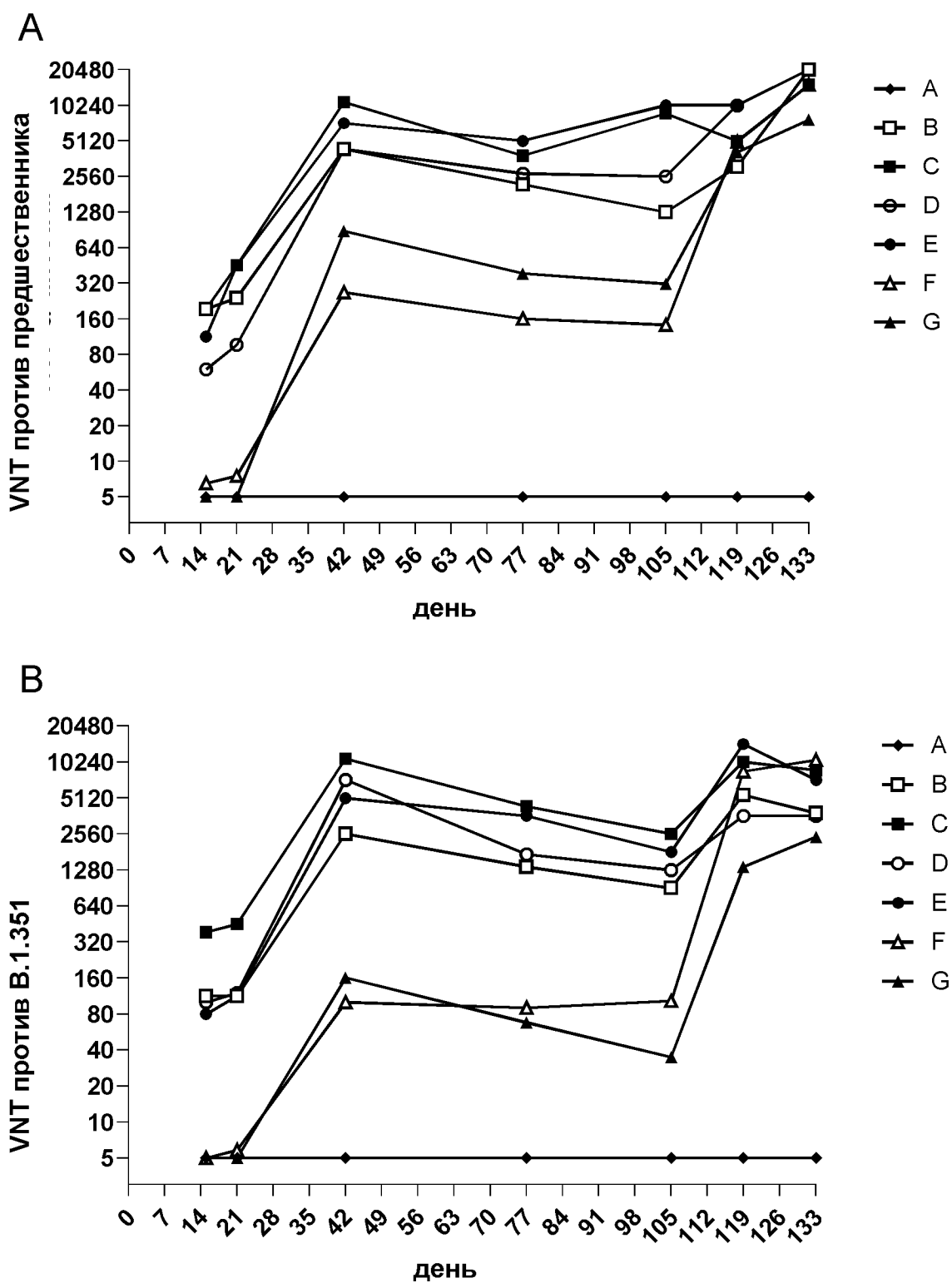




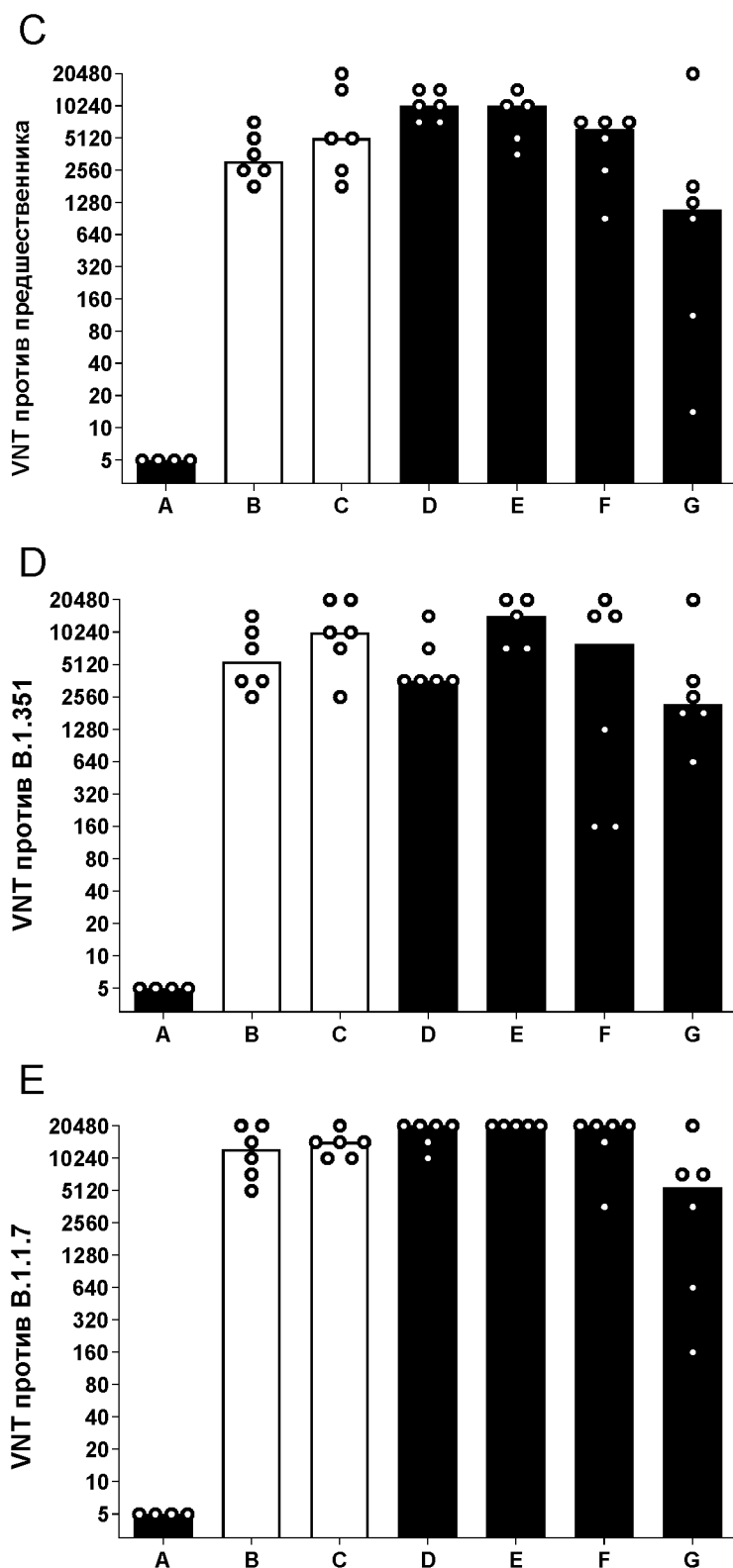
ФИГ. 7 (продолжение)



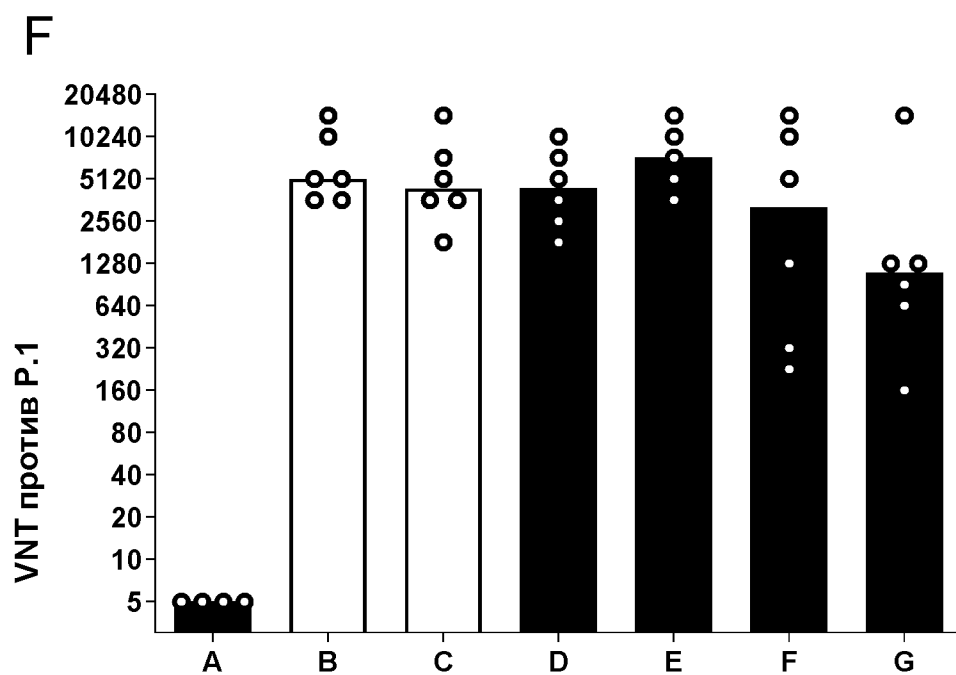
ФИГ. 7 (продолжение)



