

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491100** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.09.20

(22) Дата подачи заявки
2022.11.23

(51) Int. Cl. *C07K 14/04* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/25 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)

(54) **ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ И
ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/283,047**

(32) **2021.11.24**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/050859**

(87) **WO 2023/096963 2023.06.01**

(71) Заявитель:

**ФЛЭГШИП ПИОНИРИНГ
ИННОВЭЙШНЗ VI, ЛЛС (US)**

(72) Изобретатель:

**Нельсон Дженнифер А., Картер Эрик
Пол, Мелфи Майкл Донато (US)**

(74) Представитель:

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) В настоящем изобретении представлены композиции, фармацевтические препараты и способы, относящиеся к кольцевым полирибонуклеотидам, кодирующим экспрессию иммуногенов вируса ветряной оспы.

A1

202491100

202491100

A1

ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Предпосылки изобретения

Вирус ветряной оспы (VZV) представляет собой вирус, который принадлежит к семейству α -герпесвирусов. VZV присутствует повсеместно и является высокоинфекционным. Первичная инфекция приводит к острой ветряной оспе, также называемой "ветрянкой". После первоначальной инфекции VZV устанавливает пожизненную латентность в черепных нервах и ганглиях дорсальных корешков и может реактивироваться спустя годы или десятилетия в виде опоясывающего герпеса (HZ), называемого "опоясывающим лишаем". VZV также может вызывать ряд неврологических состояний, варьирующихся от асептического менингита до энцефалита. Другие серьезные осложнения инфекции VZV включают постгерпетическую невралгию, менингит Моллара, множественный опоясывающий лишай, тромбоцитопению, миокардит, артрит и воспаление артерий в головном мозге, приводящее к инсульту, миелиту, офтальмогерпесу и опоясывающему лишаю без сыпи. Существует потребность в вакцинах и терапевтических средствах, которые активны против вируса ветряной оспы.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлены композиции, фармацевтические препараты и способы, относящиеся к кольцевым полирибонуклеотидам, кодирующим один или несколько иммуногенов VZV. В настоящем изобретении также представлены способы применения кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих один или несколько иммуногенов VZV. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут индуцировать иммунный ответ у субъекта при введении. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта (например, ветрянки или опоясывающего лишая).

В первом аспекте в настоящем изобретении представлен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный иммуноген вируса ветряной оспы (VZV).

В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой гликопротеин VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления гликопротеин VZV выбран из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV или их иммуногенного фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления гликопротеин VZV представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления гликопротеин VZV представляет собой мутационный вариант gE VZV или его иммуногенный фрагмент, содержащий не более 10 аминокислотных замен, делеций или вставок относительно gE VZV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует якорный домен (домен для удерживания в ER). В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует карбоксиконцевой хвостовой домен. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-524, 1-546, 1-561, 1-573 или 1-623 gE VZV. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-573 gE VZV и мутацию Y569A. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-623 gE VZV и мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% аминокислот из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой вариант аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, точечных мутаций, делеций или вставок).

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, и при этом полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность,

характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, и при этом полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% аминокислот из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой вариант аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, точечных мутаций, делеций или вставок).

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления немедленно-ранний белок VZV представляет собой полипептид IE63. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется

последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, представляет собой фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 39-47. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, представляет собой фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% любой из SEQ ID NO: 39-47.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием GC, составляющим по меньшей мере 51% (например, по меньшей мере 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% или 60%). В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет не более 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, или 59%, или 60%. В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет от 51% до 60%, от 52% до 60%, от 53% до 60%, от 54% до 60%, от 55% до 60%, от 52% до 58%, от 53% до 58%. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием GC от 51% до 60%.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием уридина, составляющим более 20%. В некоторых вариантах осуществления содержание уридина в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет более 10% (например, более 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% или 25%). В некоторых вариантах осуществления содержание уридина в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет не более 30% (например, не более 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21% или 20%). В некоторых вариантах осуществления содержание уридина в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет от 20% до 28%, от 21% до 26%, от 10% до 24%, от 15% до 24%, от 20% до 24%, от 21% до 24%, от 22% до 24%, от

23% до 24%, от 10% до 23%, от 15% до 23%, от 20% до 23%, от 21% до 23% или от 22% до 23%. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием уридина, составляющим от 20% до 28%.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV дополнительно содержит последовательность, кодирующую домен мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации выбран из домена сборки T4, домена ферритина, β -кольцеобразного пептида, пептида AaLS или домена люмазинсинтазы. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации находится на N-конце полипептидного иммуногена VZV. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации находится на C-конце полипептидного иммуногена VZV.

В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, функционально связана с IRES.

В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, кодирует второй полипептид. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV и второй полипептид разделены полипептидным линкером, саморасщепляющимся пептидом 2A, сайтом расщепления протеазой или саморасщепляющимся пептидом 2A в тандеме с сайтом расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления фурином. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит вторую открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептид, функционально связанный со вторым IRES.

В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген VZV. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой гликопротеин VZV, выбранный из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV, немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой IE63 VZV или его иммуногенный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой полипептидный адьювант. В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет

собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления стимулятор врожденной иммунной системы выбран из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания кодирует конкатемерный иммуноген VZV. В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания содержит 2-100 иммуногенов VZV, соединенных непосредственно друг с другом или перемежающихся линкерами. В других вариантах осуществления иммуноген представляет собой конкатемерный пептидный иммуноген, состоящий из множества пептидных эпитопов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует 2-10 иммуногенов VZV. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 иммуногенов VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуногены VZV разделены полипептидным линкером, саморасщепляющимся пептидом 2A, сайтом расщепления протеазой или саморасщепляющимся пептидом 2A в тандеме с сайтом расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления фурином.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлена иммуногенная композиция, содержащая любой кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит второй кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептидный иммуноген. В некоторых вариантах осуществления второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный адъювант. В некоторых вариантах осуществления второй кольцевой полирибонуклеотид содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ индуцирования у субъекта иммунного ответа против VZV, при этом способ включает введение субъекту

кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ предупреждения у субъекта инфекции VZV, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения субъекта, у которого имеется инфекция VZV или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта ранее была диагностирована инфекция VZV или нарушение, ассоциированное с инфекцией VZV. В некоторых вариантах осуществления инфекция VZV является бессимптомной, или инфекция VZV является неактивной. В некоторых вариантах осуществления у субъекта был диагностирован опоясывающий лишай. В некоторых вариантах осуществления введение кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции обеспечивает снижение частоты или тяжести симптомов, ассоциированных с опоясывающим лишаем. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта-человека.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту адъюванта. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту полипептидного иммуногена VZV.

Определения

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

Используемый в данном документе термин "адаптивный иммунный ответ" означает либо гуморальный, либо клеточноопосредованный иммунный ответ. Для целей настоящего изобретения "гуморальный иммунный ответ" относится к иммунному ответу, опосредованному молекулами антител, тогда как "клеточный иммунный ответ" представляет собой ответ, опосредованный Т-лимфоцитами и/или другими лейкоцитами.

Используемый в данном документе термин "адъювант" относится к композиции (например, на основе соединения, полипептида, нуклеиновой кислоты или липида), которая повышает иммунный ответ, например, повышает специфический иммунный ответ на иммуноген. Повышение иммунного ответа предусматривает усиление или расширение

специфичности любого из иммунного ответа с образованием антител и клеточного иммунного ответа или как первого, так и второго.

Используемый в данном документе термин "носитель" означает соединение, композицию, реагент или молекулу, которые облегчают транспортировку или доставку композиции (например, полирибонуклеотида) в организм субъекта, ткань или клетку. Неограничивающие примеры носителей включают углеводные носители (например, ангидрид-модифицированный фитогликоген или материал типа гликогена), наночастицы (например, наночастицу, которая инкапсулирует кольцевой полирибонуклеотид или ковалентно соединена, связывается с кольцевым полирибонуклеотидом), липосомы, фюзосомы, дифференцированные *ex vivo* ретикулоциты, экзосомы, белковые носители (например, белок, ковалентно связанный с полирибонуклеотидом) или катионные носители (например, катионный липополимер или реагент для трансфекции).

Используемые в данном документе термины "circRNA", "кольцевой полирибонуклеотид", "кольцевая РНК" и "молекула кольцевого полирибонуклеотида" применяются взаимозаменяемо и означают молекулу полирибонуклеотида, которая характеризуется структурой без свободных концов (т. е. без свободных 3'- и/или 5'-концов), например, молекулу полирибонуклеотида, которая образует кольцевую или замкнутую структуру посредством ковалентных (например, ковалентно замкнутых) или нековалентных связей. Кольцевой полирибонуклеотид может представлять собой ковалентно замкнутый полирибонуклеотид.

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

Термин "разбавитель" означает среду-носитель, содержащую неактивный растворитель, в которой композиция, описанная в данном документе (например, композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид), может быть разбавлена или растворена. Разбавитель может представлять собой средство для сольбилизации РНК, буфер, изотоническое средство или их смесь. Разбавитель может представлять собой жидкий разбавитель или твердый разбавитель. Неограничивающие примеры жидких разбавителей включают воду или другие растворители, сольбилизирующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, масло из семян хлопчатника, арахисовое масло, кукурузное масло, масло из зародышей пшеницы, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и

сорбитановые сложные эфиры жирных кислот и 1,3-бутандиол. Неограничивающие примеры твердых разбавителей включают карбонат кальция, карбонат натрия, фосфат кальция, дикальцийфосфат, сульфат кальция, гидрофосфат кальция, фосфат натрия, лактозу, сахарозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, сорбит, инозит, хлорид натрия, сухой крахмал, кукурузный крахмал или сахарную пудру.

Каждый из используемых в данном документе терминов "заболевание", "нарушение" и "состояние" относятся к субоптимальному состоянию здоровья, например, состоянию, которое, как правило, диагностируется или лечится или диагностировалось бы или лечилось бы медицинским работником.

Используемый в данном документе термин "эпитоп" относится к части или всему иммуногену, который распознается антителом или Т-клеточным рецептором, на который нацелены антитело или Т-клеточный рецептор или который связывается с антителом или Т-клеточным рецептором. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, например, непрерывную последовательность нуклеиновых кислот или аминокислот. Эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, например, эпитоп, который содержит аминокислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации белка.

Конформационный эпитоп может содержать несмежные аминокислоты из первичной аминокислотной последовательности. В качестве другого примера конформационный эпитоп включает нуклеиновые кислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации иммуногенной последовательности на основе ее вторичной или третичной структуры.

Используемый в данном документе термин "экспрессионная последовательность" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует продукт, например, пептид или полипептид (например, иммуноген), или регуляторную нуклеиновую кислоту. Иллюстративная экспрессионная последовательность, которая кодирует пептид или полипептид, может содержать множество нуклеотидных триад, каждая из которых может кодировать аминокислоту и называется "кодоном".

Используемый в данном документе термин "фрагмент" в отношении полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты, например, полипептидного иммуногена или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидный иммуноген, относится к непрерывной, менее чем целой части последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты. Фрагмент полипептидного иммуногена или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидный иммуноген, например, относится к непрерывной, менее чем целой доле (например, по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% от всей длины) последовательности, такой как

последовательность, раскрытая в данном документе. Следует понимать, что все настоящее изобретение предусматривает фрагменты (например, иммуногенные фрагменты) всех иммуногенов, раскрытых в данном документе.

Используемый в данном документе термин "содержание GC" относится к процентному содержанию гуанина (G) и цитозина (C) в последовательности нуклеиновой кислоты. Формула для расчета содержания GC представляет собой $(G + C) / (A + G + C + U) \times 100\%$ (для РНК) или $(G + C) / (A + G + C + T) \times 100\%$ (для ДНК). Аналогичным образом, термин "содержание уридина" относится к процентному содержанию уридина (U) в последовательности нуклеиновой кислоты. Формула для расчета содержания уридина представляет собой $U / (A + G + C + U) \times 100\%$. Аналогичным образом, термин "содержание тимидина" относится к процентному содержанию тимидина (T) в последовательности нуклеиновой кислоты. Формула для расчета содержания тимидина представляет собой $T / (A + G + C + T) \times 100\%$.

Используемый в данном документе термин "стимулятор врожденной иммунной системы" относится к веществу, которое индуцирует врожденный иммунологический ответ, частично путем индуцирования экспрессии одного или нескольких генов, участвующих во врожденном иммунитете, включая без ограничения интерферон типа I (например, $IFN\alpha$, $IFN\beta$ и/или $IFN\gamma$), провоспалительный цитокин (например, IL-1, IL-12, IL-18, $TNF-\alpha$ и/или GM-CSF), индуцируемый ретиноевой кислотой ген-I (RIG-I, также известный как DDX58), ген 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5, также известный как IFIH1), 2'-5'-олигоденилатсинтазу 1 (OAS 1), OAS-подобный белок (OASL) и/или протеинкиназу R (PKR). Стимулятор врожденной иммунной системы может действовать как адъювант, например, при введении в комбинации с рибонуклеотидом, который кодирует иммуноген, или при составлении с ним. Стимулятор врожденной иммунной системы может представлять собой отдельный молекулярный объект (например, не кодируемый полирибонуклеотидом или не включенный в его последовательность), например, STING (например, $saSTING$), TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1 или их конститутивно активный мутантный вариант. Стимулятор врожденной иммунной системы может кодироваться (например, экспрессироваться с) полирибонуклеотидом. Полирибонуклеотид может в качестве альтернативы или дополнительно предусматривать рибонуклеотидную последовательность, которая действует как стимулятор врожденной иммунной системы (например, GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер).

Используемый в данном документе термин "примесь" представляет собой нежелательное вещество, присутствующее в композиции, например, фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой технологическую примесь. В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой родственное продукту вещество, отличное от необходимого продукта в конечной композиции, например, отличное от активного ингредиента лекарственного средства, например, кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Используемый в данном документе термин "технологическая примесь" означает вещество, применяемое, присутствующее или образующееся при изготовлении композиции, препарата или продукта, которое является нежелательным в конечной композиции, препарате или продукте, отличающееся от линейных полирибонуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления технологическая примесь представляет собой фермент, применяемый в синтезе или циркуляризации полирибонуклеотидов. Используемый в данном документе термин "родственное продукту вещество" представляет собой вещество или побочный продукт, образующийся во время синтеза для получения композиции, препарата или продукта или любого их промежуточного соединения. В некоторых вариантах осуществления родственное продукту вещество представляет собой дезоксирибонуклеотидные фрагменты. В некоторых вариантах осуществления родственное продукту вещество представляет собой дезоксирибонуклеотидные мономеры. В некоторых вариантах осуществления родственное продукту вещество представляет собой одно или несколько из производных или фрагментов полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, например, фрагментов из 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 рибонуклеиновых кислот, мономерных рибонуклеиновых кислот, димерных рибонуклеиновых кислот или тримерных рибонуклеиновых кислот.

Используемый в данном документе термин "иммуноген" относится к любой молекуле или молекулярной структуре, которая содержит один или несколько эпитопов, которые распознаются антителом или Т-клеточным рецептором, на которые нацелены антитело или Т-клеточный рецептор или которые связываются с антителом или Т-клеточным рецептором. В частности, иммуноген индуцирует иммунный ответ у субъекта (например, является иммуногенным, как определено в данном документе). Иммуноген способен индуцировать иммунный ответ у субъекта, где иммунный ответ относится к ряду молекулярных, клеточных и организменных событий, которые индуцируются, когда иммуноген сталкивается с иммунной системой. Иммунный ответ может представлять собой гуморальный и/или клеточный иммунный ответ. Они могут предусматривать

выработку антител и размножение В- и Т-клеток. Чтобы определить, возник ли иммунный ответ, и проследить его течение, у иммунизированного субъекта можно осуществлять мониторинг появления иммунных реагентов, направленных на специфический иммуноген. При иммунных ответах на большинство иммуногенов индуцируется продуцирование как специфических антител, так и специфических эффекторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуноген является чужеродным для хозяина. В некоторых вариантах осуществления иммуноген не является чужеродным для хозяина. Иммуноген может предусматривать весь полипептид, полисахарид, полинуклеотид или липид или часть такового. Иммуноген также может представлять собой смешанный полипептид, полисахарид, полинуклеотид и/или липид. Например, иммуноген может представлять собой полипептид, который был трансляционно модифицирован. "Полипептидный иммуноген" относится к иммуногену, который предусматривает полипептид. Полипептидный иммуноген может также предусматривать одну или несколько посттрансляционных модификаций, и/или может образовывать комплекс с одной или несколькими дополнительными молекулами, и/или может характеризоваться третичной или четвертичной структурой, каждая из которых может определять иммуногенность полипептида или влиять на таковую.

Используемый в данном документе термин "иммуногенный" относится к способности индуцировать ответ на вещество в конкретном анализе иммунного ответа выше предварительно определенного порога. Анализ может представлять собой, например, анализ экспрессии определенных маркеров воспаления, анализ выработки антител или анализ иммуногенности, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ может быть индуцирован, когда иммунная система организма или определенный тип иммунных клеток подвергаются воздействию иммуногена.

Иммуногенный ответ можно оценить, оценив количество антитела в плазме или сыворотке крови субъекта с применением анализа общих антител, подтверждающего теста, титрования и изотипирования антител и оценки нейтрализующих антител. При анализе общих антител измеряют содержание всех антител, образующихся как часть иммунного ответа в сыворотке или плазме крови субъекта, которому был введен иммуноген. Наиболее часто применяемым тестом для выявления антител является ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), с помощью которого выявляют антитела в тестируемой сыворотке крови, которые связываются с антителом, представляющим интерес, включая IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Иммуногенный ответ можно дополнительно оценить с помощью подтверждающего анализа. После оценки общих антител можно

применять подтверждающий анализ для подтверждения результатов анализа общих антител. Конкурентный анализ можно применять для подтверждения того, что антитело специфически связывается с мишенью, и что положительный результат скринингового анализа не является результатом неспецифического взаимодействия тестируемой сыворотки крови или реагента для выявления с другими материалами в анализе.

Иммуногенный ответ можно оценить посредством изотипирования и титрования. Анализ для изотипирования можно применять только для оценки соответствующих изотипов антител. Например, ожидаемые изотипы могут представлять собой IgM и IgG, которые можно специфически выявить и количественно определить посредством изотипирования и титрования и затем сравнить с общим количеством присутствующих антител.

Иммуногенный ответ можно оценить с помощью анализа нейтрализующих антител (nAb). Анализ нейтрализующих антител (nAb) можно применять для определения того, нейтрализуют ли антитела, вырабатываемые в ответ на иммуноген, иммуноген, тем самым подавляя влияние иммуногена на мишень и приводя к аномальным фармакокинетическим характеристикам. Анализ nAb часто представляет собой клеточный анализ, при котором клетки-мишени инкубируют с антителом. Могут быть применены различные клеточные анализы nAb, включая без ограничения анализ клеточной пролиферации, жизнеспособности, антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), ингибирования цитопатического эффекта (CPE), апоптоза, лигандстимулированной передачи клеточного сигнала, ферментативной активности, анализ с использованием репортерных генов, анализ секреции белка, метаболической активности, стресса и митохондриальной функции. Показатели выявления предусматривают поглощение, флуоресценцию, люминесценцию, хемилюминесценцию или проточную цитометрию. Анализ связывания лиганда также можно применять для измерения аффинности связывания иммуногена и антитела *in vitro* для оценки эффективности нейтрализации.

Дополнительно индукция клеточного иммунного ответа может быть оценена с помощью измерения активации Т-клеток у субъекта с применением клеточных маркеров на Т-клетках, полученных от субъекта. Образец крови, биоптат лимфатического узла или образец ткани может быть собран у субъекта, и Т-клетки из образца могут быть оценены на наличие одного или нескольких (например, 2, 3, 4 или больше) маркеров активации: CD25, CD71, CD26, CD27, CD28, CD30, CD154, CD40L, CD134, CD69, CD62L или CD44. Активация Т-клеток также может быть оценена с применением тех же способов в модели на животных *in vivo*. Этот анализ также может быть выполнен посредством добавления

иммуногена к Т-клеткам *in vitro* (например, Т-клеткам, полученным от субъекта, модели на животном, репозитория или коммерческого источника) и измерения уровня вышеупомянутых маркеров для оценки активации Т-клеток. Аналогичные подходы можно применять для оценки влияния активации и на активацию других иммунных клеток, таких как эозинофилы (маркеры: CD35, CD11b, CD66, CD69 и CD81), дендритные клетки (маркеры: IL-8, МНС класса II, CD40, CD80, CD83 и CD86), базофилы (CD63, CD13, CD4 и CD203c) и нейтрофилы (CD11b, CD35, CD66b и CD63). Эти маркеры можно оценить с применением проточной цитометрии, иммуногистохимического анализа, гибридизации *in situ* и других анализов, которые позволяют измерять уровень клеточных маркеров. Сравнение результатов до и после введения иммуногена можно применять для определения его эффекта.

Используемый в данном документе термин "индуцирование иммунного ответа" относится к инициации, усилению или поддержанию иммунного ответа у субъекта. Индуцирование иммунного ответа может относиться к адаптивному иммунному ответу или врожденному иммунному ответу. Индукция иммунного ответа может быть измерена, как обсуждалось выше.