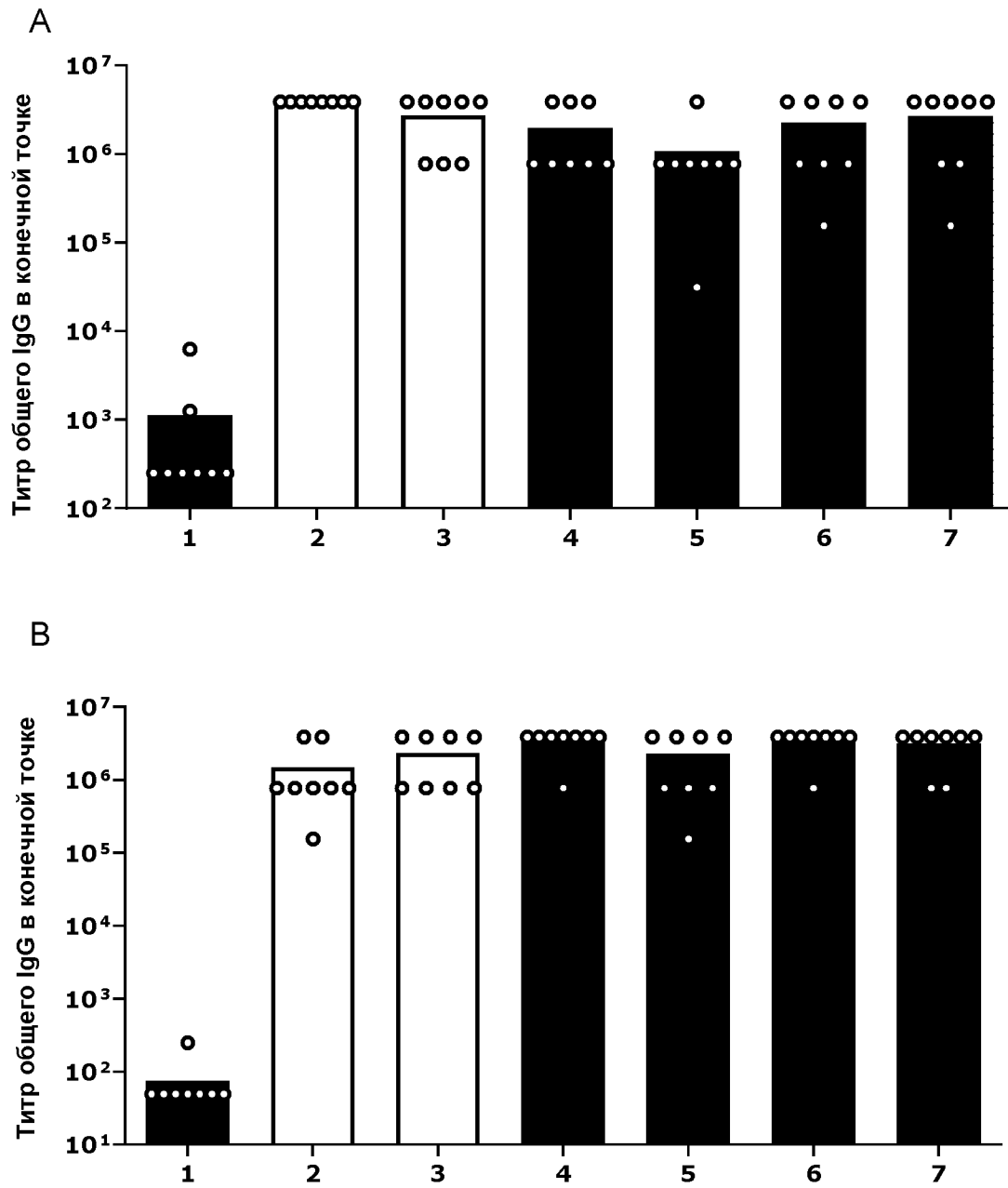
ФИГ. 8



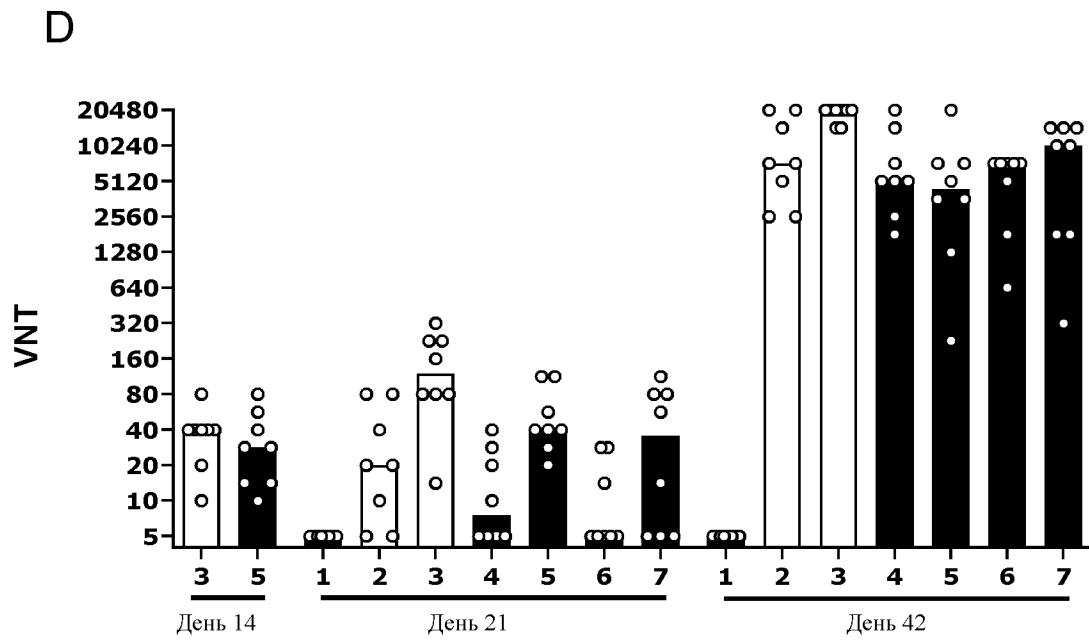
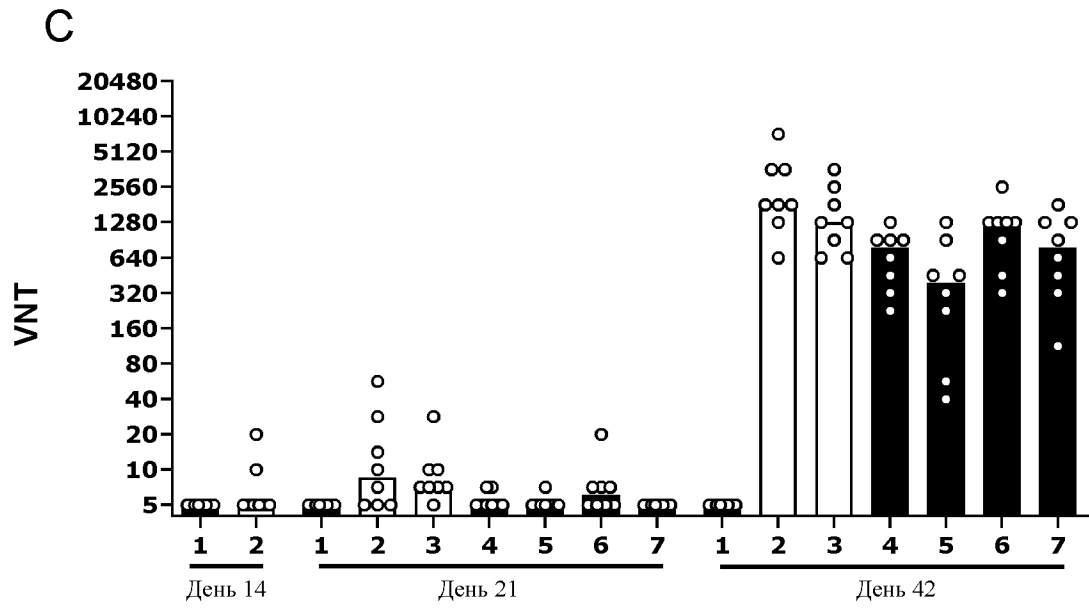
ФИГ. 8 (продолжение)



ФИГ. 8 (продолжение)

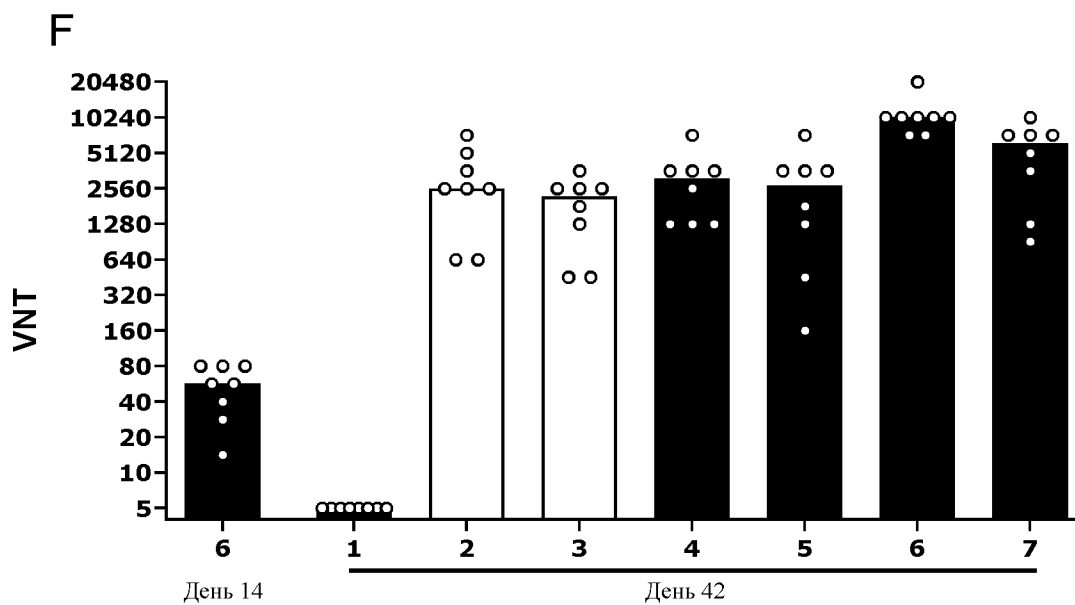
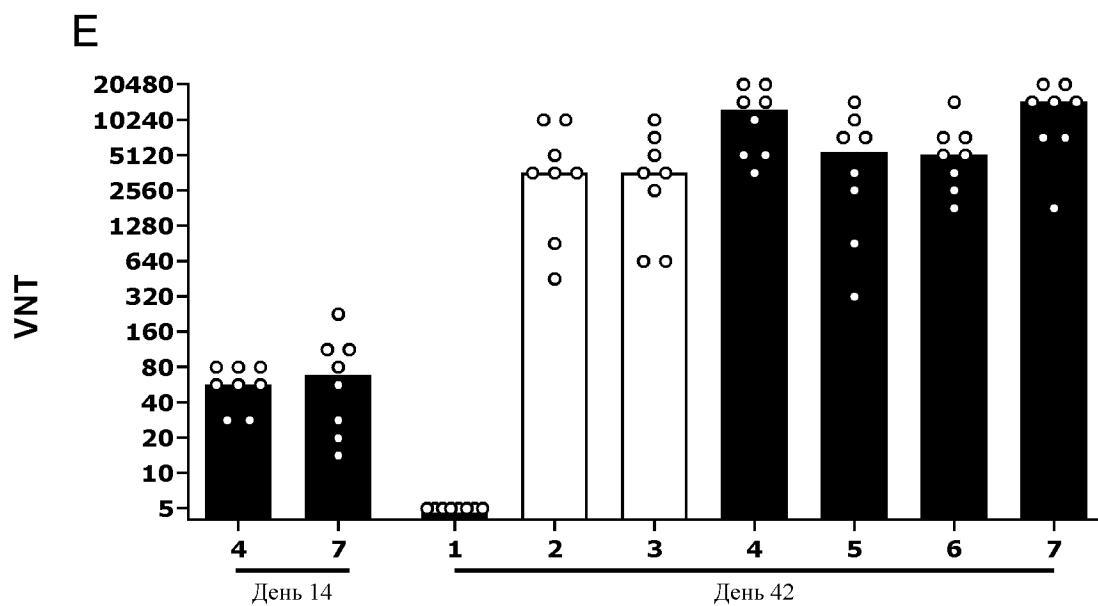