Используемый в данном документе термин "линейный аналог" означает молекулу полирибонуклеотида (и ее фрагменты), характеризующуюся нуклеотидной последовательностью, являющейся такой же, что и у кольцевого полирибонуклеотида, или сходной с таковой (например, характеризующейся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение), и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованная версия (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент (например, версия, предшествующая циркуляризованной версии) представляет собой молекулу полирибонуклеотида (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же или сходной нуклеотидной последовательностью (например, характеризующуюся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) и наличием таких же или сходных модификаций нуклеиновой кислоты, что и кольцевой полирибонуклеотид, и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованную версию (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент представляет собой молекулу полирибонуклеотида (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же нуклеотидной последовательностью, что и кольцевой полирибонуклеотид, или сходной с ним нуклеотидной последовательностью

(например, характеризующейся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) и наличием модификаций нуклеиновой кислоты, отличающихся от таковых в кольцевом полирибонуклеотиде, или их отсутствием и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованная версия (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления фрагмент молекулы полирибонуклеотида, которая является линейным эквивалентом, представляет собой любую часть линейного эквивалента молекулы полирибонуклеотида, которая является более короткой, чем линейный эквивалент молекулы полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 5'-кэп. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит полиаденозиновый хвост. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 5'-UTR.

Используемые в данном документе термины "линейная РНК", "линейный полирибонуклеотид" и "молекула линейного полирибонуклеотида" используются взаимозаменяемо и означают молекулу полирибонуклеотида, характеризующуюся наличием 5'- и 3'-конца. Один или оба из 5'- и 3'-концов могут представлять собой свободные концы или могут быть соединены с другим компонентом. Линейная РНК предусматривает РНК, которая не подверглась циркуляризации (например, предшествующая циркуляризованной) и может применяться в качестве исходного материала для циркуляризации посредством, например, лигирования с помощью шунта или способов циркуляризации, катализируемых химически, ферментативно, с использованием рибозимов или сплайсинга.

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

Используемый в данном документе термин "доставки в "голом" виде" означает состав для доставки в клетку без помощи носителя и без ковалентной модификации компонента, который способствует доставке в клетку. Состав для доставки в "голом" виде не содержит каких-либо реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. Например, состав на основе кольцевого полирибонуклеотида для доставки в "голом" виде представляет собой состав, который содержит кольцевой полирибонуклеотид без ковалентной модификации и не содержит носителя.

Используемые в данном документе термины "РНК с односторонним разрывом", "линейный полирибонуклеотид с односторонним разрывом" и "молекула линейного полирибонуклеотида с односторонним разрывом" применяются взаимозаменяемо и означают молекулу полирибонуклеотида, характеризующуюся наличием 5'- и 3'-конца, которые образуются в результате образования одностороннего разрыва или разрушения кольцевой РНК.

Используемый в данном документе термин "некольцевая РНК" означает РНК с полным разрывом и линейную РНК.

Термин "фармацевтическая композиция" предназначен также для раскрытия того, что кольцевой полирибонуклеотид, содержащийся в фармацевтической композиции, может быть использован для лечения организма человека или животного путем терапии. Таким образом, предполагается, что он эквивалентен термину "кольцевой полирибонуклеотид для применения в терапии".

Используемый в данном документе термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую одну или несколько субъединиц нуклеиновой кислоты или нуклеотидов, и может использоваться взаимозаменяемо с "нуклеиновой кислотой" или "олигонуклеотидом". Полинуклеотид может включать один или несколько нуклеотидов, выбранных из аденозина (A), цитозина (C), гуанина (G), тимина (T) и урацила (U) или их вариантов. Нуклеотид может включать нуклеозид и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше фосфатных (PO₃) групп. Нуклеотид может включать азотистое основание, пятиуглеродный сахар (либо рибозу, либо дезоксирибозу) и одну или несколько фосфатных групп. Рибонуклеотиды представляют собой нуклеотиды, в которых сахаром является рибоза. Полирибонуклеотиды, или рибонуклеиновые кислоты, или РНК могут относиться к макромолекулам, которые содержат несколько рибонуклеотидов, полимеризующихся посредством фосфодиэфирных связей. Дезоксирибонуклеотиды представляют собой нуклеотиды, в которых сахаром является дезоксирибоза.

"Полидезоксирибонуклеотиды", "дезоксирибонуклеиновые кислоты" и "ДНК" означают макромолекулы, которые содержат несколько дезоксирибонуклеотидов, которые полимеризуются посредством фосфодиэфирных связей. Нуклеотид может представлять собой нуклеозидмонофосфат или нуклеозидполифосфат. Нуклеотид означает дезоксирибонуклеозидполифосфат, такой как, например, дезоксирибонуклеозидтрифосфат (dNTP), который может быть выбран из дезоксиаденозинтрифосфата (dATP), дезоксицитидинтрифосфата (dCTP), дезоксигуанозинтрифосфата (dGTP), уридинтрифосфата (dUTP) и дезокситимидинтрифосфата (dTTP), dNTP, которые содержат выявляемые метки, такие

как люминесцентные метки или маркеры (например, флуорофоры). Нуклеотид может содержать любую субъединицу, которая может быть включена в растущую нить нуклеиновой кислоты. Такая субъединица может представлять собой А, С, G, Т или U или любую другую субъединицу, которая является специфичной для одного или нескольких комплементарных А, С, G, Т или U, или комплементарной пурины (т. е. А или G, или их вариант) или пиримидину (т. е. С, Т или U, или их вариант). В некоторых примерах полинуклеотид представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), рибонуклеиновую кислоту (РНК) или их производные или варианты. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой, среди прочего, короткую интерферирующую РНК (siRNA), микроРНК (miRNA), плазмидную ДНК (pDNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), малую ядерную РНК (snRNA), матричную РНК (mRNA), предшественник mRNA (pre-mRNA), антисмысловую РНК (asRNA) и охватывает как нуклеотидную последовательность, так и любые ее структурные варианты осуществления, такие как однонитевая, двухнитевая, трехнитевая, спиральная, шпилечная и т. п. В некоторых случаях молекула полинуклеотида является кольцевой. Полинуклеотид может характеризоваться различной длиной. Молекула нуклеиновой кислоты может характеризоваться длиной по меньшей мере приблизительно 10 оснований, 20 оснований, 30 оснований, 40 оснований, 50 оснований, 100 оснований, 200 оснований, 300 оснований, 400 оснований, 500 оснований, 1 тысячу оснований (т. о.), 2 т. о., 3 т. о., 4 т. о., 5 т. о., 10 т. о., 50 т. о. или больше. Полинуклеотид можно выделить из клетки или ткани. Как представлено в варианте осуществления в данном документе, полинуклеотидные последовательности могут предусматривать выделенные и очищенные молекулы ДНК/РНК, синтетические молекулы ДНК/РНК и синтетические аналоги ДНК/РНК.

Полинуклеотиды, например, полирибонуклеотиды или полидезоксирибонуклеотиды, могут предусматривать один или несколько вариантов нуклеотидов, включая нестандартный(-е) нуклеотид(-ы), неприродный(-е) нуклеотид(-ы), аналог(-и) нуклеотида и/или модифицированные нуклеотиды. Примеры модифицированных нуклеотидов включают без ограничения диаминопурин, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксихидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурidin, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюнозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-D46-изопентениладенин,

урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеузозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый сложный эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксивпропил)урацил, (аср3)w, 2,6-диаминопурин и т. п. В некоторых случаях нуклеотиды могут предусматривать модификации в их фосфатных компонентах, включая модификации трифосфатного компонента.

Неограничивающие примеры таких модификаций включают фосфатные цепи большей длины (например, фосфатную цепь, содержащую 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше фосфатных компонентов) и модификации с использованием тиольных компонентов (например, альфа-тиотрифосфат и бета-тиотрифосфаты). Молекулы нуклеиновой кислоты также могут быть модифицированы по основному компоненту (например, по одному или нескольким атомам, которые, как правило, доступны для образования водородной связи с комплементарным нуклеотидом, и/или по одному или нескольким атомам, которые, как правило, не способны образовывать водородную связь с комплементарным нуклеотидом), сахарному компоненту или фосфатному остову. Молекулы нуклеиновой кислоты могут также содержать модифицированные аминот группы, такие как аминоксилаллил-1-dUTP (aa-dUTP) и аминоксиллакриламид-dCTP (aha-dCTP) для обеспечения возможности ковалентного присоединения компонентов, способных вступать в реакцию с аминами, таких как сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды (NHS). Альтернативы стандартным парам оснований ДНК или парам оснований РНК в олигонуклеотидах по настоящему изобретению могут обеспечить более высокую плотность в битах на кубический мм, более высокую безопасность (устойчивость к случайному или целенаправленному синтезу природных токсинов), более легкое распознавание для фотопрограммируемых полимераз или более простую вторичную структуру. Такие альтернативные пары оснований, совместимые с природными и мутантными полимеразами для синтеза *de novo* и/или амплификации, описаны в работе Betz K, Malyshev DA, Lavergne T, Welte W, Diederichs K, Dwyer TJ, Ordoukhanian P, Romesberg FE, Marx A. *Nat. Chem. Biol.* 2012 Jul;8(7):612-4, которая включена в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Используемый в данном документе термин "полипептид" означает полимер из аминокислотных остатков (природных или неприродных), соединенных друг с другом чаще всего пептидными связями. Используемый в данном документе термин относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды могут включать генные продукты, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного. Полипептид может представлять

собой одну молекулу или может представлять собой многомолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут включать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды, такие как антитела или инсулин, и могут быть ассоциированы или соединены. Чаще всего дисульфидные связи встречаются в многоцепочечных полипептидах. Термин полипептид может также применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты.

Используемый в данном документе термин "предупреждать" означает снижение вероятности развития заболевания, нарушения или состояния или, в качестве альтернативы, снижение тяжести или частоты симптомов заболевания или нарушения, развивающегося впоследствии. Терапевтическое средство можно вводить субъекту, который подвержен повышенному риску развития заболевания или нарушения по сравнению с представителем общей популяции, для предупреждения развития или уменьшения тяжести заболевания или состояния. Терапевтическое средство можно вводить в качестве профилактического средства, например, до развития любого симптома или проявления заболевания или нарушения.

Применяемые взаимозаменяемо в данном документе термины "поли(А)" и "последовательность поли(А)" относятся к нетранслируемой, непрерывной области молекулы нуклеиновой кислоты, длина которой составляет по меньшей мере 5 нуклеотидов, и которая состоит из остатков аденозина. В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(А) составляет по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(А) расположена в направлении 3' по отношению к (например, ниже) открытой рамке считывания (например, открытой рамке считывания, кодирующей полипептид), и последовательность поли(А) расположена в направлении 3' по отношению к терминирующему элементу (например, стоп-кодону) так, что поли(А) не подвергается трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(А) расположена в направлении 3' по отношению к терминирующему элементу и 3'-нетранслируемой области.

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

Используемый в данном документе термин "репликативный элемент" означает последовательность и/или мотив, которые являются применимыми для репликации или которые инициируют транскрипцию кольцевого полирибонуклеотида.

Используемые в данном документе термины "системная доставка" и "системное введение" означают путь введения фармацевтических композиций или других веществ в систему кровообращения (например, в кровь или лимфатическую систему). Системное введение может включать пероральное введение, парентеральное введение, интраназальное введение, подъязычное введение, ректальное введение, чрескожное введение или любые их комбинации. Используемый в данном документе термин "несистемная доставка" или "несистемное введение" может относиться к любым другим путям введения, за исключением системной доставки фармацевтических композиций или других веществ, например, доставляемые вещества не попадают в системы кровообращения (например, в кровь и в лимфатическую систему) организма субъекта.

Используемый в данном документе термин "идентичность последовательностей" определяется с помощью выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с применением алгоритма глобального или локального выравнивания. Затем последовательности могут называться "по сути идентичными" или "по сути сходными", если они (при оптимальном выравнивании, например, программами GAP или BESTFIT с применением параметров по умолчанию) характеризуются по меньшей мере определенным минимальным процентом идентичности последовательностей. В программе GAP используется алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей их длине, максимизирующий число совпадений и минимизирующий число гэпов. Как правило, используются параметры по умолчанию для программы GAP, где штраф за открытие гэпа = 50 (нуклеотиды) / 8 (белки), и штраф за продолжение гэпа = 3 (нуклеотиды) / 2 (белки). Для нуклеотидов используемая матрица замен по умолчанию представляет собой матрицу замен `nwsgapdna.cmp`, и для белков матрица замен по умолчанию представляет собой `Blosum62` (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивания последовательностей и количество баллов для процентного значения идентичности последовательностей можно определять с применением компьютерных программ, таких как GCG Wisconsin Package версии 10.3, доступная от Accelrys Inc., 9685 Скрэнтон Роуд, Сан-Диего, штат Калифорния, 92121-3752, США, или EmbossWin версии 2.10.0 (с применением программы "needle"). В качестве альтернативы или дополнительно процент идентичности можно определить посредством поиска в базах данных с применением таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т. д. Идентичность

последовательностей относится к идентичности последовательностей по всей длине последовательности.

"Сигнальная последовательность" относится к полипептидной последовательности, например, длиной от 10 до 45 аминокислот, которая присутствует на N-конце полипептидной последовательности растущего белка, который направляет полипептидную последовательность на секреторный путь.

Используемые в данном документе термины "лечить" и "осуществление лечения" относятся к терапевтическому лечению заболевания или нарушения (например, инфекционного заболевания, рака, токсичности или аллергической реакции) у субъекта. Эффект лечения может включать реверсирование, облегчение, снижение тяжести, излечение, ингибирование прогрессирования, снижение вероятности рецидива заболевания или одного или нескольких симптомов или проявлений заболевания или нарушения, стабилизацию (т. е. обеспечение отсутствия ухудшения) состояния заболевания или нарушения и/или предупреждения распространения заболевания или нарушения по сравнению с состоянием и/или состоянием заболевания или нарушения при отсутствии терапевтического лечения.

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

Используемый в данном документе термин "общие молекулы рибонуклеотидов" означает общее количество любых молекул рибонуклеотидов, включая молекулы линейных полирибонуклеотидов, молекулы кольцевых полирибонуклеотидов, мономерные рибонуклеотиды, другие молекулы полирибонуклеотидов, их фрагменты и их модифицированные варианты, согласно измерению общей массы молекул рибонуклеотидов.

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

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

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена схема иллюстративной кольцевой РНК, которая содержит две экспрессионные последовательности, каждая экспрессионная последовательность функционально связана с IRES, и при этом по меньшей мере одна экспрессионная последовательность представляет собой иммуноген VZV.

На фиг. 2 представлена схема иллюстративной кольцевой РНК, которая содержит две экспрессионные последовательности, разделенные доменом расщепления (например, 2A, сайтом фурина или фурином-2A), где по меньшей мере одна экспрессионная последовательность представляет собой иммуноген VZV, и все они функционально связаны с IRES.

На фиг. 3 показана схема кольцевой РНК, которая содержит ORF, которая кодирует иммуноген VZV, и полинуклеотидную адьювантную последовательность (например, некодирующую нуклеотидную последовательность, которая стимулирует врожденную иммунную систему).

На фиг. 4 показана схема множества кольцевых РНК, где первая кольцевая РНК содержит ORF, кодирующую иммуноген VZV, а вторая кольцевая РНК содержит ORF, кодирующую либо второй иммуноген, либо полипептидный адьювант.

На фиг. 5 представлена схема иллюстративных полирибонуклеотидных конструкций, кодирующих иммуноген (например, иммуноген VZV) и один или несколько доменов мультимеризации и иллюстративных соответствующих иммуногенных комплексов.

На фиг. 6 показана экспрессия секретируемого gE из клеток HEK293T через 18 часов после трансфекции кольцевой РНК, кодирующей gE VZV.

На фиг. 7 показана экспрессия gE, выявленная на клеточной поверхности клеток HEK293T, которые трансфицировали одной из четырех различных кольцевых РНК, каждая из которых содержит отличающуюся нуклеотидную последовательность трансмембранного gE VZV.

На фиг. 8 показана экспрессия gE, выявленная на клеточной поверхности клеток HEK293T, которые трансфицировали различными кольцевыми РНК, кодирующими трансмембранный gE VZV, каждая из которых содержит отличающийся элемент IRES.

На фиг. 9 показана концентрация gE, измеренная в крови мышей через 6 часов, 2 дня или 5 дней после введения начальной дозы (праймирующей дозы) кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE VZV, или PBS.

На фиг. 10 показаны уровни антител к gE в сыворотке крови, измеренные в образцах крови, собранных у мышей через 14, 35 и 42 дня после введения начальной дозы (праймирующей дозы) кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE VZV, трансмембранный gE VZV, или PBS.

На фиг. 11 показано, что gE-специфические Т-клетки получали в спленоцитах, стимулированных пулами gE VZV, для секретируемого и трансмембранного gE через 42 дня после введения начальной дозы (праймирующей дозы) кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE VZV, трансмембранный gE VZV, или PBS.

На фиг. 12А и фиг. 12В показан процент клеток, которые были положительными по CD8 и IFN- γ (фиг. 12А) или положительными по CD4 и IFN- γ (фиг. 12В) через 42 дня после введения начальной дозы (праймирующей дозы) кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE VZV, трансмембранный gE VZV, или PBS.

Подробное описание

В настоящем изобретении представлены композиции, фармацевтические препараты и способы, относящиеся к кольцевым полирибонуклеотидам, кодирующим один или несколько иммуногенов VZV. В настоящем изобретении также представлены способы применения кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих один или несколько иммуногенов VZV. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут индуцировать иммунный ответ у субъекта при введении. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта (например, ветрянки или опоясывающего лишая).

Иммуногены VZV

Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере одну экспрессионную последовательность, кодирующую иммуноген VZV. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать несколько экспрессионных последовательностей, где по меньшей мере одна экспрессионная последовательность кодирует иммуноген VZV. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать две или более (две, три, четыре, пять, шесть или более) экспрессионных последовательностей, где каждая экспрессионная последовательность кодирует иммуноген VZV. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать первую экспрессионную последовательность, которая кодирует иммуноген VZV, и вторую экспрессионную последовательность, которая кодирует адъювант. Кольцевые

полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать экспрессионную последовательность, которая кодирует иммуноген VZV, и некодирующую последовательность, которая стимулирует врожденную иммунную систему.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой гликопротеин VZV. Например, гликопротеин VZV может представлять собой gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN или gM VZV или его иммуногенный фрагмент или эпитоп. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gE VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gI VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gB VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gH VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gK VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gL VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gC VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gN VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gM VZV.

В некоторых вариантах осуществления гликопротеин VZV представляет собой полипептид gE или вариант полипептида gE. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует якорный домен (домен для удерживания в ER). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует карбоксиконцевой хвостовой домен. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV содержит по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких мотивах, ассоциированных с удерживанием в ER, при этом мутация(-и) в одном или нескольких мотивах приводит(-ят) к снижению удерживания полипептида gE VZV в ER и/или аппарате Гольджи. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV содержит по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких мотивах, ассоциированных с нацеливанием gE на аппарат Гольджи или сеть транс-Гольджи (TGN), при этом мутация(-и) в одном или нескольких мотивах приводит(-ят) к снижению нацеливания полипептида gE VZV на аппарат Гольджи или TGN или локализации в них. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV содержит по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких мотивах, ассоциированных с интернализацией gE VZV или эндоцитозом gE, при этом мутация(-и) в одном или нескольких мотивах приводит(-ят) к снижению эндоцитоза полипептида gE VZV.

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких фосфорилированных кислотных мотивах. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит мутацию Y582G. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит мутацию Y569A. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит мутацию Y582G и мутацию Y569A.

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-524, 1-546, 1-561, 1-573 или 1-623 gE VZV. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-524. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-546. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-561. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-573, необязательно содержащий мутацию Y569A. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-623, необязательно содержащий мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой полипептид gE или его вариант, выбранный из последовательности из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот из последовательности в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% аминокислот из последовательности в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой вариант последовательности в таблице 1, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, точечных мутаций, делеций или вставок).