ФИГ. 9



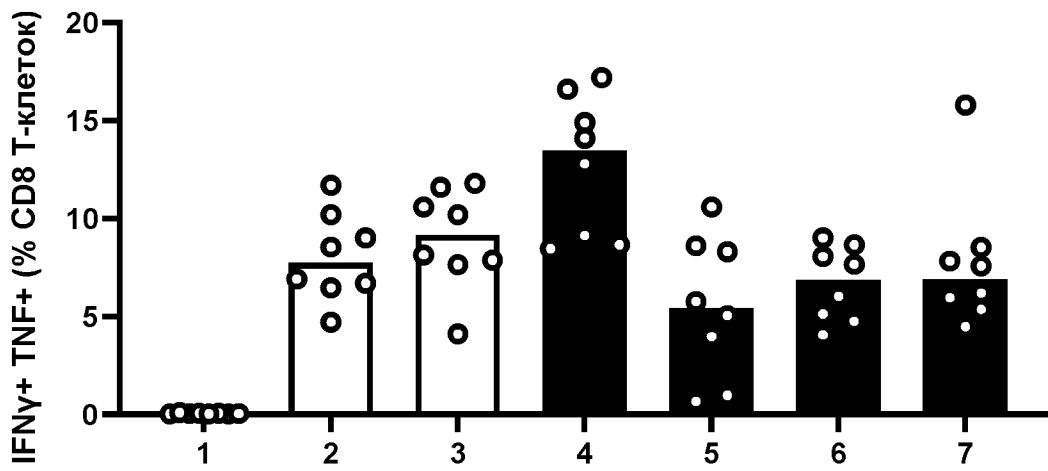
ФИГ. 9 (продолжение)



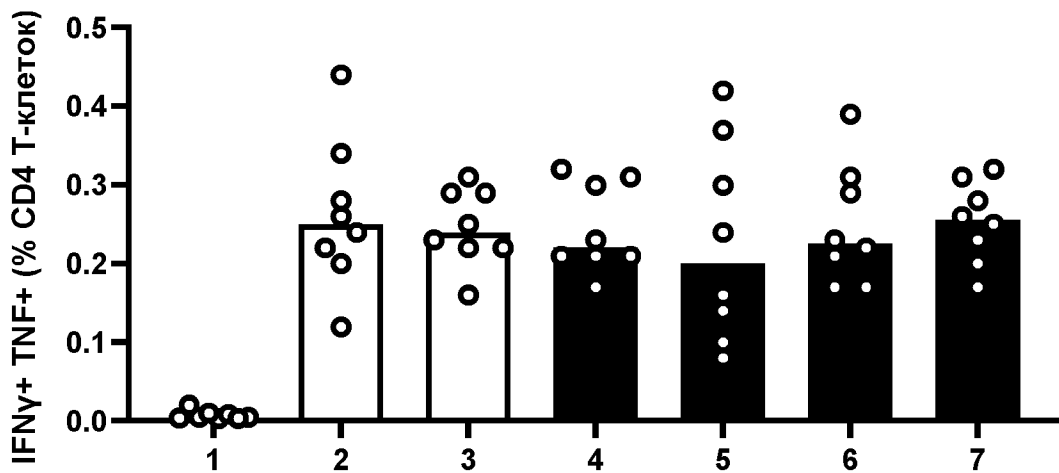


ФИГ. 9 (продолжение)

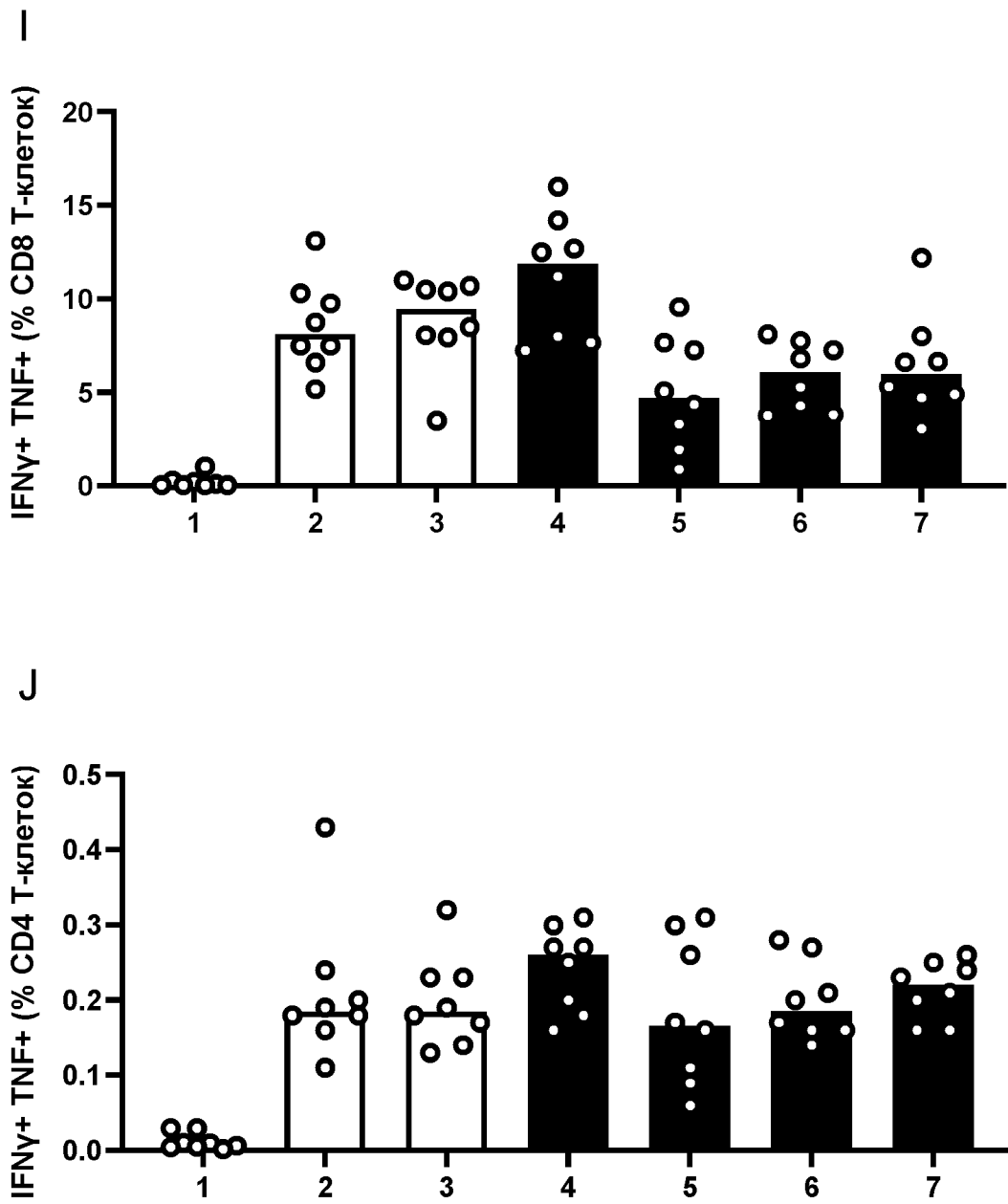
G



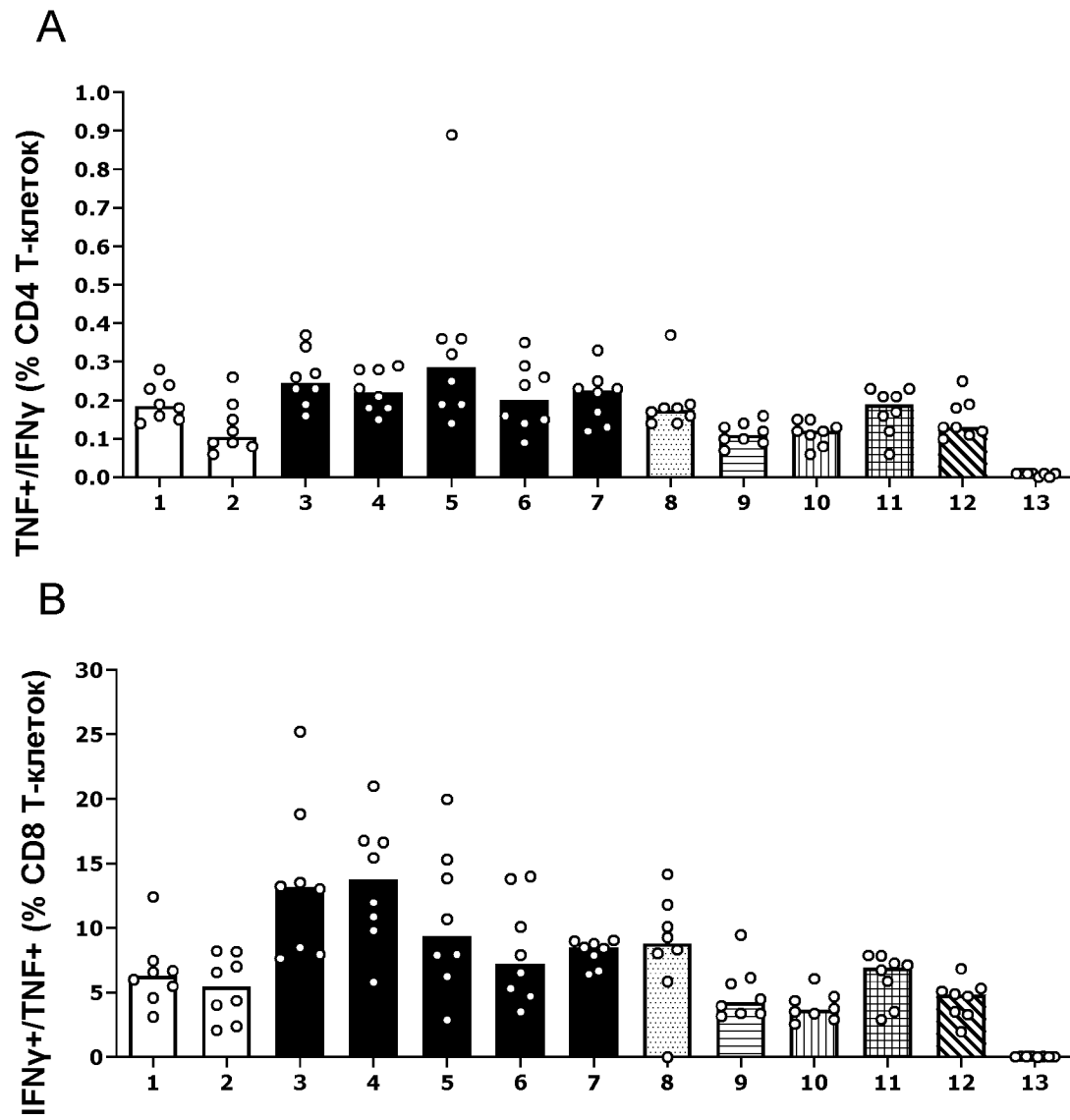
H



ФИГ. 9 (продолжение)

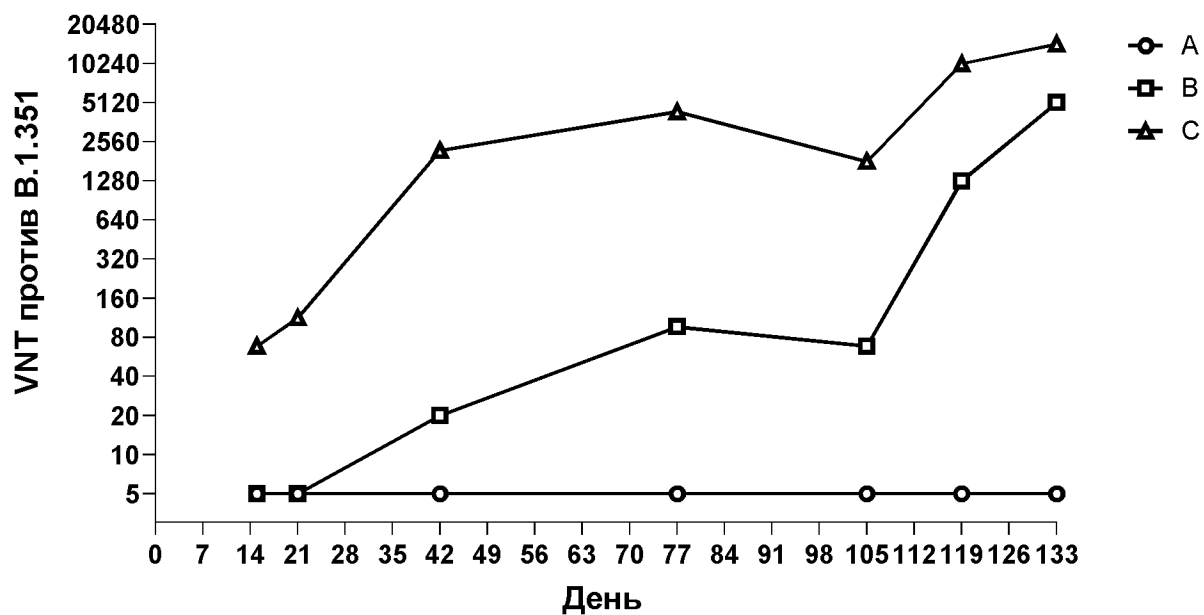
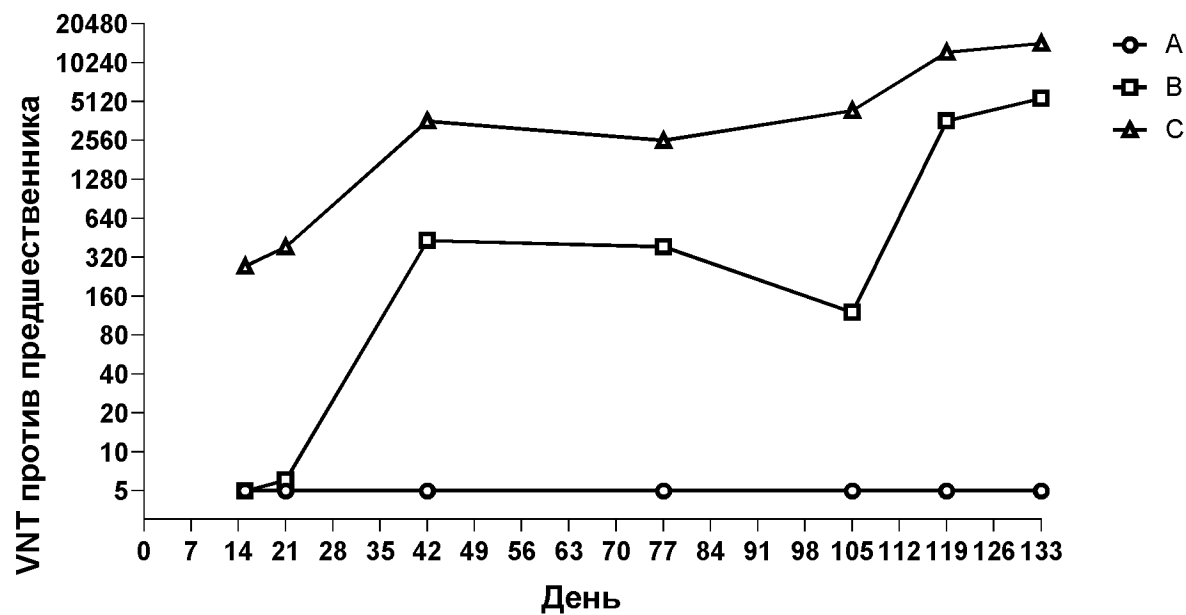


ФИГ. 9 (продолжение)