Таблица 1. Иллюстративные иммуногены gE VZV

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
29	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRD DFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRG IDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENH PFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQH ICLKHTTCFQDVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRT EKQYLG VYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTR NPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLY HPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEH ADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDPES LSGLYVFV VYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEER GFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYAAWTGG LAAVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK
30	Гликопротеин E, 623 аминокислоты	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRD DFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRG IDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENH PFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQH ICLKHTTCFQDVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRT EKQYLG VYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTR NPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLY HPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEH ADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDPES LSGLYVFV VYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEER GFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGL

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		AAVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMY YAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVY IDKTR
31	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, мутация Y569A	MGTVNKPVVGVL MGFGIITGTLRITNPVRASVLR YD DFHIDEDKLD TNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRG IDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDR H KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENH PFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQH ICLKHTTCFQDVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRT EKQYLG VYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTR NPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDL LLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLY HPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNC EH ADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDPES LSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEER GFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGL AAVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMY YAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVY IDKTR
32	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, двойная мутация Y569A/Y582G	MGTVNKPVVGVL MGFGIITGTLRITNPVRASVLR YD DFHIDEDKLD TNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRG IDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDR H KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENH PFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQH ICLKHTTCFQDVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRT EKQYLG VYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTR NPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDL LLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLY

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		HPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCHEH ADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPEH LSGLYVFFVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFNVAIEER GFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGL AAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMY GAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVY IDKTR
33	Гликопротеин E, 546 аминокислот	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRD DFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLNAHEHHGVYNQGRG IDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENH PFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQH ICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRT EKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTR NPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLY HPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCHEH ADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPEH LSGLYVFFVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFNVAIEER GFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGL A
65	Гликопротеин E, 524 аминокислоты	MGVTAPRTLILLLSGALALTETWAGSRITNPVRASVL RYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGE SSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLNAHEHHGVYNQ GRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGD DRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVE ENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPA IQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRF QGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEK

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		TRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA MHLQYKIH EAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCL YHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCE HADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPE SLSGLYV FVVYFNHGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEE RGF PPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGG LA
66	Гликопротеин E, 524 аминокислоты	MGRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLD TNSVYEPYYH SDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYDGFL ENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLG DDTGIHV IPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLN PKPQGQRLIEVSVEENHPFTLR APIQRIYGVRYTETWS FLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAE NTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELE LDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLG VYIWNMRGSDGTST YATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNY HSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIH EAPFDLLEWLYVPI DPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPH LAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLIL HDGGTTLKFVDTPE SLSGLYV FVVYFNHGHVEAVAYT VVSTVDHFVNAIEE RGF PPTAGQPPATTKPKEITPVN PGTSP LIRYAAWTGGLA
67	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKP VVGVL MGFGIITG TLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLD TNSVYEPYYHS DHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYDGFL NAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGD DTGIHV IPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNP KPQGQRLIEVSVEENHPFTLR APIQRIYGVRYTETWSF LPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAE NTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELE LDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLG VYIWNMRGSDGTSTY ATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYH

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		SHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPID PTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHL AQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLIL HDGGTTLKFVDTPELSGLYVFFVYFNGHVEAVAYT VVSTVDHFVNIAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNP GTSPLLRYYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRV KAARVDK
68	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, мутация Y569A	MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVVGVLGMFGIITG TLRITNPVRASVRLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHS DHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWRNDYDGFLE NAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGD DTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNP KPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSF LPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDC AEN TKEDQLAEISYRFQKKEADQPWIVVNTSTLFDELEL DPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTY ATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYH SHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPID PTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHL AQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLIL HDGGTTLKFVDTPELSGLYVFFVYFNGHVEAVAYT VVSTVDHFVNIAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNP GTSPLIRYYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVK AARVDKSPYNQSMYGAGLPVDDFEDSESTDTEEEFG NAIGGSHGGSSYTVYIDKTR

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует иммуноген VZV, содержащий сигнальную последовательность, например, иммуноген VZV, содержащий сигнальную последовательность, выбранную из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот из последовательности в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или

95% аминокислот из последовательности в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой вариант последовательности в таблице 2, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, точечных мутаций, делеций или вставок).

Таблица 2. Иллюстративные иммуногены gE VZV, содержащие сигнальную последовательность

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
34	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A Сигнальная последовательность: SecSP38 (подчеркнуто)	<u>MWWRLWLLLLLLLLWPMVWAMGTVNKPVVGVL</u> MGFGIITGLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLDTNSV YEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRN DYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMS AQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDV FKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVR YTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVV DVDCAEENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTS TLFDELELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRG SDGTSTYATFLVTWKGD E KTRNPTPAVTPQPRGAEF HMWNYHSHVFSVGD T FSLAMHLQYKIH EAPFDLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGC TFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHME PSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNGHV EAVAYTVVSTVDHFVN AIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVLLCLVIFLICTA KRMRVKAARV DK
35	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A Сигнальная последовательность	<u>MWWLLLLLLLLWPMVWAMGTVNKPVVGVL</u> MGFGIITGLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLDTNSV YEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRN DYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMS AQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDV FKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVR YTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVV DVDCAEENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTS TLFDELELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRG SDGTSTYATFLVTWKGD E KTRNPTPAVTPQPRGAEF HMWNYHSHVFSVGD T FSLAMHLQYKIH EAPFDLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGC TFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHME PSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNGHV EAVAYTVVSTVDHFVN AIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVLLCLVIFLICTA KRMRVKAARV DK

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
	ть: SecD4 (подчеркнуто)	TWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVD CAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFD ELELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRGSDGT STYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMW NYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLEWLY VPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTS PHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFG LILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVVFVYFNGHVEAVA YTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPV NPGTSPLLRYYAAWTGGLAAVLLCLVIFLICTAKRM RVKAARVDK
36	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A Сигнальная последовательнос ть: gLuc (подчеркнуто)	<u>MGVKVLFALICIAVAEAKMGTVNKPVVGVL</u> MGFGII TGTLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLD TNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDL GDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDL NPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFD LELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRGSDGTS TYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWN YHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYV PIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSP HLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGL ILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVVFVYFNGHVEAVA YTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPV NPGTSPLLRYYAAWTGGLAAVLLCLVIFLICTAKRM RVKAARVDK
37	Гликопротеин E, 546 аминокислот Сигнальная последовательнос	<u>MASRLTLLTLLLLLAGDRASSMGTVNKPVVGVL</u> M GFGIITGTLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLD TNSVY EPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRND YDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
	ть: INHC1 (подчеркнуто)	QEDLGDDTGIHVPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCTCFQDVVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDLELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNGHVEAVAYTVVSTVDHVFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
38	Гликопротеин E, 546 аминокислот Сигнальная последовательность: gLuc (подчеркнуто)	<u>MGVKVLFALICIAVAEAK</u> MGTVNKPVVGVL MGFII TGTLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLD TNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDL GDDTGIHVPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDL NPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVR YTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCTCFQDVVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDLE LELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRGSDGTS TYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWN YHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYV PIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSP HLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGL ILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNGHVEAVA YTVVSTVDHVFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPV NPGTSPLIRYAAWTGGLA
69	Гликопротеин E, 539 аминокислот Сигнальная последовательность:	MGVKVLFALICIAVAEAMGTVNKPVVGVL MGFII GTLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLD TNSVYEPYYH SDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
	ть: gLuc (подчеркнуто)	DDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLN PKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWS FLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAE NTKEDQLAEISYRFQGGKKEADQPWIVVNTSTLFDELE LDPPEIEPGVLKVLRTKQYLGVIWNMRGSDGTST YATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNY HSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPI DPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPH LAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLIL HDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNGHVEAVAYT VVSTVDHFVNIAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNP GTSPLIRYAAWTGGLA
70	Гликопротеин E, 524 аминокислоты Сигнальная последовательнос ть: gLuc (подчеркнуто)	<u>MGVKVLFALICIAVAEAKRITNPVRASVLR</u> YDDFHID EDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYD HNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGE RLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVN VDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTL RAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLK HTTCFQDVVVDVDCAEENTKEDQLAEISYRFQGGKKEA DQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTKQY LGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTP AVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQY KIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNA PQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNY TAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLY VFVVFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNIAIEERGFPPT AGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит экспрессионную последовательность, кодирующую иммуноген VZV, необязательно содержащий сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, и необязательно сигнальная последовательность представляют собой последовательность из таблицы 3. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная

последовательность, кодирующая иммуноген VZV, представляет собой фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 нуклеотидов последовательности в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, представляет собой фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% последовательности в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из таблицы 3.

Таблица 3. Иллюстративные полирибонуклеотидные последовательности, кодирующие иммуногены gE VZV, необязательно содержащие сигнальную последовательность