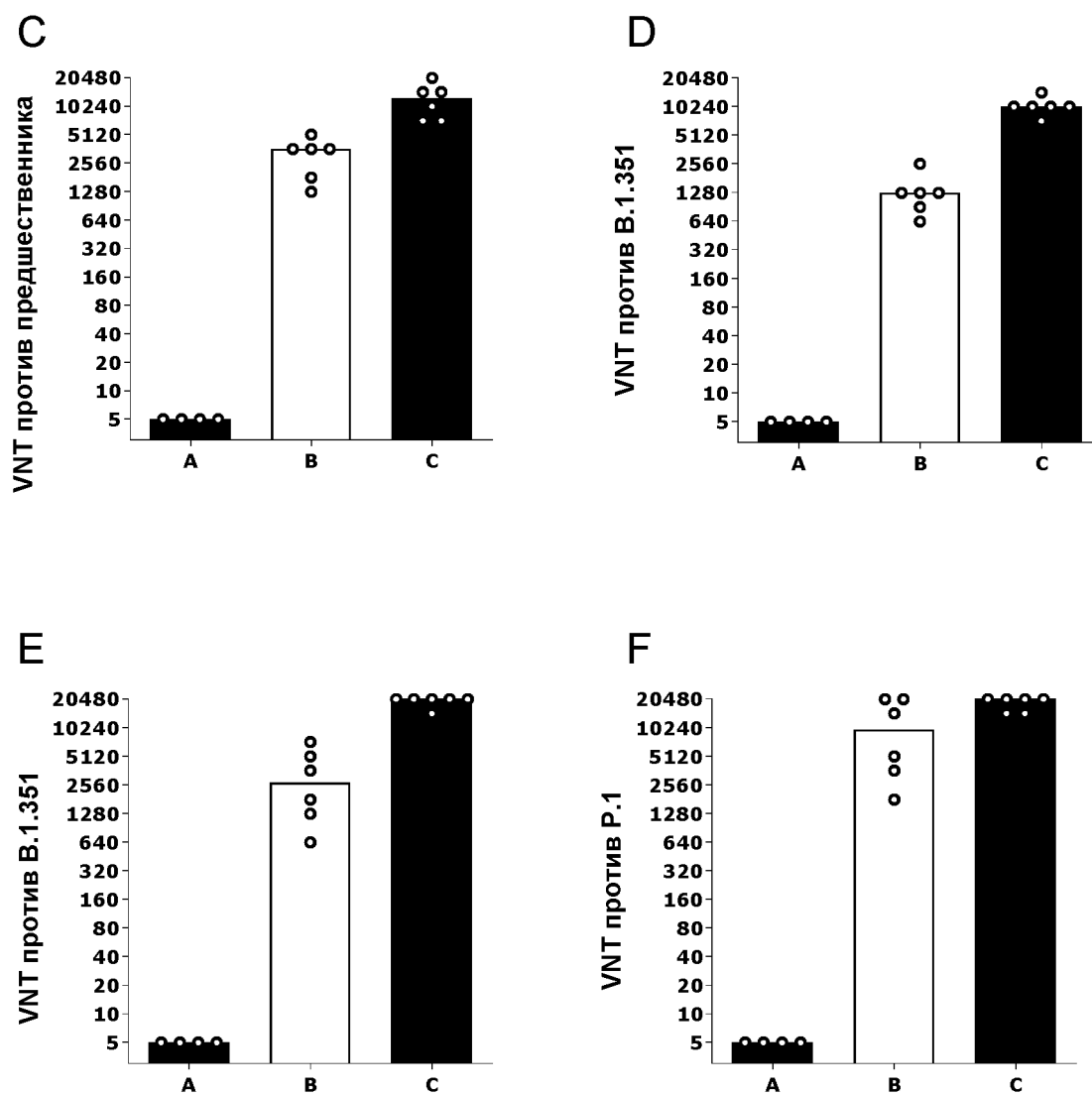


ФИГ. 10

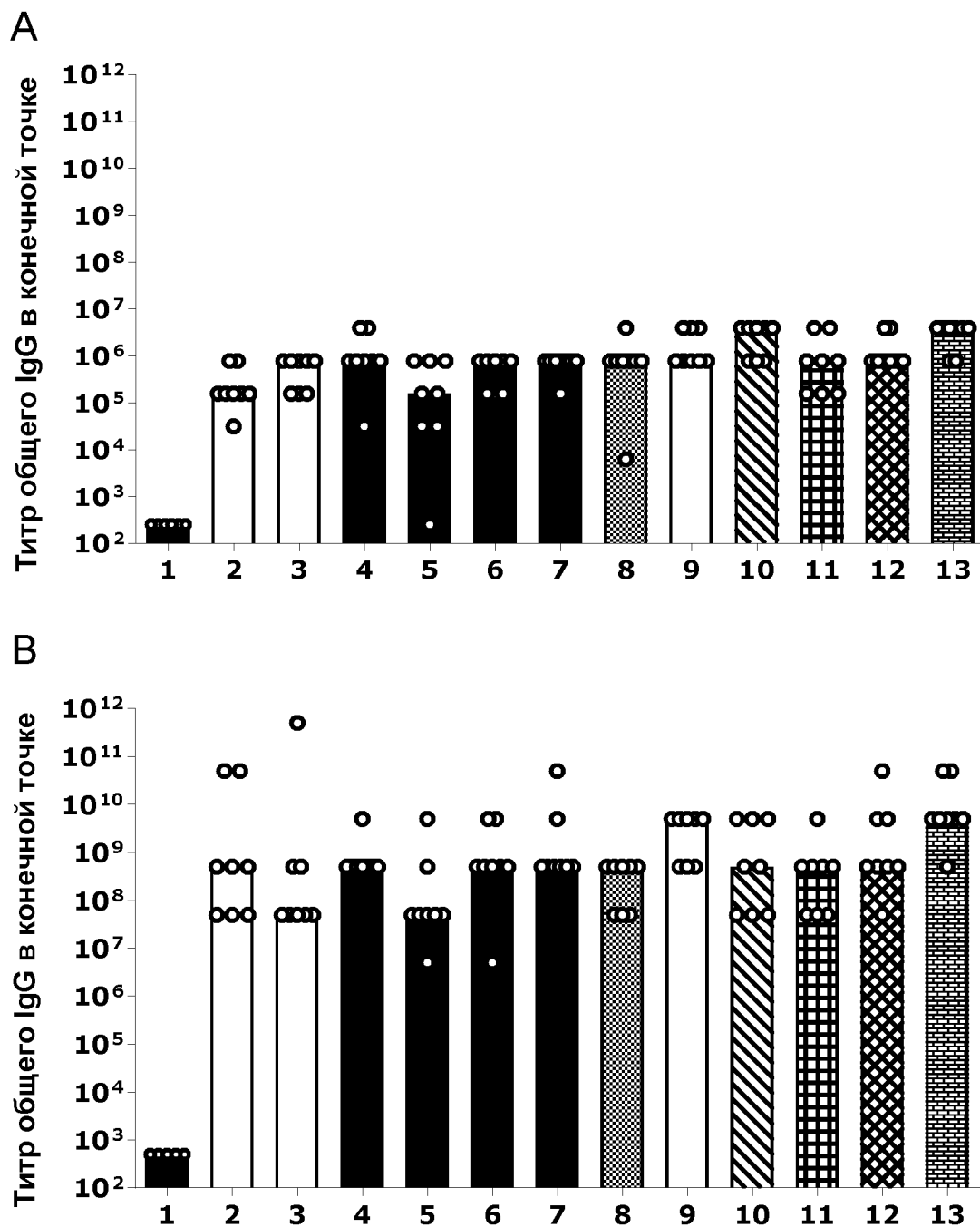
А



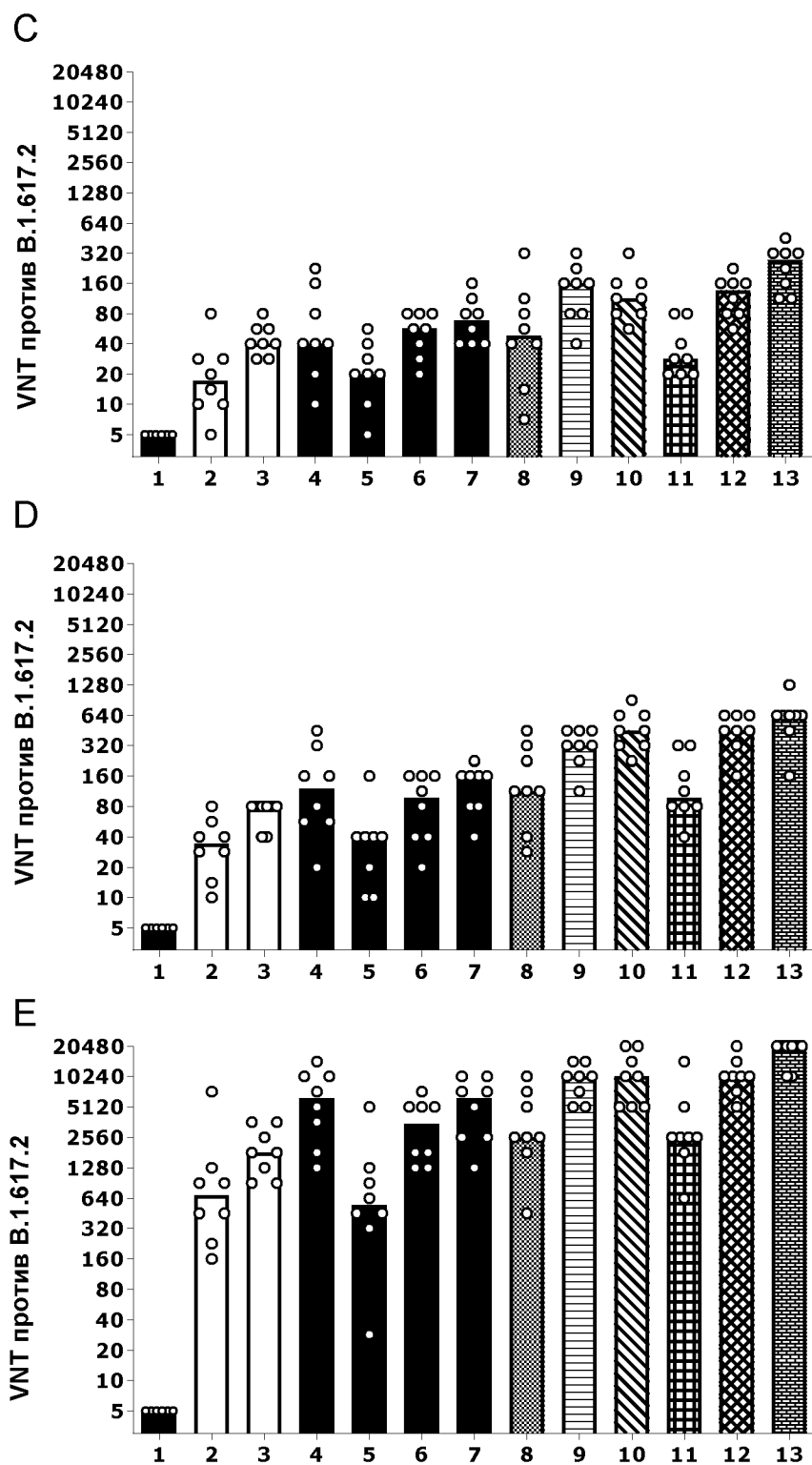
ФИГ. 11



ФИГ. 11 (продолжение)