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
39	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUAGGUCUCACAUGUUCUACGAGGCCUGAAGGC CGAGCUGGUGUACACCCGGGCUGUGCACGGCUUC CGGCCCGGGCCAACUGCGUGGUCCUGAGCGACU ACAUCCCCCGGGUGGCCUGCAACAUGGGCACCGU GAACAAGCCCGUGGUGGGCGUGCUGAUGGGCUUC GGCAUCAUUAACCGGCACCCUGCGGAUACCAACC CCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUU CCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGC GUGUACGAGCCUACUAUCACAGCGACCACGCCG AGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCG GAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGG CCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACG CCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCG GGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCC ACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACG ACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGG CGACGACCGGCACAAGAUUCGUGAACGUGGACCAG CGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGA ACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGU GAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUACCCUGCGG GCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCGAAACCUUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUG CACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAU UGCCUGAAGCACACCACCUUGCUUCCAGGACGUGG UUGUGGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGA GGACCAGCUGGCCGAGAUACAGCUACCGGUUCCAG GGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCUGGAUCGUGG UGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCU GGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAG GUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGGCGUGU ACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA CACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGC GACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCCGUGA CCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUCCAUAUGUG GAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGAC ACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGA UCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUG GCUGUACGUGCCAUCGACCCACCUGCCAGCCC AUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCA ACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGG CUGCACCUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGG GUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACG CCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAG CCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCUCGAC GACGGCGGAACCACCUGAAGUUCGUGGACACCC CCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGU CUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUAC ACCGUGGUGAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACG CCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCCUACCGCCGG CCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUC ACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCUGUUGC GGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGU GGUUCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCUGAUCUGC ACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		UGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
40	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A, сигнальная последовательность SecSP38	AUAGGUCUCACAUGUGGGUGGCGGCUGUGGGUGGCU GCUGCUGUUGCUGCUGCUCUCCUGUGGCCCAUGGUG UGGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGG GCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCAC CCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUG CUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACA AGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUA UCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACA ACAGCCCCUACAUCUGGGCCCCGGAACGACUACGA CGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGC GUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCA GGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUG AUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGA UCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGU GUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGC CAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACC ACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAU CUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUC CUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUC CCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCAC CUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGC GCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGA UCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGA CCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUG UUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAUCG AGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAA GCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGG GGCAGCGACGGCACCCAGCACCUACGCCACCUUCC UGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAA CCCCACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCGAAUCCAUUAUGUGGAACUACCACAGCCACGU GUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUG CACCUGCAGUACAAGAUAUCCACGAGGCCCCCUUCG ACCUGUUGCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGA CCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACC UGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCAGUGCCUGA GCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCC CCACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUAC CAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCU ACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUU CGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCGAGAGCCUGAGCGGCC UGUACGUGUUCGUGGUGUACUUAACGGCCACGU GGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUG GACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCU UCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACU AAGCCAAGGAGAUAACCCCGUGAACCCCGGCA CCAGCCCCUGCUCCGGUACGCCGCCUGGACCGG CGGCCUGGCCGACAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUG AUCUCCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGG UGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACC AUA
41	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A, сигнальная последовательность SecD4	AUAGGUCUCACAUGUGGUGGCUGCUGCUGUUGCU GCUGCUCCUGUGGCCCAUGGUGUGGGCCAUGGGC ACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGG GCUUCGGCAUCAUUAACGGCACCCUGCGGAUCAC CAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGAC GAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCA ACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCA CGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGC AGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCUACA UCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGA GAACGCCACGAGCACCCACGGCGUGUACAACCAG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGC AGCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGG CGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUG AACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGG ACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUC GAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCC UGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCG GUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUG ACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGC ACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGA CGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACC AAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGU UCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCUGGAU CGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUG GAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGGCUGC UGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGC ACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGA AGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCCGC CGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGG GCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUA CAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGUUGCUG GAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCC AGCCCAUGC GGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCA CCCC AACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAAC AGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCC AGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGA GCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGC AUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUC UGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGA CACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGG CCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGU GAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCU GCUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC GCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUCCUGA UCUGCACCGCCAAGCGGAUGC GGGUGAAGGCCGC CCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
42	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A, сигнальная последовательность гLuc	AUAGGUCUCACAUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGC UCUGAUUUGUAUUGCCGUGGCCGAGGCCAUGGGC ACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGG GCUUCGGCAUCAUACCGGCACCCUGCGGAUCAC CAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGAC GAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCA ACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCA CGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACC GGGGCGAGAGC AGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACA UCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGA GAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAG GGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGC AGCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGGACCUGGG CGACGACACCGGCAUCCACGUGAUC CCCACCCUG AACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGG ACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUAAGGGCGA CCUGAACCCCAAGCCCAGGGCCAGCGGCUGAUC GAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCUUCACCC UGCGGGCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCG GUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUG ACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGC ACAUCUGCCUGAAGCACACCACCGCUUCCAGGA CGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACC AAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		UCCAGGGCAAGAAAGAGGGCCGACCAGCCCUGGAU CGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUG GAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGC UGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGC ACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGA AGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCCGC CGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGG GCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUA CAAGAUCACGAGGGCCCCUUCGACCUGCUCUG GAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCACCCUGCC AGCCCAUGC GGCUGUACAGCACCCUGCCUGUACCA CCCC AACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAAC AGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGGCC AGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGA GCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGC AUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCC UGCACGACGGCGGAACCACCUGAAGUUCGUGGA CACCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUC GUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGG CCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGU GAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCU GUUGC GGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC GCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCUGA UCUGCACCGCCAAGCGGAUGC GGGUGAAGGCCGC CCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
43	Гликопротеин E, 623 аминокислоты	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGU GGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUACC GGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCA GCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCC UACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGG UGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGA CCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGAC UACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACC ACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAG CGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGC GCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCC ACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCA CAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGC GACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCC AGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGA AAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAG CGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGA GCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGC CGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCAC ACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGG ACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGC CGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAG GCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA CCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGA GAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACC GAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACA UGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCAC CUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACC CGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCCG GGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCACAGC CACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGG CCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCACGAGGCCCC CUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCC AUCGACCCACCUGCCAGCCAUGCGGCUGUACA GCACCUGCCUGUACCACCCAACGCCCCCAGUG CCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUACC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		AGUCCCCACCUUGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCG UGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACAC CGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCC AGCUUCGGCCUGAUCUUGCAGCGGCGGAACCA CCCUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAGCCUGAG CGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGC CACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCA CCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCC ACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCGUGAACC CCGGCACCGCCCCUGAUCGGUACGCCGCCUG GACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGC CUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGA UGCGGGUGAAGGCCUACCGGGUGGACAAGAGCCC CUACAACCAGAGCAUGUACUACGCCGGCCUGCCC GUGGACGACUUCGAGGACAGCGAGAGCACCGACA CCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAG CCACGGCGGCAGCUCUACACCGUGUACAUCGAC AAGACCCGGUAAAUGAGACCAUA
44	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, мутация Y569A	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGU GGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUACC GGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCA GCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGA GGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCC UACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGG UGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGA CCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGAC UACGACGGCUUCUGGAGAACGCCACGAGCACC ACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAG CGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCACCCAGAUGAGC GCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCC ACGUGAUCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCA CAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p>GACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCC AGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGA AAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAG CGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGA GCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGC CGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCAC ACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGG ACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGC CGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAG GCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA CCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGA GAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACC GAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACA UGCGGGGCAGCGACGGCACACCUACGCCAC CUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACC CGGAACCCACCCCCGCGUGACCCCCCAGCCCCG GGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGC CACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGG CCAUGCACCUGCAGUACAAGAUAUCCAGAGGCCCC CUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCC AUCGACCCACCUGCCAGCCAUUCGGCUGUACA GCACCUGCCUGUACCACCCAACGCCCCCAGUG CCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACC AGUCCCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCG UGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACAC CGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCC AGCUUCGGCCUGAUCUCCUGCACGACGGCGGAACCA CCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAG CGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGC CACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCA CCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUUCGAGGAGCG GGGCUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCC ACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCCGUGAACC</p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCGGCACCAGCCCCUGAUCGCGGUACGCCGCCUG GACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGC CUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGA UGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCC CUACAACCAGAGCAUGUACUACGCCGGCCUGCCC GUGGACGACUUCGAGGACAGCGAGAGCACCGACA CCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAG CCACGGCGGCAGCUCUACACCGUGUACAUCGAC AAGACCCGGUAAAUGAGACCAUA
45	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, двойная мутация Y569A/Y582G	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGU GGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACC GGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCA GCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGA GGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCC UACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGG UGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGA CCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCCGGAACGAC UACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACC ACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAG CGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGC GCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCC ACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCA CAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGC GACGUGUUAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCC AGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGA AAACCACCCCUACCCUGCGGGCCCCCAUCCAG CGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGA GCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGC CGCUCGCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCAC ACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGG ACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGC CGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAG GCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGA GAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACC GAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACA UGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCAC CUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACC CGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCCG GGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCACAGC CACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGG CCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCACGAGGCCCC CUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCC AUCGACCCACCCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACA GCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCAGUG CCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACC AGUCCCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCG UGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACAC CGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCC AGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCA CCCUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAGCCUGAG CGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUAACGGC CACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCA CCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCC ACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCCGUGAACC CCGGCACCAGCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUG GACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGC CUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGA UGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCC CUACAACCAGAGCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCC GUGGACGACUUCGAGGACAGCGAGAGCACCGACA CCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAG CCACGGCGGCAGCUCUACACCGUGUACAUCGAC AAGACCCGGUAAAUGAGACCAUA
46	Гликопротеин E,	AUAGGUCUCACAUGGCCAGCCGGCUGACCCUGCU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
	546 аминокислот, сигнальная последовательно сть INHC1	CACCCUGCUGUUGCUGCUGCUCGCCGGCGACCGG GCCAGCUCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGG UGGGCGUCCUGAUGGGGCUUCGGCAUCAUACCGG CACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGC GUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGG ACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUA CUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCAGCUGGGUG AACCGGGGAGAGAGUUCUCGGAAGGCCUACGACC ACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUA CGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACCAC GGGCUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCG GCGAGCGGCUGAUGCAGCCACCCAGAUGAGCGC CCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCAC GUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGA CGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAG GGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAA ACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCG GAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGC UUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCG CUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACAC CACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGAC UGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCG AGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGC CGACCAGCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACC CUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGA GAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUG CGGGGCAGCGACGGCACCCAGCACCUACGCCACCU UCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCG GAACCCACCCCCGCCGUGACCCCCAGCCCCGGG GCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCA CGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		AUGCACCUGCAGUACAAGAUGCACGAGGCCCCCU UCGACCUGCUGUUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAU CGACCCACCUGCCAGCCCAUGC GGCUGUACAGC ACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCC UGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAG UCCCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUG UACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCG CCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCAG CUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACC CUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAGCCUGAGCG GCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCA CGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACC GUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGG GCUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACC ACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCGUGAACCCCG GCACCAGCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGAC CGGCGGCCUGGCCUAAAUGAGACCAUA
47	Гликопротеин E, 546 аминокислот, сигнальная последовательность gLuc	AUAGGUCUCACAUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGC UCUGAUUUGUAUUGCCGUGGCCGAGGCCAUGGGC ACCGUGAACAAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGG GCUUCGGCAUCAUUAACGGCACCCUGCGGAUCAC CAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGAC GAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCA ACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCA CGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGC AGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACA UCUGGCCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGA GAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAG GGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGC AGCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGGACCUGGG CGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUG AACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGG ACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUC GAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCUUCACCC UGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCG GUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUG ACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGC ACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGA CGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACC AAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGU UCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAU CGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUG GAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGC UGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGC ACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGA AGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCCGC CGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGG GCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUA CAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUG GAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCC AGCCCAUGC GGCUGUACAGCACCCUGCCUGUACCA CCCC AACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAAC AGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCC AGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGA GCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGC AUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCC UGCACGACGGCGGAACCACCUGAAGUUCGUGGA CACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUC GUGGUGUACUUAACGGCCACGUGGAGGCCGUGG CCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGU GAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC GCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUCCUGA UCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGC CCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
71	Гликопротеин E, 539 аминокислот Сигнальная последовательно сть: gLuc	AUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGCCUGAUCUGCA UCGCCGUGGCCGAGGCCAUGGGCACCGUGAACAA GCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUC AUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGC GGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAU CGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUAC GAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCU CCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGC CUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCCGG AACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACG AGCACACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAU CGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAG AUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCG GCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGA CCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAG UACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCA AGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGU GGAGGAAAACCACCCUUCACCCUGCGGGCCCCC AUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAA CCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGG CGACGCCGCUCCCGCAUCCAGCACAUUCUGCCUG AAGCACACCACCUUCUCCAGGACGUGGUGGUUG ACGUGGACUGCGCCGAGAACAACCAAGGAGGACCA GCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAG AAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACA CCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCC CCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUG CGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCU GGAACAUGCGGGGCGAGCGACGGCACCCAGCACCUA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAG AAGACCCGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCA GCCCCGGGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUAC CACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCA GCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCACGA GGCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUAC GUGCCCAUCGACCCACCUGCCAGCCAUAGCGGC UGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCAACGCCCC CCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCA GCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAA CUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUG GAGCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCG GAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAG CCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUC AACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGG UCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGA GGAGCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCC CCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCG UGAACCCCGGCACCAGCCCCUGAUCCGGUACGC CGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC
72	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGGACAGUUAAUAAACCUGUGGGUGGGGUA UUGAUGGGGUUCGGAAUUAUCACGGGAACGUUG CGUAUAACGAAUCCGGUCAGAGCAUCCGUCUUGC GAUACGAUGAUUUUCACAUCGAUGAAGACAAACU GGAUACAAACUCCGUUAUUGAGCCUACUACCAU UCAGAUC AUGCGGAGUCUUCAUGGGUAAAUCGGG GAGAGUCUUCGCGAAAAGCGUACGAUCAUAACUC ACCUUAUAUAUGGCCACGUAAUGAUUAUGAUGG AUUUUUAGAGAACGCACACGAACACCAUGGGGUG UAUAAUCAGGGCCGUGGUAUCGAUAGCGGGGAAC GGUUAAUGCAACCCACACAAAUGUCUGCACAGGA GGAUCUUGGGGACGAUACGGGCAUCCACGUUAUC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCUACGUUAAACGGCGAUGACAGACAUAAAAUUG UAAAUUGUGGACCAACGUCAAUACGGUGACGUGUU UAAAGGAGAUUCUAAUCCAAAACCCCAAGGCCAA AGACUCAUUGAGGUGUCAGUGGAAGAAAUCACC CGUUUACUUUACGCGCACCGAUUCAGCGGAUUUA UGGAGUCCGGUACACCGAGACUUGGAGCUUUUUG CCGUCAUUAACCUGUACGGGAGACGCAGCGCCCG CCAUCCAGCAUAUAUGUUUAAAACAUAACA AUG CUUUCAAGACGUGGUGGUGGAUGUGGAUUGCGC GGAAAUAACUAAAGAGGAUCAGUUGGCCGAAAU CAGUUACCGUUUUC AAGGUAAGAAGGAAGCGGAC CAACCGUGGAUUGUUGUAAACACGAGCACACUGU UUGAUGAACUCGAAUUAAGACCCCCCGAGAUUGA ACCGGGUGUCUUGAAAGUACUUCGGACAGAAAA CAUACUUGGGUGUGUACA UUGGAACAUGCGCG GCUCCGAUGGUACGUCUACCUACGCCACGUUUUU GGUCACCUGGAAAGGGGAUGAAAAACAAGAAA CCCUACGCCCGCAGUAACUCCUCAACCAAGAGGG GCUGAGUUUCAUAUGUGGAAUUAACACUCGCAUG UAUUUUCAGUUGGUGAUACGUUUAGCUUGGCAA UGCAUCUUCAGUAUAAGAUACAUGAAGCGCCA AU UGAUUUGCUGUUAGAGUGGUUGUAUGUCCCAUC GAUCCUACAUGUCAACCA AUGCGGUUAUAUUCUA CGUGUUUGUAUCAUCCCAACGCACCCCAAUGCCU CUCUCAUAUGAAUUCGGUUGUACA UUUACCUCG CCACA UUUAGCCAGCGUGUUGCAAGCACAGUGU AUCAAA AUUGUGAACAUGCAGAUAA CUACACCGC AUAUUGUCUGGGAAUAUCUCAUAUGGAGCCUAGC UUUGGUCUAAUCUUAACACGACGGGGGCACCACGU UAAAGUUUGUAGAUACACCCGAGAGUUUGUCGG GAUUAUACGUUUUUGUGGUGUAUUUUAACGGGC AUGUUGAAGCCGUAGCAUACACUGUUGUAUCCAC AGUAGAUCAUUUUGUAAACGCAAUUGAGGAGCG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		UGGAUUUCCGCCAACGGCCGGUCAGCCACCGGCG ACUACUAAACCCAAGGAAAUUACCCCGUAAACC CCGGAACGUCACCACUUCUACGAUAUGCCGCAUG GACCGGAGGGCUUGCAGCAGUAGUACUUUAUGU CUCGUAAUAUUUUAAUCUGUACGGCUAAACGAA UGAGGGUUAAGCCGCCAGGGUAGACAAGUGA
73	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGCACCGUGAACAAAGCCCGUGGUGGGCGUCC UGAUGGGCUUCGGCAUCAUACCGGCACCCUGCG GAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGG UACGACGAUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGG ACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAG CGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGC GAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCC CCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUU CCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUAC AACAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGC UGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGGA CCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCC ACCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGA ACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAA GGGCGACCUGAACCCCAAGCCCAGGGCCAGCGG CUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGG CGUGCGGUACACCGAAACCUUGGAGCUUCCUGCCC AGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCA UCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCUUCU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAG AACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCU ACCGGUUCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCC CUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGAC GAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCG GCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUA CCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p>GACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGA CCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCAC CCCCGCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAA UCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCA GCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCU GCAGUACAAGAUCACGAGGCCCCCUUCGACCUG CUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCA CCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCU GUACCACCCCAACGCCCCAGUGCCUGAGCCAC AUGAACAGCGGCUGCACCUUACCAGUCCCACC UGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGC CUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCAGCUUCGGCC UGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUU CGUGGACACCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUAC GUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGG CCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCUGGACCA CUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCU CCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCC CAAGGAGAUCACCCCGUGAACCCCGGCACCAGC CCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCC UGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUU CCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAG GCCGCCCGGGUGGACAAG</p>
74	Гликопротеин E, 524 аминокислоты,	<p>AUGGGCGUGACCGCCCCCGGACCCUGAUCCUGC UCCUGAGCGGCGCCUGGCCUGACCGAAACCUG GGCCGGCAGCCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCC AGCGUGCUGCGGUACGACGAUUCCACAUCGACG AGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCC CUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGG GUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACG ACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGA CUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCAC</p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACA GCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAG CGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGC ACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGG CGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCC CAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGG AAAACCACCCCUACCCUGCGGGCCCCCAUCCA GCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGG AGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACG CCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUGCCUGAAGCA CACCACCUUCUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUG GACUGCGCCGAGAACAACCAAGGAGGACCAGCUGG CCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGA GGCCGACCAGCCUUGGAUCGUGGUGAACACCAGC ACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUG AGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGAC CGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAAC AUGCGGGGCAGCGACGGCACCCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGAC CCGGAACCCACCCCCGCGUGACCCCCAGCCCC GGGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCACAG CCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUG GCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCACGAGGCC CCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCC CAUCGACCCACCUGCCAGCCAUGCGGCUGUAC AGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCAGU GCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUAC CAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACC GUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACA CCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCC CAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACC ACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGG CCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGC ACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGC GGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGC CACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAAC CCCGGCACCAGCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCU GGACCGGCGGCCUGGCC
75	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCC UGAUGGGCUUCGGCAUCAUUAACCGGCACCCUGCG GAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGG UACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGG ACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAG CGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGC GAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCC CCUACAUCUGGCCCCCGGAACGACUACGACGGCUU CCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUAC AACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGC UGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGGA CCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCC ACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGA ACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAA GGGCGACCUGAACCCEAAGCCCCAGGGCCAGCGG CUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGG CGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCC AGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCGCCA UCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCGUCU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAG AACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCU ACCGGUUCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCC CUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGAC GAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCG GCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGC GACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGA CCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCAC CCCC GCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAA UUCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCA GCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCU GCAGUACAAGAUCACGAGGCCCCCUUCGACCUG CUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCA CCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCU GUACCACCCCAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCAC AUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACC UGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGC CUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCC UGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUU CGUGGACACCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUAC GUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGG CCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCA CUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCU CCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCC CAAGGAGAUCACCCCGUGAACCCCGGCACCAGC CCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGGCGGCC UGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUU CCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAG GCCGCCCGGGUGGACAAG
76	Гликопротеин E, 524 аминокислоты Сигнальная последовательность: gLuc (подчеркнуто)	AUGGGCGUGAAGGUGCUGUUCGCCUGAUCUGCA UCGCCGUGGCCGAGGCCAAGCGGAUCACCAACCC CGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUC CACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGA GAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGG AAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGC CCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGG GGCAUCGACAGCGGGCAGCGGCUGAUGCAGCCCA CCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGA CACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGC GACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGC GGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAA CCCC AAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUG AGCGUGGAGGAAAACCACCCCUACCCUGCGGG CCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACAC CGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGC ACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCU GCCUGAAGCACACCACCUUGC UUCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAG GACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGG GCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCUGGAUCGUGGU GAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGG UGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUA CAUCUGGAACAUGC GGGGCAGCGACGGCACCAGC ACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCG ACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCCGUGAC CCCCAGCCCCGGGGCGCCGAUUC AU AUGUGG AACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACA CCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAU CCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGG CUGUACGUGCCCAUCGACCCACCCUGCCAGCCCA UGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAA CGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGC UGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCAGCGGG UGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGC CGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGC CACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACG ACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUG UACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACA CCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGC CAUCGAGGAGCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGC CAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCA CCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCUGAUCCG GUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC
77	Гликопротеин E, 524 аминокислоты	AUGGGCCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCG UGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGA CAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUAC UAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGA ACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCA CAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUAC GACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGG CGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCC CAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACG UGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAA GAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGAC GUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGG GCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAA CCACCCCUUACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGG AUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUUGGAGCU UCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGC UCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACC ACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACU GCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGA GAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCC GACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCC UGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAU CGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAG AAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGC GGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUCGCCACCUU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCUGGUGACCUUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGG AACCCACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCGGGG CGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCAC GUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCA UGCACCUGCAGUACAAGAUCACGAGGCCCCCUU CGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUC GACCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCA CCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCAGUGCCU GAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGU CCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGU ACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGC CUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCAGC UUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCC UGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAGCCUGAGCGG CCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUAACGGCCAC GUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCG UGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGG CUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCA CUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCGUGAACCCCGG CACCAGCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACC GGCGGCCUGGCC
79	Гликопротеин E, 524 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCC UGAUGGGCUUCGGCAUCAUACCGGCACCCUGCG GAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGG UACGACGAUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGG ACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAG CGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCAGGGGC GAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCC CCUACAUCUGGCCCCCGGAACGACUACGACGGCUU CCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUAC AACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGC UGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGGA CCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		ACCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGA ACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUCAA GGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGG CUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGG CGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCC AGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCA UCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAG AACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCU ACCGGUUCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCC CUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGAC GAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCG GCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUA CCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGC GACGGCACAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGA CCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCAC CCCC GCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAA UUCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUA GCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCU GCAGUACAAGAUCACGAGGCCCCUUCGACCUG CUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCAUCGACCCCA CCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCCUGCCU GUACCACCCAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCAC AUGAACAGCGGCUGCACCUUACCAGUCCCCACC UGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGC CUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCC UGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUU CGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUAC GUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGG CCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCA CUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCC CAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGC CCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCC UGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUU CCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAG GCCGCCCGGGUGGACAAG
80	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, двойная мутация Y569A/Y582G	AUGGGCACCGUGAACAAAGCCCGUGGUGGGCGUCC UGAUGGGCUUCGGCAUCAUACCGGCACCCUGCG GAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGG UACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGG ACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAG CGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGC GAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCC CCUACAUCUGGCCCCCGAACGACUACGACGGCUU CCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUAC AACCAAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGC UGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGGA CCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCC ACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGA ACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAA GGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGG CUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGG CGUGCGGUACACCGAAACCUUGGAGCUUCCUGCCC AGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCA UCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCUUCU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAG AACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCU ACCGGUUCACGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCC CUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGAC GAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCG GCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUA CCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGA CCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCAC CCCC GCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAA UUCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCA GCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCU GCAGUACAAGA UCCACGAGGCCCCUUCGACCUG CUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCA CCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCU GUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCAC AUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACC UGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCUGUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGC CUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCC UGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUU CGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUAC GUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGG CCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCUGGACCA CUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCU CCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCC CAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGC CCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCC UGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUU CCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAG GCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCAGA GCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUU CGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGGAG UUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAGCCACGGCGGCA GCUCUACACCGUGUACAUCGACAAGACCCGG
81	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAAUCA GCGGCGGAGGAGGGAGUGGCACCGUGAACAAAGCC CGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUU ACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGG CCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAG CCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCU GGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUA CGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCCGAAC GACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGC ACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGA CAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUG AGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCA UCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCG GCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUAC GGGCAGCGUGUUAAGGGCGACCUGAACCCCAAGC CCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGA GGAAAACCACCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUC CAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCU GGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGA CGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAG CACACCACCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACG UGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCU GGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAG GAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCA GCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCC UGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGG ACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGA ACAUGC GGGG CAGCGACGGCACCAGCACCUACGC CACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAG ACCCGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCCAGCC CCGGGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCAC AGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCC UGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGC CCCCUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUG CCCAUCGACCCACCUGCCAGCCAUGCGGCUGU ACAGCACCUGCCUGUACCACCCAACGCCCCCA GUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		ACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCA CCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUA CACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAG CCCAGCUUCGGCCUGAUCUCCUGCACGACGGCGGCA CCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCU GAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAAC GGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCA GCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGA GCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCA GCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCCGUGA ACCCCGGCACCCAGCCCCUGUUGCGGUACGCCGC CUGGACCGGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUG UGCCUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCCAAGC GGAUGC GGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG
82	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAAUA GCGGCGGAGGAGGGAGUGGCACCGUGAACAAGCC CGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAU ACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGG CCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAG CCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCU GGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUA CGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCCGAAC GACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGC ACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGA CAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUG AGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCA UCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCG GCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUAC GGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGC CCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGA GGAAAACCACCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUC CAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGA CGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAG CACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACG UGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCU GGCCGAGAUACAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAG GAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCA GCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCC UGAGAUCGAGCCC GGCGUGCUGAAGGUGCUGCGG ACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGA ACAUGC GGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGC CACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAG ACCCGGAACCCACCCCCGCGUGACCCCCCAGCC CCGGGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCAC AGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCC UGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGC CCCCUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUG CCAUCGACCCACCUGCCAGCCAUGCGGCUGU ACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCA GUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUU ACCAGUCCCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCA CCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUA CACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAG CCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGCA CCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCU GAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAAC GGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCA GCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGA GCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCA GCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCCGUGA ACCCCGGCACCCAGCCCCUGAUCCGGUACGCCGC CUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUG UGCCUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCCAAGC GGAUGC GGGUGAAGGCCCGCCGGGUGGACAAGAG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCCCUACAACCAGAGCAUGUACGGCGCCGGCCUG CCCGUGGACGACUUCGAGGACAGCGAGAGCACCG ACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGG AAGCCACGGCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUC GACAAGACCCGG
83	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCC UGAUGGGCUUCGGCAUCAUACCGGCACCCUGCG GAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGG UACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGG ACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAG CGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGC GAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCC CCUACAUCUGGCCCCCGGAACGACUACGACGGCUU CCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUAC AACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGC UGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGA CCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCC ACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGA ACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCA GGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGG CUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGG CGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCC AGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCA UCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCUUCU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAG AACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCU ACCGGUUCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCC CUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGAC GAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCG GCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUA CCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGC GACGGCACCAAGCACCUCGCCACCUUCCUGGUGA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCAC CCCC GCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAA UUCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCA GCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCU GCAGUACAAGA UCCACGAGGCCCCCUUCGACCUG CUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCA CCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCU GUACCACCCCAACGCCCCAGUGCCUGAGCCAC AUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACC UGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGC CUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCC UGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUU CGUGGACACCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUAC GUGUUCGUGGUGUACUUAACGGCCACGUGGAGG CCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCA CUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCU CCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCC CAAGGAGAUCACCCCGUGAACCCCGGCACCAGC CCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCC UGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUU CCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAG GCCGCCCGGGUGGACAAG

В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой секретируемый белок. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой неструктурный белок. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления немедленно-ранний белок VZV представляет собой полипептид IE63. Полипептид IE63 VZV может содержать следующую аминокислотную последовательность:

MFCTSPATRGDSSES KPGASVDVNGKMEYGSAPGPLNGRDT SRGPGAFCTPGWEIHPAR
 LVEDINRVFLCIAQSSGRVTRDSRRLRRICLDFYLMGRTRQRPTLACWEELLQLQPTQTQ
 CLRATLMEVSHRPPRGEDGFIEAPNVPLHRSALECDVSDDGGEDDSDDDGSTPSDVIEFR

DSDAESSDGEDFIVEEESEESTDSCEPDGVPGDCYRDGDGCNTPSPKRPQRAIERYAGAE
TAEYTAAKALTALGEGGVDWKRRRHEAPRRHDIPPHGV (SEQ ID NO: 84).

В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV может характеризоваться по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 84. Полипептид IE63 VZV может содержать сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV может кодироваться следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

ATGTTCTGCACCAGCCCCGCCACCCGGGGCGACAGCTCCGAGAGCAAGCCCCGGCGC
CAGCGTGGACGTGAACGGCAAGATGGAGTACGGCAGCGCCCCGGCCCCCTGAACG
GCCGGGATAACCAGTCGGGGACCCGGAGCCTTCTGCACCCCCGGCTGGGAGATCCAC
CCCCCCCCGGCTGGTGGAGGACATCAACCGGGTGTTCCTGTGCATCGCCCAGAGCAG
CGGCCGGGTGACCCGGGACAGCCGGAGACTGCGGCGGATCTGCCTGGACTTCTACC
TGATGGGCCGGACCCGGCAGCGGCCACCCTGGCCTGCTGGGAGGAACTGCTCCAG
CTGCAGCCCACCCAGACCCAGTGCCTGCGGGCCACCCTGATGGAGGTGAGCCACCG
GCCCCCTCGGGGCGAGGACGGCTTCATCGAGGCCCCCAACGTGCCCTGCACCGGA
GCGCCCTGGAGTGCGACGTGAGCGACGACGGCGGAGAGGACGACAGCGACGACGA
CGGCAGCACCCCCAGCGACGTGATCGAGTTCGGGACAGCGACGCCGAGAGCTCTG
ACGGCGAGGACTTCATCGTCGAGGAAGAGAGCGAGGAGAGCACCGACAGCTGCGA
GCCCGACGGCGTGCCCCGGCGACTGCTACCGGGACGGCGACGGCTGCAACACCCCCA
GCCCCAAGCGGCCCCAGCGGGCCATCGAGCGGTACGCCGGCGCCGAAACAGCCGAG
TACACCGCCGCTAAGGCCCTGACCGCCCTGGGCGAGGGCGGCGTGGACTGGAAGCG
GAGGCGGCACGAGGCCCCCCGGCGGCACGACATTCCTCCTCCACACGGCGTG (SEQ
ID NO: 85).

В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV выбран из иммуногена VZV, представленного в WO2000/043527, который включен в данный документ во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV выбран из иммуногена VZV, представленного в WO2006094756, который включен в данный документ во всей

своей полноте. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV выбран из иммуногена VZV, описанного в WO2017070601, который включен в данный документ во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет по меньшей мере 51% (например, по меньшей мере 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% или 60%). В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет не более 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, или 59%, или 60%. В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет от 51% до 60%, от 52% до 60%, от 53% до 60%, от 54% до 60%, от 55% до 60%, от 52% до 58%, от 53% до 58%.

В некоторых вариантах осуществления содержание уридина (для РНК) или содержание тимидина (для ДНК) в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет более 10% (например, более 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% или 25%). В некоторых вариантах осуществления содержание уридина (для РНК) или содержание тимидина (для ДНК) в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет не более 30% (например, не более 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21% или 20%). В некоторых вариантах осуществления содержание уридина (для РНК) или содержание тимидина (для ДНК) в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет от 20% до 28%, от 21% до 26%, от 10% до 24%, от 15% до 24%, от 20% до 24%, от 21% до 24%, от 22% до 24%, от 23% до 24%, от 10% до 23%, от 15% до 23%, от 20% до 23%, от 21% до 23% или от 22% до 23%.

Содержание GC в экспрессионной последовательности, кодирующей иммуноген VZV, относится к содержанию GC в экспрессионной последовательности, которая кодирует исключительно иммуноген VZV без каких-либо других кодирующих областей, которые кодируют пептиды, отличные от иммуногена VZV. Аналогичным образом, содержание уридина или тимидина в экспрессионной последовательности, кодирующей иммуноген VZV, относится к содержанию уридина в экспрессионной последовательности, которая кодирует исключительно иммуноген VZV без каких-либо других кодирующих областей, которые кодируют пептиды, отличные от иммуногена VZV. В некоторых вариантах осуществления при расчете содержания GC или содержания уридина (или тимидина) в экспрессионной последовательности, кодирующей иммуноген VZV, учитывается только непрерывная последовательность нуклеиновой кислоты, которая начинается в

направлении от 5' к 3' от первого нуклеозида старт-кодона открытой рамки считывания, которая кодирует иммуноген VZV, до последнего нуклеозида стоп-кодона той же открытой рамки считывания. В других вариантах осуществления при расчете содержания GC или содержания уридина (или тимидина) в экспрессионной последовательности, кодирующей иммуноген VZV, учитывается только непрерывная последовательность нуклеиновой кислоты, которая начинается в направлении от 5' к 3' от первого нуклеозида кодона, который кодирует N-концевой аминокислотный остаток иммуногена VZV, до последнего нуклеозида кодона, который кодирует C-концевой аминокислотный остаток иммуногена VZV.

Кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению может кодировать один или множество иммуногенов, где по меньшей мере один иммуноген представляет собой иммуноген VZV. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует первый иммуноген VZV и второй иммуноген VZV (например, каждый иммуноген VZV, выбранный из иммуногена VZV, описанного в данном документе). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует первый иммуноген VZV и второй иммуноген (например, второй иммуноген, выбранный из другого вируса).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует от 1 до 100, от 1 до 50, от 1 до 20, от 1 до 10, от 1 до 5, от 2 до 100, от 2 до 50, от 2 до 20, от 2 до 10, от 2 до 5 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует 2 или больше иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует 3 или больше иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует 4 или больше иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует 5 или больше иммуногенов.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует два или больше иммуногенов VZV, где каждый иммуноген представляет собой гликопротеин VZV или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE и gI или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE и gB или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gI и gB или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE, gI

и gB или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE и gH или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gI и gH или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE, gI и gH или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE и gK или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gI и gK или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE, gI и gK или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE и gL или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gI и gL или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE, gI и gL или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE и gC или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gI и gC или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE, gI и gC или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE и gN или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gI и gN или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE, gI и gN или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE и gM или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gI и gM или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE, gI и gM или их фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует два или больше иммуногенов VZV, где каждый иммуноген VZV представляет собой gE VZV или его вариант или фрагмент (например, любой из варианта gE VZV или его вариантов или фрагментов, раскрытых в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый иммуноген получен из вируса герпеса (CMV, EBV или VZV). Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген из каждого из следующих

вирусов герпеса: CMV, EBV или VZV. Полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый иммуноген происходит из вируса опоясывающего лишая или вируса лихорадки Западного Нила. Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген каждого из вирусов опоясывающего лишая и вируса лихорадки Западного Нила.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует множество иммуногенов, и множество иммуногенов характеризуются по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности. В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов также характеризуются менее чем 100% идентичностью последовательности. Это может указывать на иммуногены, связанные друг с другом генетическим дрейфом, таким образом, композиция на основе одного кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенная композиция могут быть способны индуцировать иммунный ответ на мишень, которая существует в популяции в различных мутационных состояниях, или может индуцировать иммунный ответ на несколько мишеней, содержащих один и тот же иммуноген, если иммуноген связан с генетическим дрейфом. Например, иммуногены могут быть связаны друг с другом генетическим дрейфом вируса-мишени (например, VZV).

Иммуноген VZV получен, например, из вируса, например, вирусный поверхностный белок, вирусный мембранный белок, вирусный белок оболочки, вирусный капсидный белок, вирусный нуклеокапсидный белок, вирусный шиповидный белок, вирусный белок проникновения, вирусный белок слияния с мембраной, вирусный структурный белок, вирусный неструктурный белок, вирусный регуляторный белок, вирусный вспомогательный белок, секретируемый вирусный белок, белок, представляющий собой вирусную полимеразу, вирусная ДНК-полимераза, вирусная РНК-полимераза, вирусная протеаза, вирусный гликопротеин, вирусный фузоген, вирусный спиральный капсидный белок, вирусный икосаэдрический капсидный белок, вирусный матриксный белок, вирусная репликаза, вирусный транскрипционный фактор или вирусный фермент.

Иммуноген VZV по настоящему изобретению может предусматривать последовательность дикого типа. При описании иммуногена термин "дикий тип" относится к последовательности (например, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности), которая встречается в природе и кодируется геномом (например, вирусным геномом). Виды (например, виды микроорганизмов) могут иметь одну последовательность дикого типа или две или больше последовательностей дикого типа (например, с одной канонической последовательностью дикого типа, присутствующей в эталонном геноме микроорганизма, и присутствующими

дополнительными вариантными последовательностями дикого типа, которые возникли в результате мутаций).

При описании иммуногена VZV термины "производное", "происходящий из" или "вариант" относятся к последовательности (например, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности), которая отличается от последовательности дикого типа одной или несколькими нуклеиновыми кислотами или аминокислотами, например, содержащей одну или несколько вставок, делеций и/или замен нуклеиновой кислоты или аминокислоты относительно последовательности дикого типа.

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

В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV содержит одну или несколько аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, которые влияют на структуру кодируемого белка. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит одну или несколько аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, которые влияют на функцию кодируемого белка. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит одну или несколько аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, которые влияют на экспрессию или процессинг кодируемого белка.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит одну или несколько вставок, делеций, замен или их комбинацию, которые влияют на структуру кодируемой иммуногенной нуклеиновой кислоты.

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

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

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

собой изменение аминокислоты с одной ароматической аминокислоты на другую ароматическую аминокислоту. Ароматические аминокислоты могут включать Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W). Консервативной заменой аминокислоты может являться замена одной алифатической аминокислоты на другую алифатическую аминокислоту. Алифатические аминокислоты могут включать Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I). В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена представляет собой изменение аминокислоты с одной аминокислоты на другую аминокислоту в пределах одной из следующих групп: группа I: Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; группа II: Cys, Ser, Tyr, Thr; группа III: Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; группа IV: Lys, Arg, His; группа V: Phe, Tyr, Trp, His; и группа VI: Asp, Glu.

В некоторых вариантах осуществления вариант иммуногена по настоящему изобретению содержит не более 1, не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не больше 10, не более 11, не более 12, не более 13, не более 14, не более 15, не более 16, не более 17, не более 18, не более 19, не более 20, не более 25, не более 30, не более 35, не более 40, не более 45 или не более 50 аминокислотных замен относительно раскрытой в данном документе последовательности (например, последовательности дикого типа). В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению содержит 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 10-15, 15-20 или 20-25 аминокислотных замен относительно последовательности, раскрытой в данном документе (например, последовательности дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления вариант иммуногена по настоящему изобретению содержит не более 1, не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не больше 10, не более 11, не более 12, не более 13, не более 14, не более 15, не более 16, не более 17, не более 18, не более 19, не более 20, не более 25, не более 30, не более 35, не более 40, не более 45 или не более 50 аминокислотных делеций относительно раскрытой в данном документе последовательности (например, последовательности дикого типа). В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению содержит 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 10-15, 15-20 или 20-25

аминокислотных делеций относительно последовательности, раскрытой в данном документе (например, последовательности дикого типа).

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

В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше иммуногенов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает эпитоп. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше эпитопов, раскрытых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV имеет длину менее приблизительно 40000 аминокислот, менее приблизительно 35000 аминокислот, менее приблизительно 30000 аминокислот, менее приблизительно 25000 аминокислот, менее приблизительно 20000 аминокислот, менее приблизительно 15000 аминокислот, менее приблизительно 10000 аминокислот, менее приблизительно 9000 аминокислот, менее приблизительно 8000 аминокислот, менее приблизительно 7000 аминокислот, менее приблизительно 6000 аминокислот, менее приблизительно 5000 аминокислот, менее приблизительно 4000 аминокислот, менее приблизительно 3000 аминокислот, менее приблизительно 2500 аминокислот, менее приблизительно 2000 аминокислот, менее приблизительно 1500 аминокислот, менее приблизительно 1000 аминокислот, менее приблизительно 900 аминокислот, менее приблизительно 800 аминокислот, менее приблизительно 700 аминокислот, менее приблизительно 600 аминокислот, менее приблизительно 500 аминокислот, менее приблизительно 400 аминокислот, менее приблизительно 300 аминокислот, менее приблизительно 250 аминокислот, менее приблизительно 200 аминокислот, менее приблизительно 150 аминокислот, менее приблизительно 140 аминокислот, менее приблизительно 130 аминокислот, менее приблизительно 120 аминокислот, менее приблизительно 110 аминокислот, менее приблизительно 100 аминокислот, менее приблизительно 90 аминокислот, менее приблизительно 80 аминокислот, менее приблизительно 70 аминокислот, менее приблизительно 60 аминокислот, менее приблизительно 50 аминокислот, менее приблизительно 40 аминокислот, менее приблизительно 30 аминокислот, менее

приблизительно 25 аминокислот, менее приблизительно 20 аминокислот кислот, менее приблизительно 15 аминокислот, менее приблизительно 10 аминокислот, менее приблизительно 5 аминокислот, при этом длина, предусматривающая любое количество аминокислот, находящееся между указанными значениями или являющееся меньшим, может являться пригодной.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько иммуногенных последовательностей VZV и характеризуется конфигурацией, обеспечивающей постоянную экспрессию в клетке субъекта *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет такую конфигурацию, что уровень экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей в клетке в более поздний момент времени равен уровню экспрессии в более ранний момент времени или превышает его. В таких вариантах осуществления экспрессия одной или нескольких иммуногенных последовательностей может поддерживаться на относительно стабильном уровне либо может повышаться с течением времени. Экспрессия иммуногенных последовательностей может быть относительно стабильной в течение продолжительного периода времени. Экспрессия иммуногенных последовательностей может быть относительно стабильной кратковременно или только в течение ограниченного периода времени, например в течение не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней.

В некоторых вариантах осуществления с кольцевого полирибонуклеотида экспрессируется один или несколько иммуногенов у субъекта, например, временно или в течение длительного периода времени. В определенных вариантах осуществления экспрессия иммуногенов сохраняется в течение промежутка времени, составляющего от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней, или в течение по меньшей мере приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 60 дней или дольше или любого периода времени в промежутке между этими значениями. В определенных вариантах осуществления экспрессия иммуногенов сохраняется в течение промежутка времени, составляющего от не более чем приблизительно 30 минут до приблизительно 7 дней, или не более чем приблизительно 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 часа, 22 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13

дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 60 дней или любого периода времени в промежутке между этими значениями.

Экспрессия иммуногена предусматривает трансляцию по меньшей мере одной области кольцевого полирибонуклеотида, представленного в данном документе. Например, кольцевой полирибонуклеотид может быть транслирован у субъекта с образованием полипептидов, которые предусматривают один или несколько иммуногенов по настоящему изобретению, тем самым стимулируя выработку адаптивного иммунного ответа (например, ответа с образованием антител и/или Т-клеточного ответа) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению транслируется с образованием одного или нескольких иммуногенов у субъекта, представляющего собой человека или животное, тем самым стимулируя выработку адаптивного иммунного ответа (например, ответа с образованием антител и/или Т-клеточного ответа) у субъекта, представляющего собой человека или животное.

В некоторых вариантах осуществления способы обеспечения экспрессии иммуногена включают модификацию, сворачивание или другую посттрансляционную модификацию продукта трансляции. В некоторых вариантах осуществления способы обеспечения экспрессии иммуногена включают посттрансляционную модификацию *in vivo*, например, посредством клеточного механизма.

Кольцевые полирибонуклеотиды

Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать любой один или несколько элементов, описанных в данном документе, и экспрессионную последовательность, кодирующую иммуноген VZV. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает любой признак или любую комбинацию признаков, описанных в международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления длина кольцевого полирибонуклеотида составляет по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 75 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 200 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 300 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 400 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 1000 нуклеотидов, по меньшей мере

приблизительно 2000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 5000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 6000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 7000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 8000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 9000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 10000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 12000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 14000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 15000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 16000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 17000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 18000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 19000 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 20000 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления длина кольцевого полирибонуклеотида составляет от 500 нуклеотидов до 20000 нуклеотидов, от 1000 до 20000 нуклеотидов, от 2000 до 20000 нуклеотидов или от 5000 до 20000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина кольцевого полирибонуклеотида составляет от 500 нуклеотидов до 10000 нуклеотидов, от 1000 до 10000 нуклеотидов, от 2000 до 10000 нуклеотидов или от 5000 до 10000 нуклеотидов.

Сайты внутренней посадки рибосомы

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит один или несколько элементов сайта внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES функционально связан с одной или несколькими экспрессионными последовательностями (например, каждый IRES функционально связан с одной или несколькими экспрессионными последовательностями, где каждая экспрессионная последовательность необязательно кодирует иммуноген, такой как иммуноген VZV). В вариантах осуществления IRES расположен между гетерологичным промотором и 5'-концом кодирующей последовательности (например, кодирующей последовательности, кодирующей иммуноген VZV).

Элемент IRES, подходящий для включения в полирибонуклеотид, содержит последовательность РНК, способную рекрутировать эукариотическую рибосому. В некоторых вариантах осуществления длина элемента IRES составляет по меньшей мере приблизительно 5 нт, по меньшей мере приблизительно 8 нт, по меньшей мере приблизительно 9 нт, по меньшей мере приблизительно 10 нт, по меньшей мере приблизительно 15 нт, по меньшей мере приблизительно 20 нт, по меньшей мере приблизительно 25 нт, по меньшей мере приблизительно 30 нт, по меньшей мере приблизительно 40 нт, по меньшей мере приблизительно 50 нт, по меньшей мере

приблизительно 100 нт, по меньшей мере приблизительно 200 нт, по меньшей мере приблизительно 250 нт, по меньшей мере приблизительно 350 нт или по меньшей мере приблизительно 500 нт.

В некоторых вариантах осуществления элемент IRES получен из ДНК организма, включающего без ограничения вирус, млекопитающее и дрозофилу. Такая вирусная ДНК может быть получена без ограничения из комплементарной ДНК (сDNA) пикорнавируса, сDNA вируса энцефаломиокардита (EMCV) и сDNA полиовируса. В одном варианте осуществления ДНК дрозофилы, из которой получен элемент IRES, включает без ограничения ген *Antennapedia* из *Drosophila melanogaster*.

В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES представляет собой последовательность IRES вируса синдрома Таура, вируса триатомовых, вируса энцефаломиелита Тейлера, вируса обезьян 40, вируса 1 *Solenopsis invicta*, вируса *Rhopalosiphum padi*, вируса ретикулоэндотелиоза, вируса 1 полиомиелита человека, кишечного вируса *Plautia stali*, кашмирского вируса пчел, риновируса человека 2 (HRV-2), вируса 1 *Homalodisca coagulata*, вируса иммунодефицита человека типа 1, вируса 1 *Homalodisca coagulata*, вируса Р Ниметоби, вируса гепатита С, вируса гепатита А, вируса гепатита GB, вируса ящура, энтеровируса 71 человека, вируса ринита лошадей, пикорнаподобного вируса *Ectropis obliqua*, вируса энцефаломиокардита (EMCV), вируса С дрозофилы, тобамовируса крестоцветных, вируса паралича сверчка, вируса 1 вирусной диареи крупного рогатого скота, вируса черного маточника, вируса летального паралича тли, вируса энцефаломиелита птиц (AEV), вируса острого паралича пчел, вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, вируса классической чумы свиней, FGF2 человека, SFTPA1 человека, AML1/RUNX1 человека, вируса антеннопедии дрозофил, AQP4 человека, AT1R человека, BAG-1 человека, BCL2 человека, BiP человека, с-IAP1 человека, с-тус человека, eIF4G человека, NDST4L мышей, LEF1 человека, HIF1-альфа мышей, n.тус человека, Gtx мышей, p27kip1 человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мышей, смертельного вируса дрозофил, вируса галопа псовых, Ubx дрозофил, UNR человека, UtrA мышей, VEGF-A человека, XIAP человека, саливируса, косавируса, парэховируса, вируса облысения дрозофил, TFIID *S. cerevisiae*, YAP1 *S. cerevisiae*, с-src человека, FGF-1 человека, пикорнавируса обезьян, вируса морщинистости репы, айчивируса, крохивируса, эховируса 11, аптамера к eIF4G, вируса Коксаки В3 (CVB3) или вируса Коксаки А (CVB1/2). В еще одном варианте осуществления IRES представляет собой последовательность IRES вируса Коксаки В3 (CVB3). В дополнительном варианте осуществления IRES представляет собой последовательность IRES вируса энцефаломиокардита. В дополнительном варианте

осуществления IRES представляет собой последовательность IRES вируса энцефаломиелита Тейлера.

Последовательность IRES может характеризоваться модифицированной последовательностью по сравнению с последовательностью IRES дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, если последний нуклеотид IRES дикого типа не является остатком цитозина нуклеиновой кислоты, то последний нуклеотид последовательности IRES дикого типа может быть модифицирован таким образом, что он является остатком цитозина. Например, последовательность IRES может представлять собой последовательность IRES CVB3, где концевой остаток аденозина модифицирован с получением остатка цитозина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный IRES CVB3 может содержать следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

TTAAAACAGCCTGTGGGTGATCCCACCCACAGGCCCATTTGGGCGCTAGCACTCTGG
TATCACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCAACTGTAACCTAGAAG
TAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCAC
TTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGC
GTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAG
TGTTTCGCTCAGCACTACCCAGTG TAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTTCCCA
CGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATGGGA
CGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGC
CCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGT
GTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCAT
TTTATTCCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTAT
TGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATAC
CACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAA
C (SEQ ID NO: 113)

В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES представляет собой IRES энтеровируса 71 (EV17). В некоторых вариантах осуществления концевой остаток гуанозина последовательности IRES EV17 модифицирован с получением остатка цитозина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный IRES EV71 может содержать следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT
TTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTT
CTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT
GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTG
TAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGC

CAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGT
 TGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
 GGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTC
 GGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAA
 CCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATA (SEQ ID NO: 114).

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один IRES, фланкирующий по меньшей мере одну экспрессионную последовательность (например, 2, 3, 4, 5 или больше). В некоторых вариантах осуществления IRES фланкирует по меньшей мере одну экспрессионную последовательность (например, 2, 3, 4, 5 или больше) с обеих сторон. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит одну или несколько последовательностей IRES с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению образующегося(-ихся) в результате пептида(-ов) и или полипептида(-ов). Например, полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может содержать первый IRES, функционально связанный с первой экспрессионной последовательностью (например, кодирующей первый иммуноген, такой как первый иммуноген VZV), и второй IRES, функционально связанный со второй экспрессионной последовательностью (например, кодирующей второй иммуноген, такой как второй иммуноген VZV).

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит IRES (например, IRES, функционально связанный с кодирующей областью). Например, полирибонуклеотид может содержать любой IRES, как описано в Chen et al. Mol. Cell 81(20):4300-4318, 2021; Jopling et al. Oncogene 20:2664-2670, 2001; Baranick et al. PNAS 105(12):4733-4738, 2008; Lang et al. Molecular Biology of the Cell 13(5):1792-1801, 2002; Dorokhov et al. PNAS 99(8):5301-5306, 2002; Wang et al. Nucleic Acids Research 33(7):2248-2258, 2005; и Petz et al. Nucleic Acids Research 35(8):2473-2482, 2007, и Chen et al. SCIENCE 268:415-417, 1995; Fan et al. NATURE COMMUNICATION 13(1): 3751-3765, 2022 и международной публикации № WO2021/263124, каждая из которых настоящим включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Сигнальные последовательности

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные иммуногены, которые могут экспрессироваться с кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, включают секретируемый белок, например, белок (например, иммуноген), который в естественных условиях содержит сигнальную последовательность, или белок, который обычно не кодирует сигнальную последовательность, но модифицирован таким образом, что содержит одну сигнальную последовательность. В некоторых вариантах

осуществления иммуноген(-ы), кодируемый(-е) кольцевым полирибонуклеотидом, содержит(-ат) сигнал секреции. Например, сигнал секреции может представлять собой кодируемый в естественных условиях сигнал секреции для секретируемого белка. В другом примере, сигнал секреции может представлять собой модифицированный сигнал секреции для секретируемого белка. В других вариантах осуществления иммуноген(-ы), кодируемый(-е) кольцевым полирибонуклеотидом, не содержит(-ат) сигнал секреции.

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность выбрана из SecSP38 (MWRLWWLLLLLLLLWPMVWA; SEQ ID NO: 1); SecD4 (MWWLLLLLLLLWPMVWA; SEQ ID NO: 2), gLuc (MGVKVLFALICIAVAEAK; SEQ ID NO: 3); INHC1 (MASRLTLLTLLLLLAGDRASS; SEQ ID NO: 4); Epo (MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG; SEQ ID NO: 5); и IL-2 (MYRMQLLSICIALSLALVTNS; SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует несколько копий одного и того же иммуногена (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна копия иммуногена содержит сигнальную последовательность, и по меньшей мере одна копия иммуногена не содержит сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует множество иммуногенов (например, множество отличающихся иммуногенов или множество иммуногенов, характеризующихся менее чем 100% идентичностью последовательностей), где по меньшей мере один из множества иммуногенов содержит сигнальную последовательность, и по меньшей мере одна копия из множества иммуногенов не содержит сигнальную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность дикого типа, которая присутствует на N-конце соответствующего иммуногена дикого типа, например, при эндогенной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность является гетерологичной иммуногену, например, отсутствует, если иммуноген дикого типа экспрессируется эндогенно. Полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген, может быть модифицирована для обеспечения удаления нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность дикого типа, и/или добавления последовательности, кодирующей гетерологичную сигнальную последовательность.

Кольцевой полирибонуклеотид может дополнительно предусматривать один или несколько адъювантов, каждый с сигнальной последовательностью или без нее. В

некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует по меньшей мере один адъювант и по меньшей мере один иммуноген. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген не предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант не предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления ни кодируемый адъювант, ни кодируемый иммуноген не предусматривают сигнальную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность дикого типа, которая присутствует на N-конце соответствующего адъюванта дикого типа, например, при эндогенной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность является гетерологичной адъюванту, например, отсутствует, если адъювант дикого типа экспрессируется эндогенно. Полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая адъювант, может быть модифицирована для обеспечения удаления нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность дикого типа, и/или добавления последовательности, кодирующей гетерологичную сигнальную последовательность.