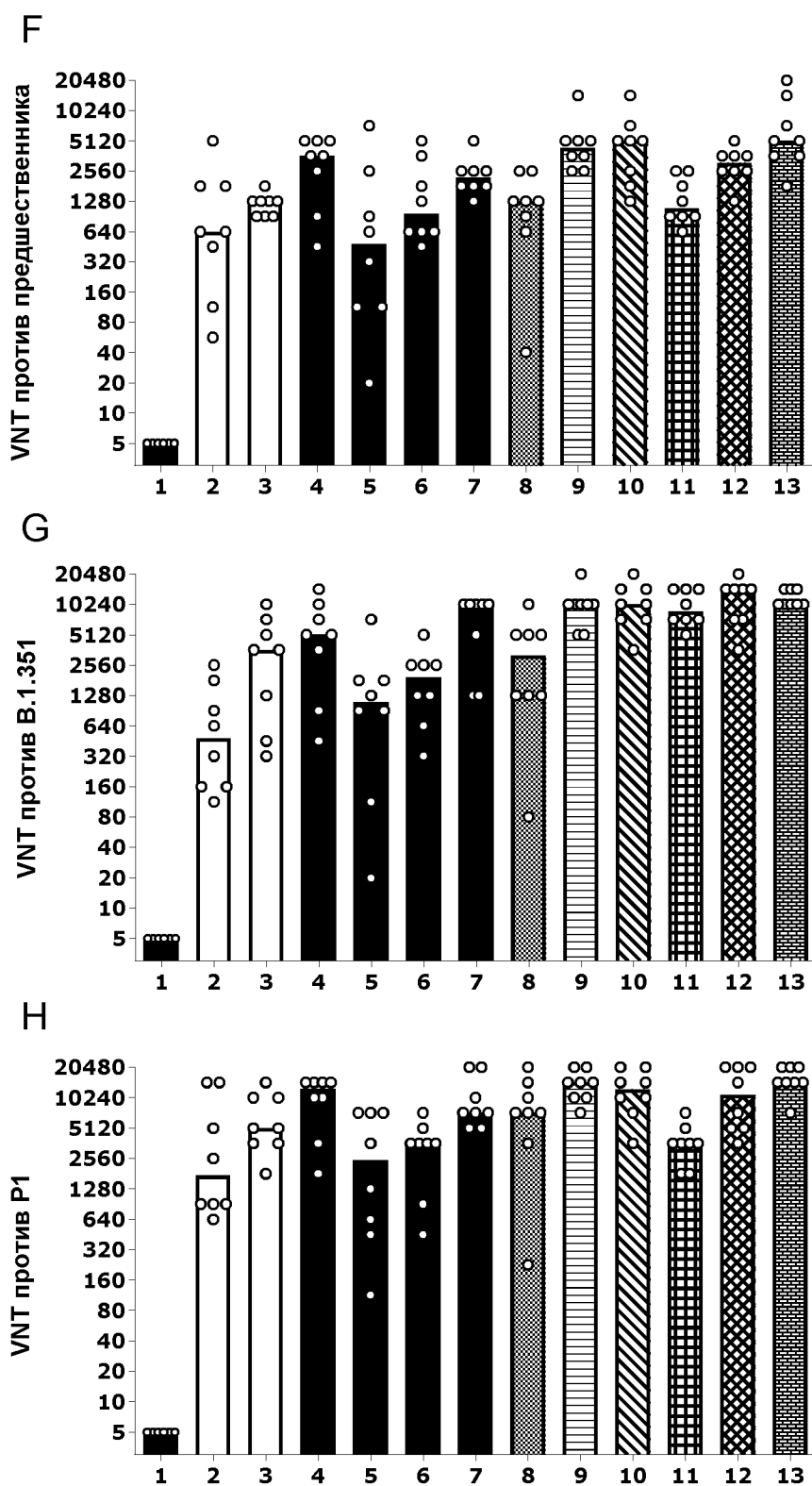


ФИГ. 12

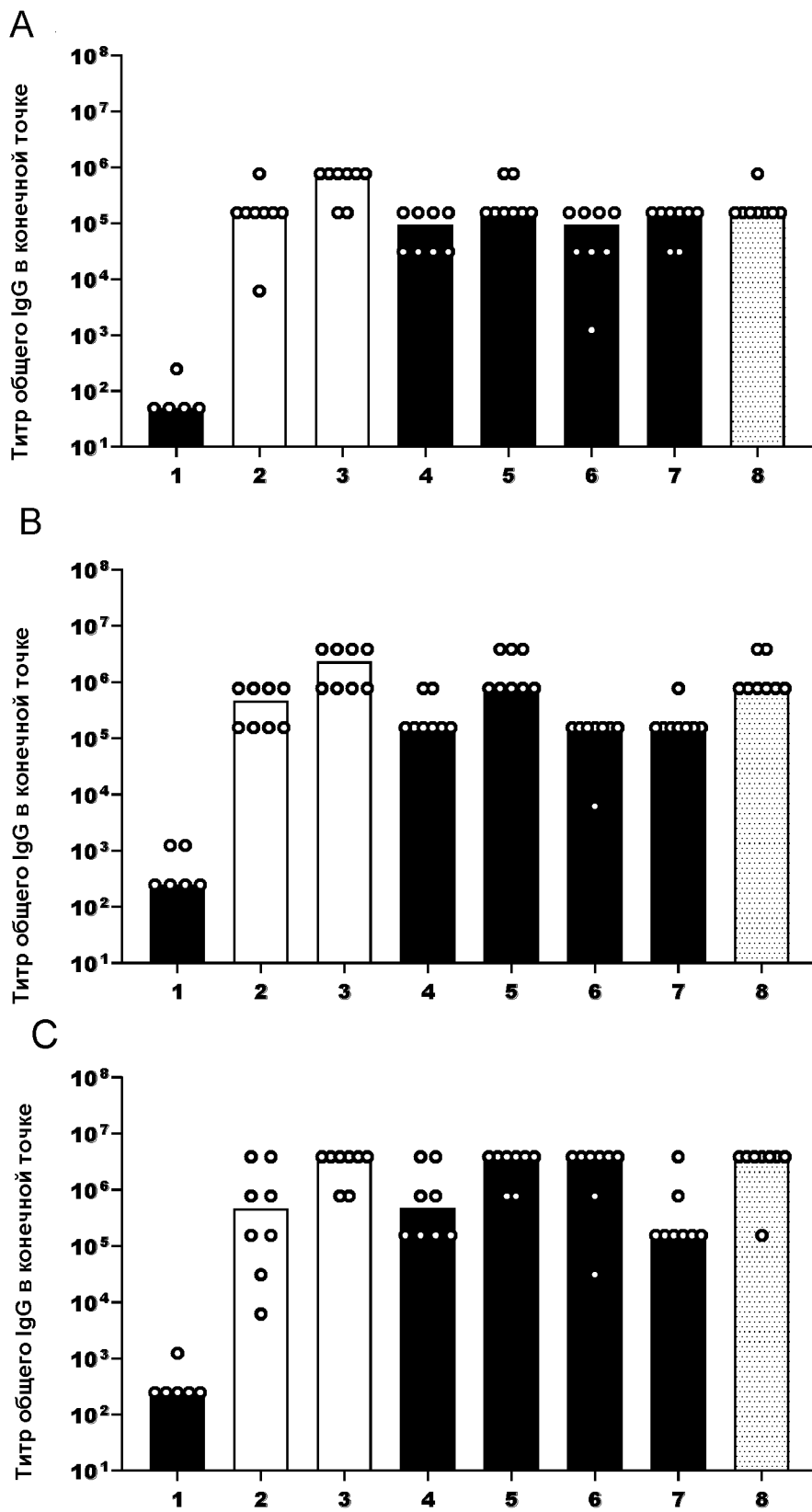


ФИГ. 12 (продолжение)

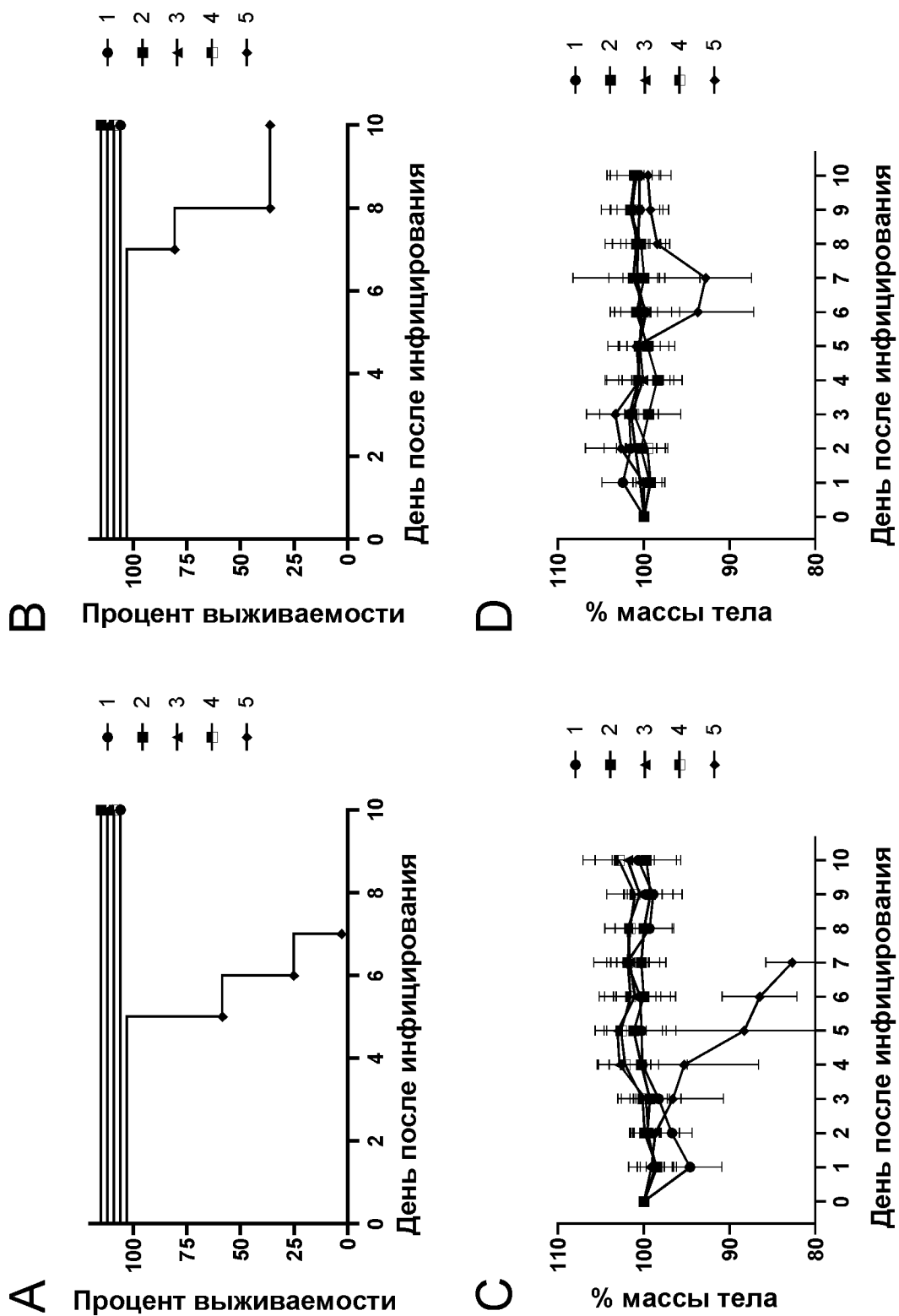




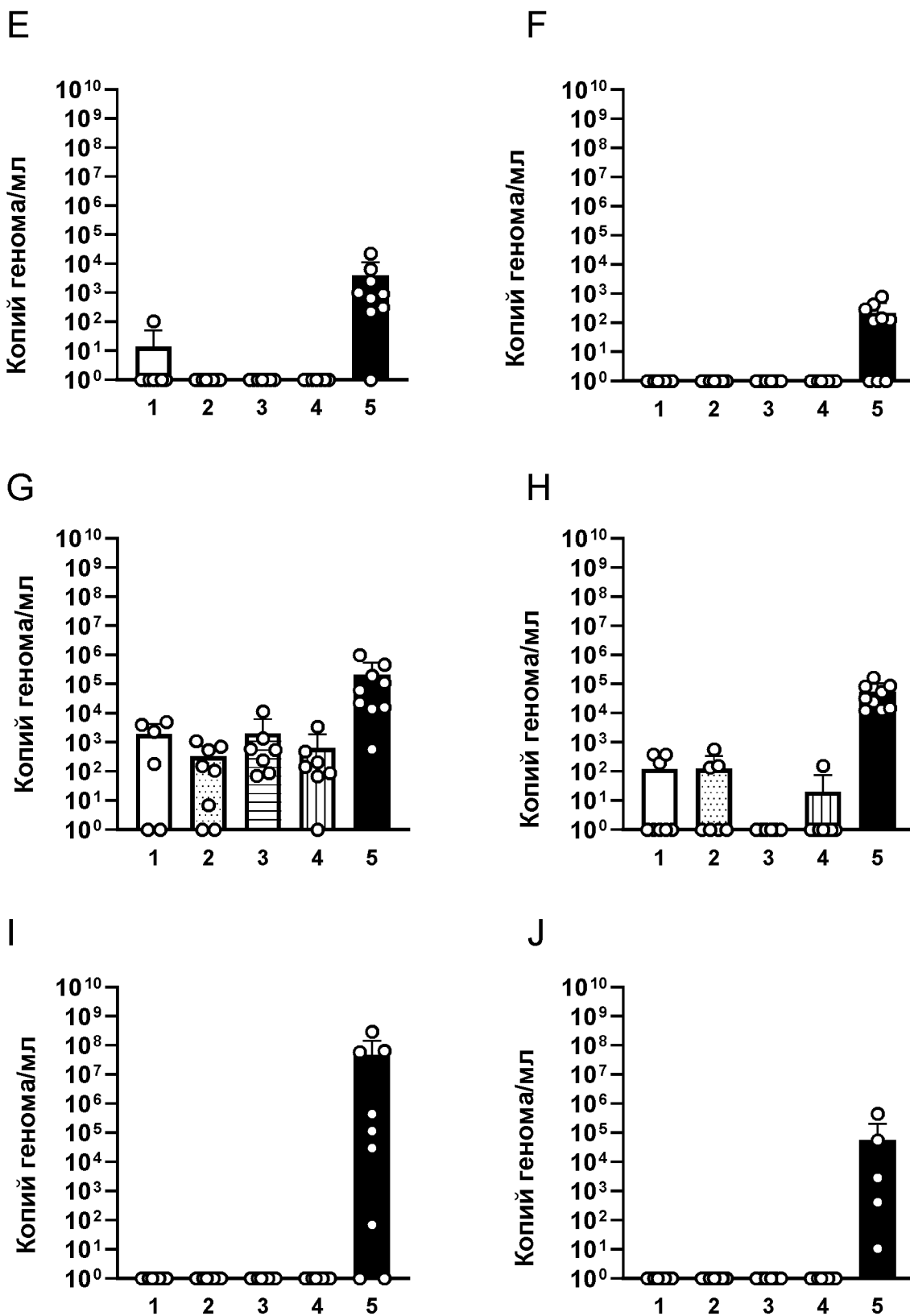
ФИГ. 12 (продолжение)