Полипептид, кодируемый полирибонуклеотидом (например, иммуноген или адъювант, кодируемый полирибонуклеотидом), может содержать сигнальную последовательность, которая направляет иммуноген или адъювант по секреторному пути. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность может направлять иммуноген или адъювант для постоянного расположения в определенные органеллы (например, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи или эндосомы). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность направляет иммуноген или адъювант на секрецию из клетки. Для секретлируемых белков сигнальная последовательность может быть расщеплена после секреции, в результате чего образуется зрелый белок. В других вариантах осуществления сигнальная последовательность может быть встроена в мембрану клетки или определенных органелл, создавая трансмембранный сегмент, который закрепляет белок в мембране клетки, эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи. В определенных вариантах осуществления сигнальная

последовательность трансмембранного белка представляет собой короткую последовательность на N-конце полипептида. В других вариантах осуществления первый трансмембранный домен действует как первая сигнальная последовательность, которая направляет белок к мембране.

В некоторых вариантах осуществления адъювант, кодируемый полирибонуклеотидом, содержит сигнальную последовательность секреции. В некоторых вариантах осуществления иммуноген, кодируемый полирибонуклеотидом, содержит либо сигнальную последовательность секреции, либо сигнальную последовательность вставки в трансмембранном пространстве, либо не содержит сигнальную последовательность.

Регуляторные элементы

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько регуляторных элементов, например, одну или несколько последовательностей, которые модифицируют экспрессию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде.

Регуляторный элемент может предусматривать последовательность, которая расположена рядом с экспрессионной последовательностью, кодирующей продукт экспрессии. Регуляторный элемент может быть функционально связан с расположенной рядом последовательностью. Регуляторный элемент может обеспечивать повышение количества экспрессируемого продукта по сравнению с количеством экспрессируемого продукта в отсутствие регуляторного элемента. Регуляторный элемент может применяться для повышения экспрессии одного или нескольких иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым полирибонуклеотидом. Аналогичным образом, регуляторный элемент может применяться для снижения экспрессии одного или нескольких иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может применяться для повышения экспрессии иммуногена и/или адъюванта, и другой регуляторный элемент может применяться для снижения экспрессии другого иммуногена и/или адъюванта в одном и том же кольцевом полирибонуклеотиде. Кроме того, один регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества продукта (например, иммуногена или адъювантов), экспрессируемых с нескольких экспрессионных последовательностей, соединенных в тандем. Таким образом, один регуляторный элемент может обеспечивать усиление экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей (например, иммуногенов или адъювантов). Также может применяться несколько регуляторных элементов, например, для дифференциальной регуляции экспрессии отличающихся экспрессионных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент, представленный в данном документе, может предусматривать последовательность для избирательной трансляции. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательной трансляции" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая избирательно инициирует или активирует трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде, например, к определенным аптазимам рибопереключателю. Регуляторный элемент также может предусматривать последовательность для избирательного разрушения. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательного разрушения" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая инициирует разрушение кольцевого полирибонуклеотида или продукта экспрессии кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент является модулятором трансляции. Модулятор трансляции может модулировать трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. Модулятор трансляции может являться энхансером или супрессором трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции может функционировать в качестве регуляторного элемента.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид обеспечивает продуцирование продуктов экспрессии в стехиометрических соотношениях. Трансляция по типу "катыщегося кольца" приводит к непрерывному продуцированию продуктов экспрессии в по сути эквивалентных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции, так что продукты экспрессии продуцируются в по сути эквивалентных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции нескольких продуктов экспрессии, например, продуктов с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид обеспечивает продуцирование в значительной степени отличающихся соотношений продуктов экспрессии. Например, эффективность трансляции продуктов множественной экспрессии может характеризоваться соотношением 1:10000; 1:7000, 1:5000, 1:1000, 1:700, 1:500, 1:100, 1:50, 1:10, 1:5, 1:4, 1:3 или 1:2. В некоторых вариантах осуществления соотношение нескольких продуктов экспрессии может быть изменено с применением регуляторного элемента.

Дополнительные примеры регулирующих элементов описаны в параграфах [0154] – [0161] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Домены расщепления

Кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению может содержать домен расщепления (например, сдвигающий элемент или последовательность расщепления).

Используемый в данном документе термин "сдвигающий элемент" относится к компоненту, такому как нуклеотидная последовательность, которая индуцирует рибосомальную паузу в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент представляет собой неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность -D(V/I)ExNPGP, где x = любая аминокислота (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент может предусматривать химический компонент, такой как глицерин, линкерный компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, химическую модификацию, модифицированную нуклеиновую кислоту или любую их комбинацию.

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

экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент содержит часть экспрессионной последовательности из одной или нескольких экспрессионных последовательностей.

Примеры сдвигающих элементов описаны в параграфах [0172] – [0175] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым рибонуклеотидом, могут быть отделены с помощью IRES между каждым иммуногеном (например, каждый иммуноген функционально связан с отдельным IRES). Например, кольцевой полирибонуклеотид может содержать первый IRES, функционально связанный с первой экспрессионной последовательностью, и второй IRES, функционально связанный со второй экспрессионной последовательностью. IRES может быть одним и тем же IRES для всех иммуногенов. IRES может отличаться для отличающихся иммуногенов.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адъювантов может быть отделено посредством саморасщепляющегося пептида 2A. Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый иммуноген, 2A и второй иммуноген.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адъювантов может быть отделено сайтом расщепления протеазой (например, сайтом расщепления фурином). Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый иммуноген, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином) и второй иммуноген.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адъювантов может быть отделено саморасщепляющимся пептидом 2A и сайтом расщепления протеазой (например, сайтом расщепления фурином). Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый иммуноген, 2A, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином) и второй иммуноген. Кольцевой полирибонуклеотид может также кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый иммуноген, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином), 2A и второй иммуноген. Тандем 2A и сайт расщепления фурином может называться фурином-2A (который включает фурин-2A или 2A-фурин, расположенный в любой ориентации).

Более того, множество иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым рибонуклеотидом, могут быть отделены как последовательностями IRES, так и последовательностями 2A. Например, IRES может находиться между одним иммуногеном и/или адъювантом и вторым иммуногеном и/или адъювантом, тогда как пептид 2A может находиться между вторым иммуногеном и/или адъювантом и третьим иммуногеном и/или адъювантом. Выбор конкретного IRES или саморасщепляющегося пептида 2A можно применять для контроля уровня экспрессии иммуногена и/или адъюванта под контролем последовательности IRES или последовательности 2A. Например, в зависимости от выбранного IRES и/или пептида 2A уровень экспрессии полипептида может быть выше или ниже.

Во избежание продуцирования непрерывного продукта экспрессии, например, иммуногена и/или адъюванта, при сохранении трансляции по типу "катящегося кольца" можно включить сдвигающий элемент для индуцирования рибосомальной паузы в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент расположен на 3'-конце по меньшей мере одной из одной или нескольких экспрессионных последовательностей. Сдвигающий элемент может иметь конфигурацию, позволяющую ему задерживать рибосому в ходе трансляции по типу "катящегося кольца" кольцевого полирибонуклеотида. Сдвигающий элемент может включать без ограничения 2A-подобную последовательность или последовательность CHYSEL (SEQ ID NO: 8) (элемент, представляющий собой цис-действующую гидролазу). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент кодирует последовательность с С-концевой консенсусной последовательностью, которая представляет собой $X_1X_2X_3EX_5NPGP$, где X_1 отсутствует или представляет собой G или H, X_2 отсутствует или представляет собой D или G, X_3 представляет собой D, или V, или I, или S, или M, и X_5 представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления данная последовательность содержит неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность $-D(V/I)ExNPGP$, где x = любая аминокислота (SEQ ID NO: 7). Некоторые неограничивающие примеры сдвигающих элементов включают GDVESNPGP (SEQ ID NO: 10), GDIEENPGP (SEQ ID NO: 11), VEPNPGP (SEQ ID NO: 12), IETNPGP (SEQ ID NO: 13), GDIESNPGP (SEQ ID NO: 14), GDVELNPGP (SEQ ID NO: 15), GDIETNPGP (SEQ ID NO: 16), GDVENPGP (SEQ ID NO: 17), GDVEENPGP (SEQ ID NO: 18), GDVEQNPGP (SEQ ID NO: 19), IESNPGP (SEQ ID NO: 20), GDIELNPGP (SEQ ID NO: 21), HDIETNPGP (SEQ ID NO: 22), HDVETNPGP (SEQ ID NO: 23), HDVEMNPGP

(SEQ ID NO: 24), GDMESNPGP (SEQ ID NO: 25), GDVETNPGP (SEQ ID NO: 26), GDIEQNPGP (SEQ ID NO: 27) и DSEFNPGP (SEQ ID NO: 28).

В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент, описанный в данном документе, расщепляет продукт экспрессии, как, например, между G и P в консенсусной последовательности, описанной в данном документе. В качестве одного неограничивающего примера, кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сдвигающий элемент для расщепления продукта экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент рядом с по меньшей мере одной экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент после каждой экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент, присутствующий с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к трансляции отдельных пептида(-ов) и/или полипептида(-ов) с каждой экспрессионной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов или неприродных нуклеотидов, которые индуцируют рибосомальную паузу в ходе трансляции. Неприродные нуклеотиды могут включать пептидо-нуклеиновую кислоту (PNA), морфолиновую и запертую нуклеиновую кислоту (LNA), а также гликоль-нуклеиновую кислоту (GNA) и треозо-нуклеиновую кислоту (TNA). Примеры, подобные этим, отличаются от встречающихся в природе ДНК или РНК ввиду изменений в остове молекулы. Иллюстративные модификации могут включать любую модификацию сахарного фрагмента, нуклеинового основания, межнуклеозидной связи (например, фосфатного остатка, образующего связь/фосфодиэфирной связи/фосфодиэфирного остова) и любую их комбинацию, которая может индуцировать рибосомальную паузу в ходе трансляции. Некоторые из иллюстративных модификаций, представленных в данном документе, описаны в другом месте в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент присутствует в кольцевом полирибонуклеотиде в других формах. Например, в некоторых иллюстративных кольцевых полирибонуклеотидах сдвигающий элемент содержит терминирующий элемент первой экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде и нуклеотидную спейсерную последовательность, которая отделяет терминирующий элемент от первой последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, следующей за первой экспрессионной последовательностью. В

некоторых примерах первый сдвигающий элемент первой экспрессионной последовательности расположен выше (в 5'-направлении от нее) первой последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, следующей за первой экспрессионной последовательностью в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых случаях первая экспрессионная последовательность и экспрессионная последовательность, следующая за первой экспрессионной последовательностью, представляют собой две отдельные экспрессионные последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. Расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции может обеспечивать возможность непрерывной трансляции первой экспрессионной последовательности и следующей за ней экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления первый сдвигающий элемент содержит терминирующий элемент и отделяет продукт экспрессии первой экспрессионной последовательности от продукта экспрессии следующих за ней экспрессионных последовательностей, за счет чего обеспечивается образование дискретных продуктов экспрессии. В некоторых случаях кольцевой полирибонуклеотид, содержащий первый сдвигающий элемент выше первой последовательности инициации трансляции следующей последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде, транслируется непрерывно, тогда как соответствующий кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сдвигающий элемент второй экспрессионной последовательности, который расположен выше второй последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, следующей за второй экспрессионной последовательностью, не транслируется непрерывно. В некоторых случаях в кольцевом полирибонуклеотиде имеется только одна экспрессионная последовательность, и первая экспрессионная последовательность и следующая за ней экспрессионная последовательность являются одной и той же экспрессионной последовательностью. В некоторых иллюстративных кольцевых полирибонуклеотидах сдвигающий элемент содержит первый терминирующий элемент первой экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде и нуклеотидную спейсерную последовательность, которая отделяет терминирующий элемент от нижерасположенной последовательности инициации трансляции. В некоторых таких примерах первый сдвигающий элемент расположен выше (в 5'-направлении от нее) первой последовательности инициации трансляции первой экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых случаях расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции обеспечивает возможность непрерывной трансляции первой экспрессионной

последовательности и любых следующих экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления первый сдвигающий элемент отделяет продукт одного цикла экспрессии первой экспрессионной последовательности от продукта следующего цикла экспрессии первой экспрессионной последовательности, за счет чего обеспечивается образование дискретных продуктов экспрессии. В некоторых случаях кольцевой полирибонуклеотид, содержащий первый сдвигающий элемент выше первой последовательности инициации трансляции первой экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде, транслируется непрерывно, тогда как соответствующий кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сдвигающий элемент выше второй последовательности инициации трансляции второй экспрессионной последовательности в соответствующем кольцевом полирибонуклеотиде, не транслируется непрерывно. В некоторых случаях расстояние между вторым сдвигающим элементом и второй последовательностью инициации трансляции в соответствующем кольцевом полирибонуклеотиде в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз превышает расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых случаях расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции составляет по меньшей мере 2 нт, 3 нт, 4 нт, 5 нт, 6 нт, 7 нт, 8 нт, 9 нт, 10 нт, 11 нт, 12 нт, 13 нт, 14 нт, 15 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт, 25 нт, 30 нт, 35 нт, 40 нт, 45 нт, 50 нт, 55 нт, 60 нт, 65 нт, 70 нт, 75 нт или больше. В некоторых вариантах осуществления расстояние между вторым сдвигающим элементом и второй последовательностью инициации трансляции на по меньшей мере 2 нт, 3 нт, 4 нт, 5 нт, 6 нт, 7 нт, 8 нт, 9 нт, 10 нт, 11 нт, 12 нт, 13 нт, 14 нт, 15 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт, 25 нт, 30 нт, 35 нт, 40 нт, 45 нт, 50 нт, 55 нт, 60 нт, 65 нт, 70 нт, 75 нт или больше превышает расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит более одной экспрессионной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления расположена рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления расположена между двумя экспрессионными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления включена в экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах осуществления кольцевой

полирибонуклеотид содержит от 2 до 10 последовательностей расщепления. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 2 до 5 последовательностей расщепления. В некоторых вариантах осуществления несколько последовательностей расщепления расположены между несколькими экспрессионными последовательностями; например, кольцевой полирибонуклеотид может содержать три экспрессионные последовательности и две последовательности расщепления таким образом, что между каждой экспрессионной последовательностью расположена последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность расщепления, подобную той, какая содержится в разлагающейся *circRNA*, или расщепляемой *circRNA*, или саморасщепляющейся *circRNA*. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит две или более последовательностей расщепления, что приводит к разделению кольцевого полирибонуклеотида на несколько продуктов, например, *miRNA*, линейные РНК, кольцевой полирибонуклеотид меньшего размера и т. п.

В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления содержит последовательность РНК-рибозима. Рибозим (от "ферментативной рибонуклеиновой кислоты", также называемой РНК-ферментом или каталитической РНК) представляет собой молекулу РНК, которая катализирует химическую реакцию. Многие природные рибозимы катализируют гидролиз одной из своих собственных фосфодиэфирных связей либо гидролиз связей в других РНК, но также было обнаружено, что они катализируют аминотрансферазную активность рибосомы. Каталитическая РНК может "эволюционировать" посредством способов *in vitro*. Подобно обсуждаемой выше активности рибопереключателей, рибозимы и продукты их реакций могут регулировать экспрессию генов. В некоторых вариантах осуществления каталитическая РНК или рибозим могут быть помещены в большую некодирующую РНК таким образом, чтобы рибозим присутствовал во многих копиях в клетке для целей химического превращения молекулы из общего объема. В некоторых вариантах осуществления как аптамеры, так и рибозимы могут кодироваться в одной и той же некодирующей РНК.

В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления кодирует расщепляемый полипептидный линкер. Например, полирибонуклеотид может кодировать два или больше иммуногенов, например, при этом два или больше иммуногенов кодируются одной открытой рамкой считывания (ORF). Например, два или больше иммуногенов могут кодироваться одной открытой рамкой считывания, экспрессия с которой контролируется с помощью IRES. В некоторых вариантах осуществления ORF

дополнительно кодирует полипептидный линкер, например, таким образом, что продукт экспрессии ORF кодирует два или больше иммуногенов, каждый из которых отделен последовательностью, кодирующей полипептидный линкер (например, линкер, состоящий от 5 до 200, от 5 до 100, от 5 до 50, от 5 до 20, от 50 до 100 или от 50 до 200 аминокислот). Полипептидный линкер может содержать сайт расщепления, например, сайт расщепления, распознаваемый и расщепляемый протеазой (например, эндогенной протеазой у субъекта после введения полирибонуклеотида данному субъекту). В таких вариантах осуществления один продукт экспрессии, содержащий аминокислотную последовательность двух или больше иммуногенов, расщепляется при экспрессии, так что два или больше иммуногенов являются разделенными после экспрессии. Иллюстративные сайты расщепления протеазами известны специалистам в данной области техники, например, аминокислотные последовательности, которые действуют как сайты расщепления протеазами, распознаваемые металлопротеиназой (например, матриксной металлопротеиназой (MMP), такой как любая одна или несколько из MMP 1-28), дезинтегрином и металлопротеиназой (ADAM, такой как любая одна или несколько из ADAM 2, 7-12, 15, 17-23, 28-30 и 33), сериновой протеазой (например, фурином), активатором плазминогена урокиназного типа, матриптазой, цистеиновой протеазой, аспарагиновой протеазой или катепсиновой протеазой. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой MMP9 или MMP2. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой матриптазу.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, представляет собой разлагающийся кольцевой полирибонуклеотид, расщепляемый кольцевой полирибонуклеотид или саморасщепляющийся кольцевой полирибонуклеотид. Кольцевой полирибонуклеотид может осуществлять доставку клеточных компонентов, включая, например, РНК, lncRNA, lincRNA, miRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, ncRNA, siRNA или shRNA. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит miRNA, отделенную (i) саморасщепляющимися элементами; (ii) сайтами рекрутирования факторов расщепления; (iii) разрушаемыми линкерами; (iv) химическими линкерами и/или (v) спейсерными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления circRNA содержит siRNA, отделенную (i) саморасщепляющимися элементами; (ii) сайтами рекрутирования факторов расщепления (например, ADAR); (iii) разрушаемыми линкерами (например, глицериновыми); (iv) химическими линкерами и/или (v) спейсерными последовательностями.

Неограничивающие примеры саморасщепляющихся элементов включают рибозимы типа

"головки молотка", сплайсинговые элементы, рибозимы, содержащие шпильку, рибозимы вируса гепатита дельта (HDV), сателлита Варкуд (VS) и *glmS*.

Последовательности инициации трансляции

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует иммуноген и содержит последовательность инициации трансляции, например, старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции предусматривает последовательность Козак или Шайна-Дальгарно. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции предусматривает последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, прилегающую к экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции представляет собой некодирующий старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность инициации трансляции, прилегающую к экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции обеспечивает конформационную гибкость кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции расположена в пределах по сути односторонней области кольцевого полирибонуклеотида. Дополнительные примеры последовательностей инициации трансляции описаны в параграфах [0163] – [0165] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать более 1 старт-кодона, например, без ограничения по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60 или более 60 старт-кодонов. Трансляция может иницироваться в первом старт-кодоне или может иницироваться ниже первого старт-кодона.

В некоторых вариантах осуществления трансляция кольцевого полирибонуклеотида может инициироваться в кодоне, который не является первым стартовым кодоном, например, AUG. Трансляция кольцевого полирибонуклеотида может инициироваться альтернативной последовательностью инициации трансляции, такой как описанная в [0164] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления трансляция инициируется путем обработки эукариотического фактора инициации трансляции 4A (eIF4A) с помощью рокаглатов (трансляция подавляется путем блокирования сканирования 43S, что приводит к преждевременной инициации трансляции в вышерасположенном месте и снижению экспрессии белка с транскриптов, несущих последовательность-мишень RocA-eIF4A, см., например, www.nature.com/articles/nature17978).

Нетранслируемые области

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

Иллюстративные нетранслируемые области описаны в параграфах [0197] – [201] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность поли(А). Иллюстративные последовательности поли(А) описаны в параграфах [0202] – [0205] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(А).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит UTR с одним или несколькими отрезками из аденозиновых и уридиновых остатков, встроенными

в нее. Эти AU-богатые сигнатуры могут повышать скорость метаболизма продукта экспрессии.

Введение, удаление или модификация AU-богатых элементов UTR (ARE) могут быть полезными для модулирования стабильности или иммуногенности (например, уровня одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа) кольцевого полирибонуклеотида. При конструировании определенных кольцевых полирибонуклеотидов в кольцевой полирибонуклеотид могут быть введены одна или несколько копий ARE, и копии ARE могут модулировать трансляцию и/или выработку продукта экспрессии. Аналогично, ARE могут быть идентифицированы и удалены или встроены в кольцевой полирибонуклеотид для модулирования внутриклеточной стабильности и, таким образом, влияния на трансляцию и выработку получаемого в результате белка.

Следует понимать, что любая UTR из любого гена может быть включена в состав соответствующих фланкирующих областей кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 5'-UTR, и он является компетентным в отношении экспрессии белка с одной или несколькими его экспрессионными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 3'-UTR, и он является компетентным в отношении экспрессии белка с одной или несколькими его экспрессионными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(A), и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует терминирующий элемент, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует участок внутренней посадки рибосомы, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствуют 5'-UTR, 3'-UTR и IRES, и он является компетентным в отношении экспрессии белка с одной или несколькими его экспрессионными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления кольцевой

полирибонуклеотид содержит одну или несколько из следующих последовательностей: последовательность, которая кодирует одну или несколько miRNA, последовательность, которая кодирует один или несколько репликативных белков, последовательность, которая кодирует экзогенный ген, последовательность, которая кодирует терапевтическое средство, регуляторный элемент (например, модулятор трансляции, например, энхансер или супрессор трансляции), последовательность инициации трансляции, одну или несколько регуляторных нуклеиновых кислот, которые нацеливаются на эндогенные гены (например, siRNA, lncRNA, shRNA), и последовательность, которая кодирует терапевтические mRNA или белок.

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

Терминирующие элементы

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит по меньшей мере один терминирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит терминирующий элемент, функционально связанный с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления в полинуклеотиде отсутствует терминирующий элемент.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и каждая экспрессионная последовательность может содержать или не содержать терминирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и в экспрессионных последовательностях отсутствует терминирующий элемент, так что полирибонуклеотид транслируется непрерывно. Исключение терминирующего элемента может привести к трансляции по типу "катящегося кольца" или непрерывной экспрессии продукта экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и каждая экспрессионная последовательность может содержать или не содержать терминирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и в экспрессионных последовательностях отсутствует терминирующий элемент, так что кольцевой полирибонуклеотид транслируется непрерывно. Исключение терминирующего элемента может приводить к трансляции по типу "катящегося кольца" или к непрерывной экспрессии продукта экспрессии, например, пептидов или полипептидов, ввиду отсутствия задержки или отделения рибосомы. В таком варианте осуществления в результате трансляции по типу "катящегося кольца" экспрессируется непрерывный продукт экспрессии при участии каждой экспрессионной последовательности. В некоторых других вариантах осуществления терминирующий элемент экспрессионной последовательности может быть частью сдвигающего элемента. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей в кольцевом полирибонуклеотиде содержат терминирующий элемент. Однако, осуществляется трансляция по типу "катящегося кольца" или экспрессия следующей (например, второй, третьей, четвертой, пятой и т. д.) экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. В таких случаях продукт экспрессии может отделяться от рибосомы, когда рибосома встречается с терминирующим элементом, например, стоп-кодоном, и трансляция терминируется. В некоторых вариантах осуществления трансляция терминируется, а рибосома, например, по меньшей мере одна субъединица рибосомы, остается в контакте с кольцевым полирибонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит терминирующий элемент на конце одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей содержат два или более последовательно

расположенных терминирующих элемента. В таких вариантах осуществления трансляция терминируется, и трансляция по типу "катящегося кольца" терминируется. В некоторых вариантах осуществления рибосома полностью отсоединяется от кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых таких вариантах осуществления для получения продукта со следующей (например, второй, третьей, четвертой, пятой и т. д.) экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде может потребоваться повторное соединение рибосомы с кольцевым полирибонуклеотидом до инициации трансляции. Как правило, терминирующие элементы предусматривают находящийся внутри рамки нуклеотидный триплет, который сигнализирует о терминации трансляции (например, UAA, UGA, UAG). В некоторых вариантах осуществления один или несколько терминирующих элементов в кольцевом

полирибонуклеотиде представляют собой терминирующие элементы в сдвинутых рамках считывания, например без ограничения терминирующие элементы, находящиеся вне рамки или в сдвинутых на -1 и +1 рамках считывания (например, скрытые стоп-кодона), которые могут терминировать трансляцию. Терминирующие элементы в сдвинутых рамках считывания включают нуклеотидные триплеты TAA, TAG и TGA, которые появляются во второй и третьей рамках считывания экспрессионной последовательности. Терминирующие элементы в сдвинутых рамках считывания могут быть важны для предотвращения неверного считывания mRNA, что часто является пагубным для клетки. В некоторых вариантах осуществления терминирующий элемент представляет собой стоп-кодон.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность содержит последовательность поли(A) (например, на 3'-конце экспрессионной последовательности, например, в направлении 3' по отношению к терминирующему элементу). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(A) составляет более 10 нуклеотидов. В одном варианте осуществления длина последовательности поли(A) составляет более 15 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более чем приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500 и 3000 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) сконструирована в соответствии с описаниями последовательности поли(A) в [0202] – [0204] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления

экспрессионная последовательность не содержит последовательность поли(А) (например, на 3'-конце экспрессионной последовательности).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит поли(А), не содержит поли(А) или имеет модифицированную поли(А) для модулирования одной или нескольких характеристик кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, в котором отсутствует поли(А) или который содержит модифицированную поли(А), имеет одну или несколько улучшенных функциональных характеристик, например, иммуногенность (например, уровень одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа), период полужизни и/или эффективность экспрессии.

Дополнительные примеры терминирующих элементов описаны в параграфах [0169] – [0170] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Спейсерные последовательности

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит одну или несколько спейсерных последовательностей. Спейсер относится к любой непрерывной нуклеотидной последовательности (например, из одного или нескольких нуклеотидов), которая обеспечивает наличие расстояния или эластичности между двумя расположенными рядом полинуклеотидными областями. Спейсеры могут находиться между любыми из элементов нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе. Спейсер также может присутствовать в элементе нуклеиновой кислоты, описанном в данном документе.

Длина спейсера может составлять, например, по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20) рибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой спейсерной области составляет по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20) рибонуклеотидов. Длина каждой спейсерной области может составлять, например, от 5 до 500 (например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500) рибонуклеотидов. Первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область могут содержать последовательность поли(А). Первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область могут содержать последовательность поли(А-С). В некоторых вариантах осуществления первая спейсерная

область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область содержат последовательность поли(A-G). В некоторых вариантах осуществления первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область содержат последовательность поли(A-T). В некоторых вариантах осуществления первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область содержат случайную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности может составлять, например, по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 15 нуклеотидов или по меньшей мере 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности составляет не более 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности составляет от 20 до 50 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина спейсерной последовательности составляет 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов.

Спейсерные последовательности могут представлять собой последовательности поли(A), последовательности поли(A-C), последовательности поли(C) или последовательности поли(U).

В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности могут представлять собой последовательность поли(A-T), поли(A-C), поли(A-G) или случайную последовательность.

Иллюстративные спейсерные последовательности описаны в параграфах [0293] – [0302] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Модификации

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько замен, вставок и/или добавлений, делеций и ковалентных модификаций относительно эталонных последовательностей, в частности, исходного полирибонуклеотида, которые включены в объем настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько посттранскрипционных модификаций (например, кэпирование, расщепление, полиаденилирование, сплайсинг, последовательность поли(A),

метилование, ацилирование, фосфорилирование, метилирование остатков лизина и аргинина, ацетилирование и нитрозилирование тиольных групп и остатков тирозина и т. п.). Одна или несколько посттранскрипционных модификаций могут представлять собой любую посттранскрипционную модификацию, такую как любая из более чем ста отличающихся модификаций нуклеозидов, которые были идентифицированы в РНК (Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999, с обновлениями. Nucl Acids Res 27: 196-197). В некоторых вариантах осуществления первая выделенная нуклеиновая кислота предусматривает матричную РНК (mRNA). В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеозид, выбранный из группы нуклеозидов, такой как нуклеозиды, описанные в [0311] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать любую полезную модификацию, такую как модификация сахарного фрагмента, нуклеинового основания или межнуклеозидной связи (например, фосфатного остатка, образующего связь/фосфодиэфирной связи/фосфодиэфирного остова). Один или несколько атомов пиримидинового нуклеинового основания могут быть заменены или замещены необязательно замещенным амином, необязательно замещенным тиолом, необязательно замещенным алкилом (например, метилом или этилом) или галогеном (например, хлором или фтором). В определенных вариантах осуществления модификации (например, одна или несколько модификаций) присутствуют в каждом сахарном фрагменте и каждой межнуклеозидной связи. Модификации могут представлять собой модификации по типу замены рибонуклеиновых кислот (РНК) на дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), треозо-нуклеиновые кислоты (ТНА), гликоль-нуклеиновые кислоты (ГНА), пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA), запертые нуклеиновые кислоты (LNA) или их гибридные формы. Дополнительные модификации описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну N(6)-метиладенозиновую модификацию (m6A) для повышения эффективности трансляции. В некоторых вариантах осуществления модификация m6A может обеспечивать снижение иммуногенности (например, снижение уровня одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа) кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления модификация может включать модификацию, индуцированную химическим путем или в клетке. Например, некоторые неограничивающие примеры модификаций внутриклеточной РНК описаны Lewis и Pan в

"RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions" в Nat Reviews Mol Cell Biol, 2017, 18:202-210.

В некоторых вариантах осуществления химические модификации рибонуклеотидов кольцевого полирибонуклеотида могут приводить к усилению ускользания от иммунологического надзора. Кольцевой полирибонуклеотид может быть синтезирован и/или модифицирован с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, таких как описанные в работе "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование (моно-, ди- и три-), конъюгирование, инвертированные связи и т. п.), 3'-концевые модификации (конъюгирование, ДНК-нуклеотиды, инвертированные связи и т. п.), модификации оснований (например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары оснований с расширенным спектром партнеров), удаление оснований (нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями) или конъюгированные основания. Модифицированные рибонуклеотидные основания также могут включать 5-метилцитидин и псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модификации оснований могут приводить к модулированию экспрессии, иммунного ответа, стабильности, субклеточной локализации в числе прочих функциональных эффектов в отношении кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления модификация включает биортогональный нуклеотид, например, неприродное основание. См., например, работу Kimoto et al, Chem Commun (Camb), 2017, 53:12309, DOI: 10.1039/c7cc06661a, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления модификации сахарного фрагмента (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замена сахарного фрагмента одним или несколькими рибонуклеотидами кольцевого полирибонуклеотида могут, так же как и модификации остова, включать модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры кольцевого полирибонуклеотида включают без ограничения кольцевой полирибонуклеотид, содержащий модифицированные остовы или не содержащий природных межнуклеозидных связей, как, например, имеющий модификации межнуклеозидных связей, в том числе модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Кольцевые полирибонуклеотиды, имеющие модифицированные остовы, включают, среди прочих, те, которые не имеют атома фосфора в остове. Для целей настоящей заявки и, как иногда упоминается в уровне техники, модифицированные РНК, которые не имеют атома

фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут рассматриваться как олигонуклеозиды. В конкретных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид будет содержать рибонуклеотиды с атомом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы кольцевых полирибонуклеотидов могут включать, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, как, например, 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, такие как 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их аналоги, содержащие 2'-5'-связи, а также те, которые характеризуются инвертированной полярностью, где расположенные рядом пары нуклеозидных звеньев связаны в направлении от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть отрицательно или положительно заряжен.

Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в состав кольцевого полирибонуклеотида, могут иметь модификацию межнуклеозидной связи (например, фосфатного остова). В данном документе применительно к полинуклеотидному остову фразы "фосфат" и "фосфодиаэфир" используются взаимозаменяемо. Фосфатные группы остова могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких атомов кислорода отличающимся заместителем. Кроме того, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут содержать полную замену немодифицированного фосфатного компонента другой межнуклеозидной связью, как описано в данном документе. Примеры модифицированных фосфатных групп включают без ограничения фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные сложные эфиры, гидрофосфонаты, фосфорамидаты, фосфородиамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. В фосфодитиоатах оба атома кислорода, не участвующих в образовании связи, замещены атомами серы. Фосфатный линкер также может быть модифицирован путем замены атома кислорода, участвующего в образовании связи, атомом азота (мостиковые фосфорамидаты), серы (мостиковые фосфоротиоаты) и углерода (мостиковые метиленфосфонаты).

α-тиозамещенный фосфатный компонент предусмотрен для придания стабильности РНК- и ДНК-полимерам посредством неприродных связей фосфоротиоатного остова. Фосфоротиоатная ДНК и РНК характеризуются повышенной устойчивостью к действию нуклеаз и, как следствие, более длительным периодом полужизни в клеточной среде.

Фосфоротиоат, соединенный с кольцевым полирибонуклеотидом, как ожидается, будет приводить к ослаблению врожденного иммунного ответа благодаря более слабому связыванию/активации молекул врожденного клеточного иммунитета.

В конкретных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид включает альфа-тионуклеозид (например, 5'-0-(1-тиофосфат)-аденозин, 5'-0-(1-тиофосфат)-цитидин (α-тиоцитидин), 5'-0-(1-тиофосфат)-гуанозин, 5'-0-(1-тиофосфат)-уридин или 5'-0-(1-тиофосфат)-псевдоуридин).

Другие межнуклеозидные связи, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, в том числе межнуклеозидные связи, которые не содержат атом фосфора, описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать один или несколько цитотоксических нуклеозидов. Например, цитотоксические нуклеозиды могут быть включены в состав кольцевого полирибонуклеотида, например, в качестве бифункциональной модификации. Цитотоксический нуклеозид может включать без ограничения аденозинарабинозид, 5-азацитидин, 4'-тиоарацитидин, циклопентенилцитозин, кладрибин, клофарабин, цитарабин, цитозинарабинозид, 1-(2-С-циано-2-дезоксид-β-D-арабинопентофуранозил)-цитозин, децитабин, 5-фторурацил, флударабин, флоксуридин, гемцитабин, комбинацию тегафура и урацила, тегафур ((RS)-5-фтор-1-(тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H-дион)), троксацитабин, тезацитабин, 2'-дезоксид-2'-метилиденцитидин (DMDC) и 6-меркаптопурин. Дополнительные примеры включают фосфат флударабина, N4-бегеноил-1-β-D-арабинофуранозилцитозин, N4-октадецил-1-β-D-арабинофуранозилцитозин, N4-пальмитоил-1-(2-С-циано-2-дезоксид-β-D-арабинопентофуранозил) цитозин и P-4055 (сложный эфир цитарабина и 5'-элаидиновой кислоты).

Кольцевой полирибонуклеотид может быть или не быть однородно модифицированным по всей длине молекулы. Например, один или несколько или все типы нуклеотидов (например, встречающиеся в природе нуклеотиды, пуриновые или пиримидиновые или любые один или несколько или все из A, G, U, C, I, pU) могут быть или не быть однородно модифицированными в кольцевом полирибонуклеотиде или в заданной предварительно определенной области его последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит инозин, который может способствовать определению иммунной системой кольцевого полирибонуклеотида как эндогенного по сравнению с вирусными РНК. Включение инозина также может опосредовать улучшение стабильности/снижение уровня

разрушения РНК. См., например, работу Yu, Z. et al. (2015) RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as "self". Cell Res. 25, 1283–1284, включенную посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в кольцевом полирибонуклеотиде (или в указанной области его последовательности) являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления модификация может включать m6A, который может усиливать экспрессию; инозин, который может ослаблять иммунный ответ; псевдоуридин, который может повышать стабильность РНК или обеспечивать сквозное прочтение при трансляции (сдвигающий элемент), m5C, который может обеспечивать повышение стабильности; а также 2,2,7-триметилгуанозин, который способствует субклеточной транслокации (например, ядерной локализации).

Отличающиеся модификации сахарного фрагмента, модификации нуклеотидов и/или межнуклеозидных связей (например, структур остова) могут существовать в различных положениях в кольцевом полирибонуклеотиде. Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что аналоги нуклеотидов или другие модификации могут быть расположены в любом(любом) положении(положениях) кольцевого полирибонуклеотида, так чтобы функция кольцевого полирибонуклеотида по сути не снижалась. Модификация также может представлять собой модификацию некодирующей области. Кольцевой полирибонуклеотид может содержать от приблизительно 1% до приблизительно 100% модифицированных нуклеотидов (по отношению к общему содержанию нуклеотидов либо по отношению к одному или нескольким типам нуклеотидов, т. е. любому одному или нескольким из А, G, U или C) или любую процентную долю в этом промежутке (например, от 1% до > 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от % до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%, от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 100% и от 95% до 100%).

Мультимеризация

В определенных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может кодировать домен мультимеризации. Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать первый полипептид, который представляет собой иммуноген (например,

иммуноген VZV), и второй полипептид, который представляет собой домен мультимеризации. Например, домен мультимеризации может кодироваться в той же открытой рамке считывания, что и иммуноген (например, иммуноген VZV), и экспрессироваться в виде белка, слитого с иммуногеном. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может кодировать два или более иммуногенов, и каждый иммуноген необязательно может быть слит с доменом мультимеризации. Домен мультимеризации может способствовать образованию иммуногенных комплексов (например, комплекса, содержащего множество иммуногенов).

Мультимеризация кодируемого иммуногена может быть полезной для индукции иммунного ответа. Слияние иммуногена с одним или несколькими элементами мультимеризации (например, элементами димеризации, элементами тримеризации, элементами тетрамеризации и элементами олигомеризации) может приводить к образованию мультимерного иммуногенного комплекса (например, образованию мультимерного иммуногенного комплекса после экспрессии у иммунизированного субъекта). В некоторых вариантах осуществления образование мультимерного иммуногенного комплекса обеспечивает повышение иммуногенности иммуногена. Например, образование мультимерного иммуногенного комплекса может обеспечивать повышение иммуногенности иммуногена посредством имитации инфекции экзогенным патогеном (например, вирусом), где множество потенциальных иммуногенов обычно расположено на оболочке патогена (например, иммуноген гемагглютинина (HA) вируса гриппа). В некоторых вариантах осуществления комплекс мультимеризации содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный комплекс содержит от 2 до 10, от 2 до 50, от 2 до 100, от 5 до 10, от 5 до 15, от 5 до 20, от 5 до 50, от 5 до 100, от 10 до 20, от 10 до 30, от 10 до 40, от 10 до 50, от 10 до 60, от 10 до 100, от 20 до 50 или от 20 до 100 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный комплекс содержит 6 копий иммуногена (например, кольцевой полирибонуклеотид кодирует слитый белок иммуноген-домен сборки-иммуноген). В некоторых вариантах осуществления иммуногенный комплекс содержит 24 копии иммуногена (например, кольцевой полирибонуклеотид кодирует слитый белок иммуноген-ферритин). В некоторых вариантах осуществления иммуногенный комплекс содержит 60 копий иммуногена (например, кольцевой полирибонуклеотид кодирует слитый белок иммуноген-AaLS или кодирует иммуноген- β -кольцеобразный пептид).

При использовании в комбинации с представляющим интерес полипептидным иммуногеном в контексте настоящего изобретения такие элементы мультимеризации

могут быть расположены в направлении N-конца или C-конца относительно представляющего интерес полипептида. На уровне нуклеиновой кислоты кодирующая последовательность для такого элемента мультимеризации обычно располагается в той же рамке считывания в направлении 5'- или 3'-конца относительно кодирующей последовательности для представляющего интерес полипептида или белка.

Домен мультимеризации может содержать от 10 до 500 аминокислотных остатков (например, от 10 до 450, от 10 до 400, от 10 до 350, от 10 до 300, от 10 до 250, от 10 до 200, от 10 до 150, от 10 до 100, от 10 до 50, от 50 до 500, от 100 до 500, от 150 до 500, от 200 до 500, от 250 до 500, от 300 до 500, от 350 до 500, от 400 до 500 и от 450 до 500 остатков). В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации может содержать от 20 до 2500 аминокислотных остатков (например, от 20 до 250, от 20 до 225, от 20 до 200, от 20 до 175, от 20 до 150, от 20 до 150, от 20 до 125, от 20 до 100, от 20 до 75, от 20 до 50, от 50 до 250, от 75 до 250, от 100 до 250, от 125 до 250, от 150 до 250, от 175 до 250, от 200 до 250 и от 225 до 250 остатков).

В некоторых вариантах осуществления иммуноген, слитый с доменом мультимеризации, является в по меньшей мере 2 раза, 5 раз или 10 раз более иммуногенным, чем иммуноген (например, у субъекта-человека). В некоторых вариантах осуществления иммуноген, слитый с доменом мультимеризации, является на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% или 500% более иммуногенным (например, у субъекта-человека), чем иммуноген, не слитый с доменом мультимеризации.

Конкретные элементы мультимеризации представляют собой элементы олигомеризации, элементы тетрамеризации, элементы тримеризации или элементы димеризации. Элементы димеризации могут быть выбраны, например, из элементов/доменов димеризации белков теплового шока, Fc-доменов иммуноглобулинов и лейциновых застежек (доменов димеризации класса транскрипционных факторов с лейциновой застежкой и основной областью). Элементы тримеризации и тетрамеризации могут быть выбраны, например, из сконструированных лейциновых застежек (сконструированного пептида, представляющего собой суперспираль на основе α -спирали, который принимает состояние параллельно расположенных тримеров), домена сборки фибритина из фага T4 энтеробактерий, GCN4pII, CCN4-pLI и p53. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит домен сборки T4. В конкретных вариантах осуществления домен сборки T4 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 48). В некоторых вариантах

осуществления домен сборки T4 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой β -кольцеобразный пептид (см. Matsuura et al. (2010), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49: 9662-9665). В некоторых вариантах осуществления β -кольцеобразный пептид имеет аминокислотную последовательность INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS (SEQ ID NO: 49), где С-концевой остаток серина необязательно присутствует или отсутствует, или имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает пептид AaLS. В конкретных вариантах осуществления пептид AaLS имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична TDILGKYVINYLNKLKKEIDIFKEFLKW (SEQ ID NO: 50). В некоторых вариантах осуществления пептид AaLS имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

Элементы олигомеризации могут быть выбраны, например, из ферритина, поверхностно-активного вещества D, доменов олигомеризации из фосфопротеинов парамиксовирусов, доменов олигомеризации ингибитора системы комплемента, представляющего собой С4-связывающий белок (С4bp), домена олигомеризации фактора вирусной инфекционности (Vif), домена стерильного альфа-мотива (SAM) и домена типа D фактора фон Виллебранда.