ФИГ. 13

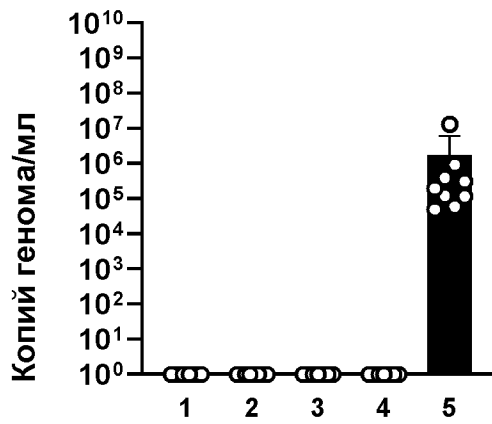


ФИГ. 14

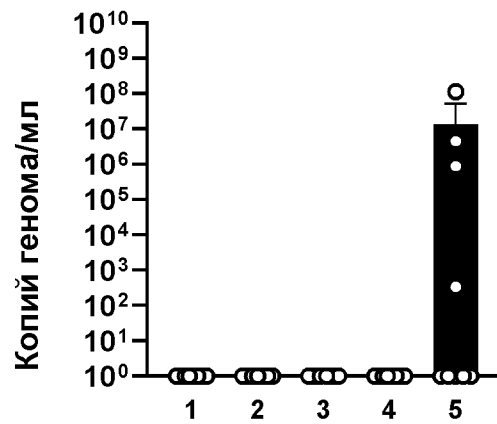


ФИГ. 14 (продолжение)

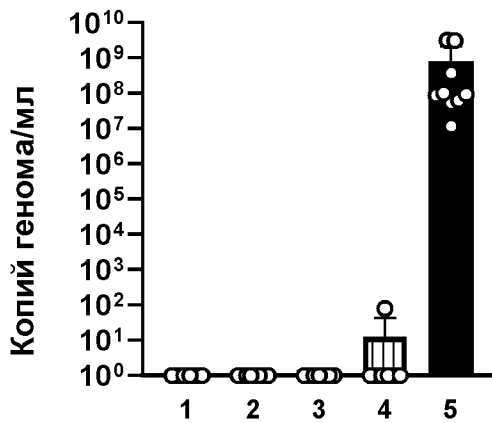
К



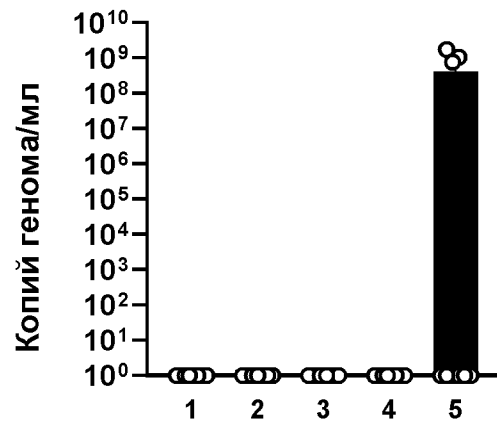
Л



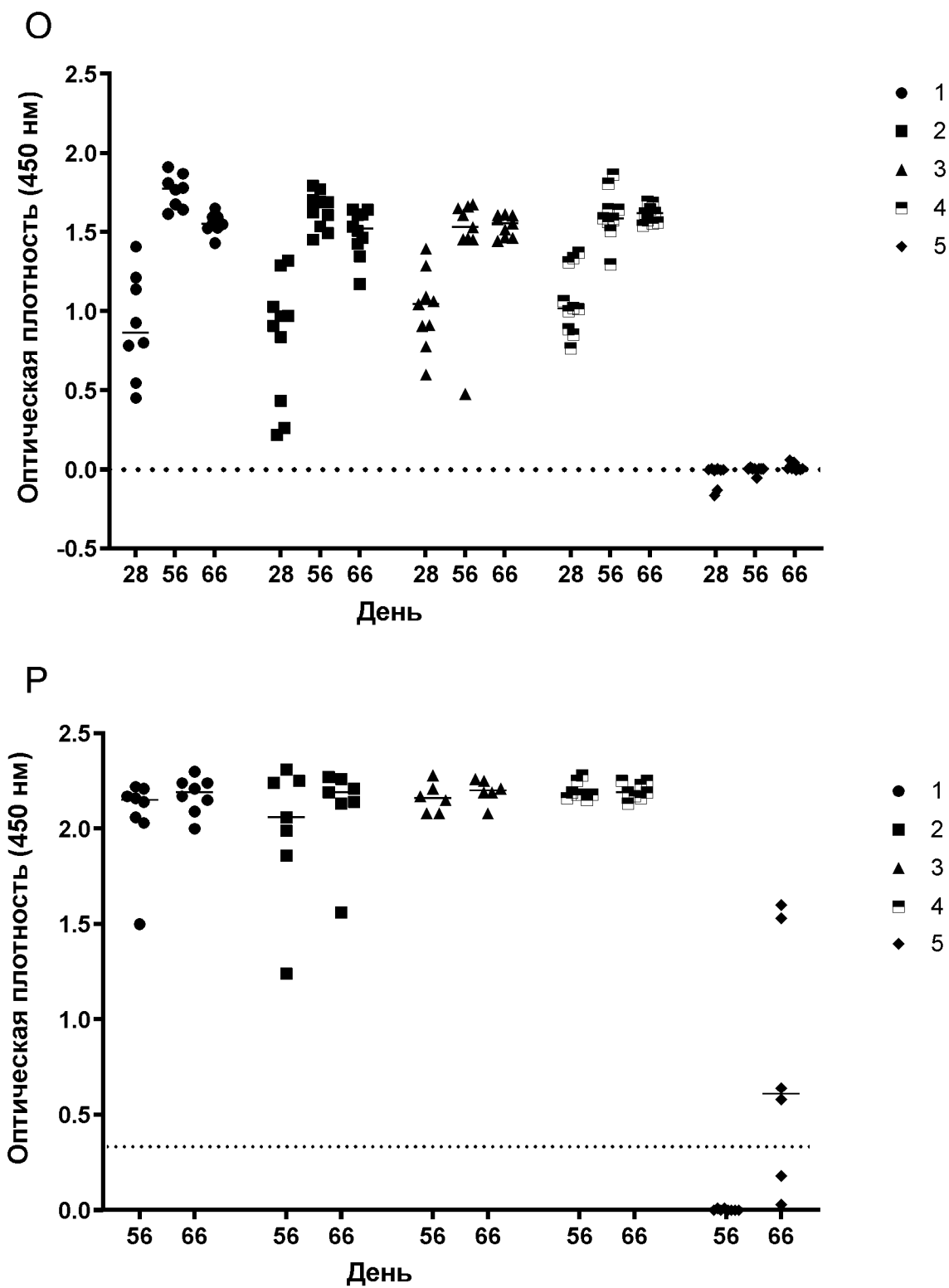
М



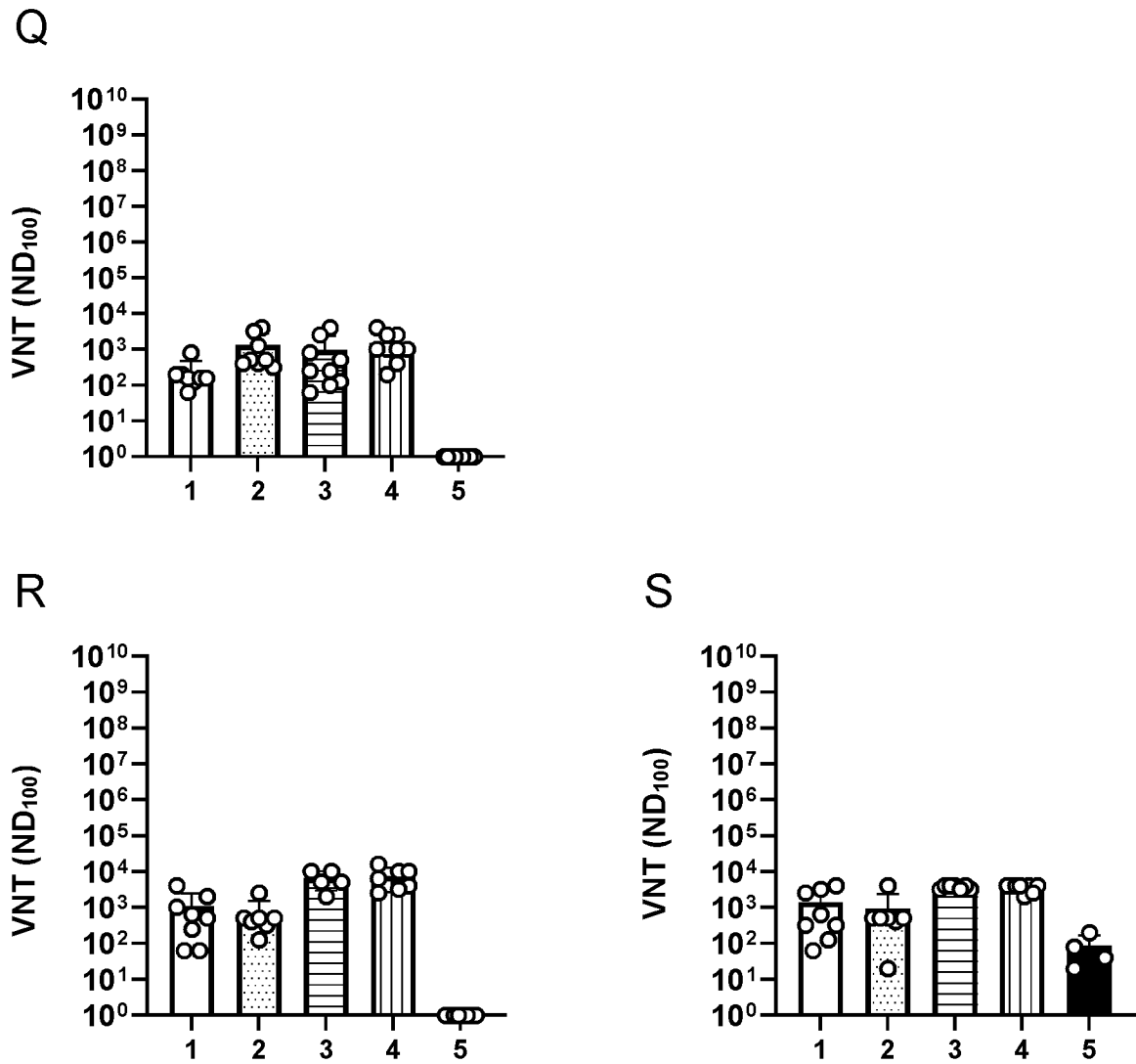
N



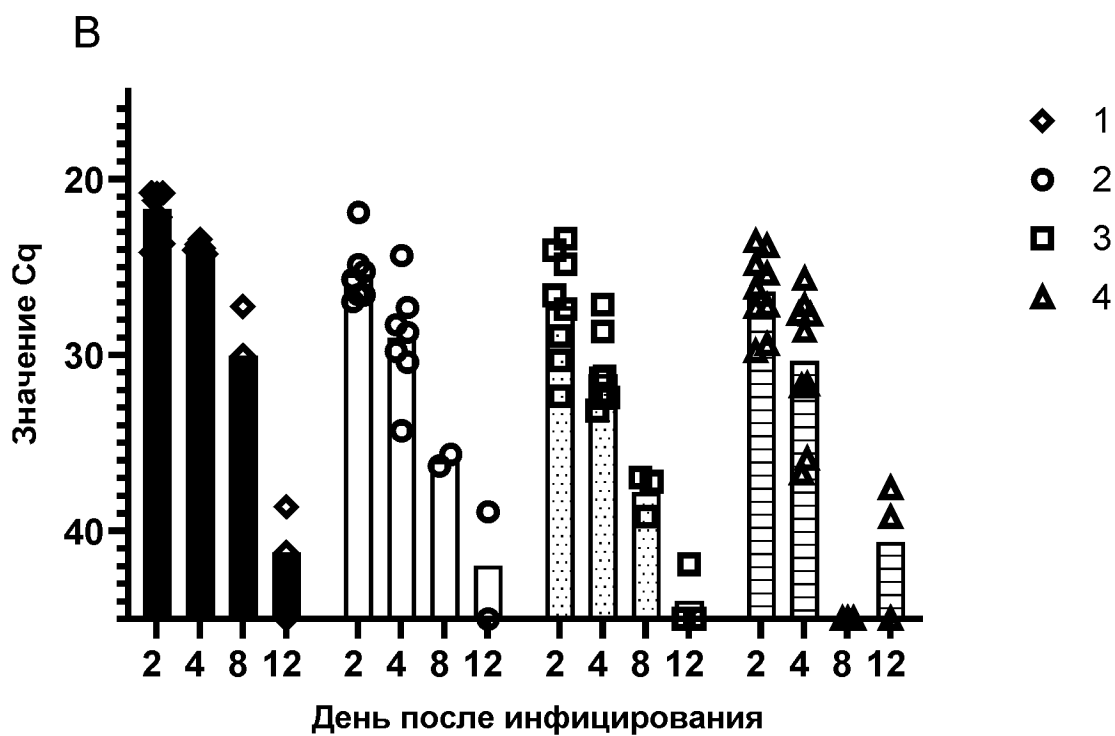
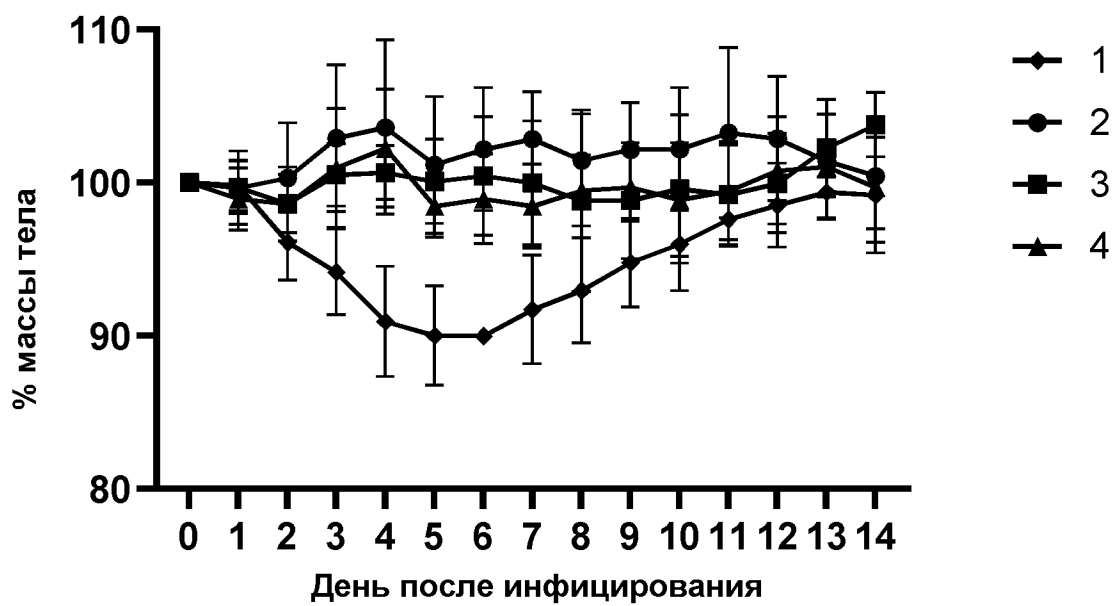
ФИГ. 14 (продолжение)



ФИГ. 14 (продолжение)

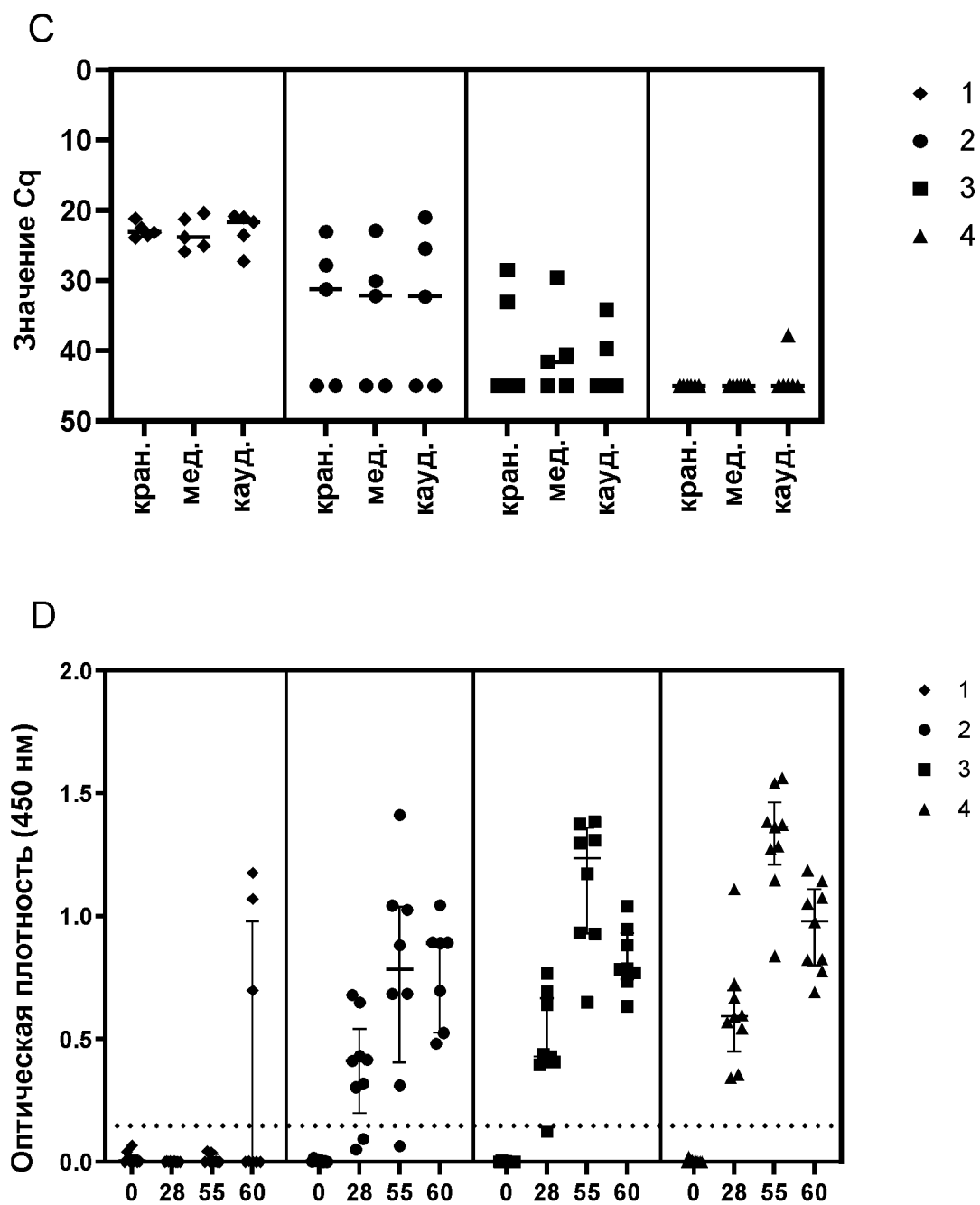


ФИГ. 14 (продолжение)

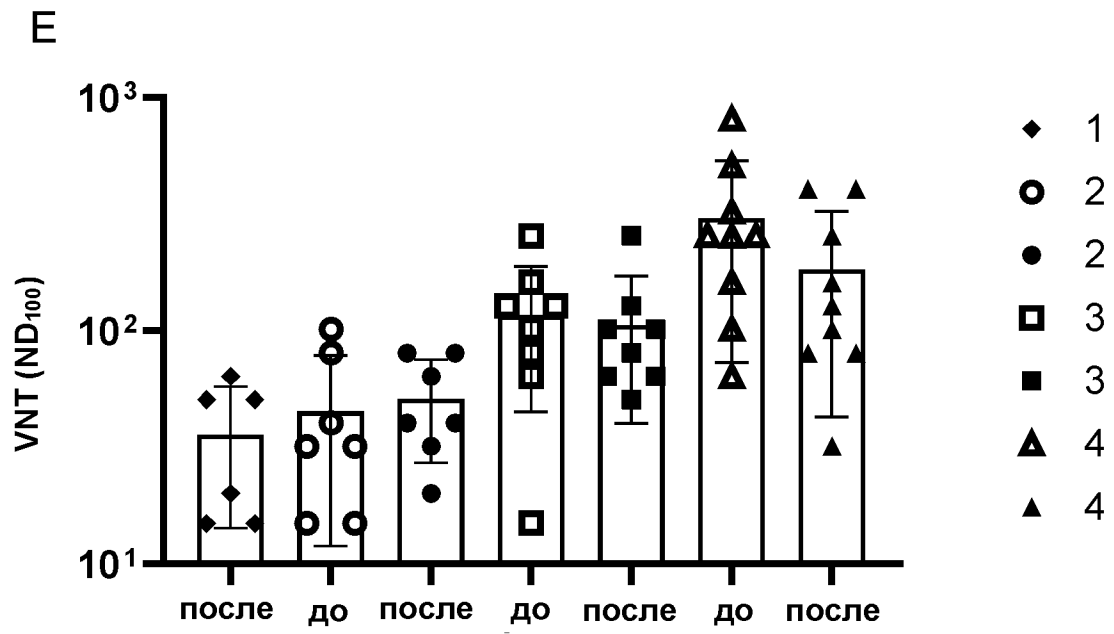


ФИГ. 15





ФИГ. 15 (продолжение)



ФИГ. 15 (продолжение)