Ферритин образует олигомеры и является высококонсервативным белком, встречающимся у всех животных, бактерий и растений. Ферритин представляет собой белок, который спонтанно образует наночастицы из 24 идентичных субъединиц. Слитые конструкции ферритин-иммуноген потенциально образуют олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает домен ферритина. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает домен ферритина, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

DIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYENAKKLIVFLNE
 NNVPVQLTSISAPENKFESLTQIFQKAYENEQHISESINNIVDHAIKGKDHATFNFLQWYV
 SEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS (SEQ ID NO: 51).

Белок "поверхностно-активное вещество D" (SPD) представляет собой гидрофильный гликопротеин, который осуществляет спонтанную самосборку с образованием олигомеров. Слитая конструкция SPD-иммуноген может образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ.

Фосфопротеин парамиксовирусов (вирусов со смысловой РНК отрицательной полярности) функционирует как транскрипционный трансактиватор вирусной полимеразы. Олигомеризация фосфопротеина важна для репликации вирусного генома. Слитые конструкции фосфопротеин-иммуноген могут образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ.

Ингибитор системы комплемента, представляющий собой С4-связывающий белок (С4bp), также может использоваться в качестве партнера по слиянию для получения агрегатов олигомерных иммуногенов. С-концевой домен С4bp (57 аминокислотных остатков у людей и 54 аминокислотных остатка у мышей) является необходимым и достаточным для олигомеризации С4bp или других полипептидов, слитых с ним. Слитые конструкции С4bp-иммуноген могут образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ. Было показано, что домен мультимеризации фактора вирусной инфекционности (Vif) образует олигомеры как *in vitro*, так и *in vivo*. Олигомеризация Vif предусматривает картирование последовательности между остатками от 1 51 до 1 64 в С-концевом домене, 1 61 мотива 64 PPLP1 (для HIV-1 человека: TPKKIKPPLP (SEQ ID NO: 52)). Слитые конструкции Vif-иммуноген могут образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ.

Домен стерильного альфа-мотива (SAM) представляет собой модуль белкового взаимодействия, присутствующий в широком спектре белков, участвующих во многих биологических процессах. Домен SAM, занимающий около 70 остатков, встречается в различных эукариотических организмах. Было показано, что домены SAM гомо- и гетероолигомеризуются, образуя множественные самоассоциирующиеся олигомерные архитектуры. Слитая конструкция SAM-иммуноген может образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ. Фактор фон Виллебранда (vWF) содержит несколько доменов типа D: D1 и D2 присутствуют в N-концевом пропептиде, в то время как оставшиеся D-домены требуются для олигомеризации. Домен vWF содержится в различных белках плазмы крови: факторах комплемента B, C2, C3 и CR4; интегринах (I-доменах); коллагенах типов VI, VII, XII и XIV, а также других внеклеточных белках. Слитые конструкции vWF-иммуноген могут образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой домен люмазинсинтазы. Люмазинсинтаза может собираться в комплекс, содержащий 60 копий домена люмазинсинтазы, где каждый домен люмазинсинтазы может быть слит с

одним или несколькими иммуногенами. В некоторых вариантах осуществления домен люмазинсинтазы содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 53-63 и 142 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 53-63 и 142.

SEQ ID NO: 53

MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 54

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGCIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKCWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 55

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 56

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 142

MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
IPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADT
LEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

Домены люмазинсинтазы содержат одну или несколько цистеиновых замен для введения ненативной(-ых) дисульфидной(-ых) связи(-ей), которая(-ые) стабилизирует(-ют) комплекс люмазинсинтазы, образованный из полученных в результате самосборки субъединиц. В некоторых вариантах осуществления ненативную(-ые) дисульфидную(-ые) связь(-и) вводят с помощью замен L121C-K131C, L121CG-K131C, L121GC-K131C, K7C-R40C, I3C-L50C, I82C-K131CG, E5C-R52C или E95C-A101C или их комбинации (такой как I3C-L50C и I82C-K131CG; E5C-R52C и I82C-K131CG или E95C-A101C и I82C-K131CG). Нумерация остатков приведена со ссылкой на субъединицу люмазинсинтазы, представленную под SEQ ID NO: 53. Неограничивающие примеры включают следующее:

SEQ ID NO: 57 (L121C-K131C)

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCE
QAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 58 (L121CG-K131C)

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCC
FEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 59 (L121GC-K131C)

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCF
CEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 60 (K7C-R40C)

QIYEGCLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVCHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 61 (I3C-L50C, I82C-K131CG)

QCYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITCVRVPGSWEI
PVAAGELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADT
LEQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 62 (E5C-R52C, I82C-K131CG)

QIYCGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVCVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTL
EQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 63 (E95C-A101C, I82C-K131CG)

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASCVSKGLCDLSLELRKPITFGVITADTL
EQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

Различные способы мультимеризации полипептидов описаны в международной публикации № WO2020/061564, страница 25, строка 1 - страница 26, строка 20, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой домен рибофлавинсинтазы. Например, домен рибофлавинсинтазы может иметь аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с TDILGKYVINYLNLKLLKKKEDIFKEFLKW (SEQ ID

NO: 143). В некоторых вариантах осуществления домен рибофлавинсинтазы может иметь аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать один или несколько доменов мультимеризации. Например, кольцевой полирибонуклеотид может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит два домена мультимеризации. Два или более доменов мультимеризации могут быть расположены рядом друг с другом. В качестве альтернативы два или более доменов мультимеризации могут быть отделены одним или несколькими другими элементами. Например, два домена мультимеризации могут быть отделены иммуногеном. В конкретных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать домен ферритина и домен сборки T4. Домен ферритина и домен сборки T4 могут быть связаны, например, посредством линкера Gly-Ser. В некоторых вариантах осуществления домен ферритина, связанный с доменом сборки T4, имеет следующую аминокислотную последовательность:

PGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLSGRSGGDIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSM
SSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVQVQLTSSISAPENKFESLTQIF
QKAYENEQHISESINNIVDHAIKGKDHATFNFLQWYVSEQHEEEVLFKDILDKIELIGNE
NHGLYLADQYVKGIAKSRKS (SEQ ID NO: 64).

Подходящие домены мультимеризации могут быть выбраны, например, из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1116-1167 из международной заявки на патент WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей.

Способы получения

В настоящем изобретении представлены способы получения кольцевых полирибонуклеотидов, включая, например, рекомбинантную технологию или химический синтез. Например, молекула ДНК, используемая для получения кольцевой РНК, может содержать последовательность ДНК из встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты, ее модифицированный вариант или последовательность ДНК, кодирующую синтетический полипептид, обычно не встречающийся в природе (например, химерные молекулы или слитые белки). Молекулы ДНК и РНК могут быть модифицированы с использованием различных методик, в том числе без ограничения классических методик мутагенеза и рекомбинантных методик, таких как сайт-направленный мутагенез, химическая обработка молекулы нуклеиновой кислоты с целью индукции мутаций, расщепление фрагмента нуклеиновой кислоты ферментом рестрикции,

лигирование фрагментов нуклеиновой кислоты, амплификация посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) или мутагенез выбранных областей последовательности нуклеиновой кислоты, синтез смесей олигонуклеотидов и лигирование групп смесей для "создания" смеси молекул нуклеиновой кислоты и их комбинаций.

Кольцевые полирибонуклеотиды могут быть получены в соответствии с любой доступной методикой, в том числе без ограничения посредством химического синтеза и ферментативного синтеза. В некоторых вариантах осуществления линейную первичную конструкцию или линейную РНК можно подвергнуть циклизации или конкатемеризации с созданием *circRNA*, описанной в данном документе. Механизм циклизации или конкатемеризации можно осуществлять посредством таких способов, как, например, химические, ферментативные способы, способы лигирования с помощью шунта или рибозимного катализа. Новообразовавшаяся 5'-3'-связь может представлять собой внутримолекулярную связь или межмолекулярную связь. Например, для лигирования с помощью шунта может использоваться лигаза для шунта, такая как лигаза SplintR®. В соответствии с этим способом однонитевой полинуклеотид (шунт), такой как однонитевая ДНК или РНК, можно сконструировать для гибридизации с обоими концами линейного полирибонуклеотида, так что эти два конца могут быть расположены рядом друг с другом при гибридизации с однонитевым шунтом. Таким образом, лигаза для шунта может катализировать лигирование двух концов линейного полирибонуклеотида, расположенных рядом друг с другом, с образованием *circRNA*. В некоторых вариантах осуществления при синтезе кольцевых полинуклеотидов можно использовать ДНК- или РНК-лигазу. В качестве неограничивающего примера, лигаза может представлять собой *CircLigase* или лигазу для циркуляризации.

В другом примере 5'- либо 3'-конец линейного полирибонуклеотида может кодировать последовательность рибозима с лигазной активностью, так что в ходе транскрипции *in vitro* получаемая в результате линейная *circRNA* содержит последовательность активного рибозима, способную обеспечивать лигирование 5'-конца линейного полирибонуклеотида с 3'-концом линейного полирибонуклеотида. Рибозим с лигазной активностью может быть получен из интрона группы I, вируса гепатита дельта, рибозима, содержащего шпильку, или может быть выбран с помощью SELEX (систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением).

В другом примере линейный полирибонуклеотид может быть подвергнут циклизации или конкатемеризации с использованием по меньшей мере одного компонента, отличного от нуклеиновой кислоты. Например, по меньшей мере один компонент, отличный от

нуклеиновой кислоты, может вступать в реакцию с областями или элементами вблизи 5'-конца или вблизи 3'-конца линейного полирибонуклеотида для циклизации или конкатемеризации линейного полирибонуклеотида. В другом примере по меньшей мере один компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может быть расположен на 5'-конце или 3'-конце линейного полирибонуклеотида, или быть связан с ним, или находиться вблизи него. Компоненты, отличные от нуклеиновой кислоты, могут быть гомологичными или гетерологичными. В качестве неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой связь, такую как гидрофобная связь, ионная связь, биоразрушаемая связь или расщепляемая связь. В качестве другого неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, представляет собой лигирующий компонент. В качестве еще одного неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой олигонуклеотидный или пептидный компонент, такой как аптамер или линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, описанный в данном документе.

В другом примере линейные полирибонуклеотиды могут быть подвергнуты циклизации или конкатемеризации посредством самосплайсинга. В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды могут содержать последовательность петли E для самолигирования. В другом варианте осуществления линейные полирибонуклеотиды могут содержать самоциркуляризирующийся интрон, например, 5'- и 3'-границы сплайсинга, или самоциркуляризирующийся каталитический интрон, такой как интроны группы I, группы II или группы III. Неограничивающие примеры последовательностей самосплайсирующихся интронов группы I могут включать самосплайсирующиеся последовательности с циклическими перестановками интронов и экзонов, полученные из гена *td* бактериофага T4, и вставочную последовательность (IVS) rRNA *Tetrahymena*, ген пре-tRNA-Leu цианобактерии рода *Anabaena* или пре-rRNA *Tetrahymena*.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид может содержать фрагменты каталитического интрона, такие как фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I. Первая и вторая области отжига могут быть размещены в пределах фрагментов каталитического интрона. Каталитические интроны группы I представляют собой самосплайсирующиеся рибозимы, которые катализируют их собственное вырезание из предшественников mRNA, tRNA и rRNA посредством механизма переноса фосфорила ионами двух металлов. Важно отметить, что РНК как

таковая осуществляет самокатализ удаления интронов без необходимости применения экзогенного фермента, такого как лигаза.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, получены из гена пре-tRNA-Leu цианобактерии рода *Anabaena* или пре-tRNA *Tetrahymena*.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, получены из гена пре-tRNA-Leu цианобактерии рода *Anabaena*, и 3'-фрагмент экзона содержит первую область отжига, и 5'-фрагмент экзона содержит вторую область отжига. Первая область отжига может содержать, например, от 5 до 50, например, от 10 до 15 (например, 10, 11, 12, 13, 14 или 15) рибонуклеотидов, и вторая область отжига может содержать, например, от 5 до 50, например, от 10 до 15 (например, 10, 11, 12, 13, 14 или 15) рибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, получены из пре-tRNA *Tetrahymena*, и фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит первую область отжига, и 5'-фрагмент экзона содержит вторую область отжига. В некоторых вариантах осуществления 3'-экзон содержит первую область отжига, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит вторую область отжига. Первая область отжига может содержать, например, от 6 до 50, например, от 10 до 16 (например, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16) рибонуклеотидов, и вторая область отжига может содержать, например, от 6 до 50, например, от 10 до 16 (например, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16) рибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, получены из гена пре-tRNA-Leu цианобактерии рода *Anabaena*, пре-tRNA *Tetrahymena* или гена td фага T4.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и 5'-фрагмент каталитического интрона группы I получены из гена td фага T4. 3'-фрагмент экзона может содержать первую область отжига, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, может содержать вторую область отжига. Первая область отжига может содержать, например, от 2 до 16, например, 10-16 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15

или 16) рибонуклеотидов, и вторая область отжига может содержать, например, от 2 до 16, например, 10-16 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16) рибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, представляет собой 5'-конец линейного полинуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, представляет собой 3'-конец линейного полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AACAACAGATAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGAGCTACCCT
AACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGTCCAATTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAA
GCTGCGGGAATG-3' (SEQ ID NO: 124).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGA
AACSTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAG
TAAGTT-3' (SEQ ID NO: 125).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 124, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

СТТСТГТТГАТАТГГАТГСАГТТСАСАГАСТАААТГТСГГТСГГГГААГАТГТАТТС
ТТТСАТААГАТАТАГТСГГАСТТСТСТТААТГГГАГСТАГСГГАТГААГТГАТГС
АААСТГГАГССГТГГГААСТААТТТГТАТГСАААГАТАТАТТГАТТАГТТТТГГА
ГТАСТСГ-3' (SEQ ID NO: 126).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AAATAGCAATATTTACSTTTGGAGGGAAAAGTTATCAGGCATGCACCTGGTAGCTA
GTCTTTAAACCAATAGATTGCATCGGTTTAAAAGGCAAGACCGTCAAATTGCGGGA
AAGGGGTCAACAGCCGTTTCAGTACCAAGTCTCAGGGGAAACTTTGAGATGGCCTTG
CAAAGGGTATGGTAATAAGCTGACGGACATGGTCCTAACCACGCAGCCAAGTCCTA
AGTCAACAGAT-3' (SEQ ID NO: 127).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 126, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 127.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

GGTTCTACATAAATGCCTAACGACTATCCSTTTGGGGAGTAGGGTCAAGTGACTCGA
AACGATAGACAACCTTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGCTCTGCATGGTGACA
TGCAGCTGGATATAATTCCGGGGTAAGATTAACGACSTTATCTGAACATAATG-3'
(SEQ ID NO: 128).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

TAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTAATCTATCTAAACGGGGAACC
TCTCTAGTAGACAATCCCGTGCTAAATTGTAGGACT-3' (SEQ ID NO: 129).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 128, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 129.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

TAAACAACATAACAGCTTTAGAAAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTTCAGCCGAGGGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAGAATGAAAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCA-3' (SEQ ID NO: 130).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ACGGTAGACGCAGCGGACTTAGAAAACCTGGGCCTCGATCGCGAAAGGGATCGAGTGGCAGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAAACCTTTAAACATTMAAGTCATGGCAATCC TGAGCCAAGCTAAAGC-3' (SEQ ID NO: 131).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 130, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

TTAAACTCAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAAGGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCACC-3' (SEQ ID NO: 132).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACCTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTGGAAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCSAAGCCAGAAAATTTAGACTTGAGATTTGATTTGGAG-3' (SEQ ID NO: 133).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 132, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACG
GGAGCTACCCTAACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTTAAAGCCTG
AAGTTGTGCAAGCAACAAGGCAACAGTGAAAGCTGTGGAAGAATGAAAATCCGTTG
ACCTTAAACGGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCACCACC-3' (SEQ ID NO: 134).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTG
GAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGC
CAAGCCCGGAAATTTTAGAATCAAGATTTTATTTT-3' (SEQ ID NO: 135).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 134, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTAAAGGCGAG
GGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAG
ATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAA
AAAAACAATAA-3' (SEQ ID NO: 136).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTAAAGGCGAG
GGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAG
ATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAA
AAAAACAATAA-3' (SEQ ID NO: 137).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 136, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGTTCAAGTCCCTCCACCCCA-3' (SEQ ID NO: 138).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAGTAAGTT-3' (SEQ ID NO: 139).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 138, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AACAACAGATAACTTACTAGTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCA-3' (SEQ ID NO: 140).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCT
CTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC
GAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3' (SEQ ID NO: 141).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 140, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 141.

В другом примере линейный полирибонуклеотид может быть подвергнут циклизации или конкатемеризации благодаря компоненту, отличному от нуклеиновой кислоты, который вызывает притяжение между атомами, молекулярными поверхностями, расположенными на 5'- и 3'-концах линейного полирибонуклеотида, находящимися вблизи них или связанными с ними. Один или несколько линейных полирибонуклеотидов могут быть подвергнуты циклизации или конкатемеризации благодаря межмолекулярным силам или внутримолекулярным силам. Неограничивающие примеры межмолекулярных сил включают силы взаимодействия диполь-диполь, силы взаимодействия диполь-индуцированный диполь, силы взаимодействия индуцированный диполь-индуцированный диполь, ван-дер-ваальсовы силы и лондоновские дисперсионные силы.

Неограничивающие примеры внутримолекулярных сил включают ковалентные связи, металлические связи, ионные связи, резонансные связи, агостические связи, диполярные связи, конъюгацию, гиперконъюгацию и антисвязывание.

В другом примере линейный полирибонуклеотид может содержать последовательность РНК-рибозима вблизи 5'-конца и вблизи 3'-конца. Последовательность РНК-рибозима может образовывать ковалентную связь с пептидом, когда его последовательность подвергается воздействию остальной части рибозима. Пептиды, ковалентно связанные с последовательностью РНК-рибозима вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут ассоциировать друг с другом, за счет чего обеспечивается циклизация или конкатемеризация линейного полирибонуклеотида. В другом примере пептиды, ковалентно связанные с РНК-рибозимом вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут обеспечивать циклизацию или конкатемеризацию линейной первичной конструкции или линейной mRNA после их лигирования с использованием различных способов, известных из уровня техники, таких как без ограничения лигирование белков. Неограничивающие примеры рибозимов для использования в линейных первичных конструкциях или линейных полирибонуклеотидах по настоящему изобретению или неисчерпывающий перечень способов включения или ковалентного связывания пептидов описаны в заявке на патент США № US20030082768,

содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

В другом примере кольцевой полирибонуклеотид может быть получен с использованием дезоксирибонуклеотидной матрицы, транскрибируемой в бесклеточной системе (например, посредством транскрипции *in vitro*) с получением линейной РНК. Из линейного полирибонуклеотида получают способный к сплайсингу полирибонуклеотид, который может быть подвергнут самосплайсингу с получением кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения кольцевого полирибонуклеотида (например, в бесклеточной системе) путем получения линейного полирибонуклеотида и обеспечения самосплайсинга линейного полирибонуклеотида в условиях, подходящих для сплайсинга 3'- и 5'-сайтов сплайсинга линейного полирибонуклеотида, с получением таким образом кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения кольцевого полирибонуклеотида путем получения дезоксирибонуклеотида, кодирующего линейный полирибонуклеотид, обеспечения транскрипции дезоксирибонуклеотида в бесклеточной системе с получением линейного полирибонуклеотида; необязательно очистки способного к сплайсингу линейного полирибонуклеотида и обеспечения самосплайсинга линейного полирибонуклеотида в условиях, подходящих для сплайсинга 3'- и 5'-сайтов сплайсинга линейного полирибонуклеотида, с получением таким образом кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения кольцевого полирибонуклеотида путем получения дезоксирибонуклеотида, кодирующего линейный полирибонуклеотид, обеспечения транскрипции дезоксирибонуклеотида в бесклеточной системе с получением линейного полирибонуклеотида, где транскрипция осуществляется в растворе в условиях, подходящих для сплайсинга 3'- и 5'-сайтов сплайсинга линейного полирибонуклеотида, с получением таким образом кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах

осуществления линейный полирибонуклеотид содержит 5'-расщепленный интрон и 3'-расщепленный интрон (например, самосплайсирующуюся конструкцию для получения кольцевого полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит 5'-область отжига и 3'-область отжига.

Подходящие условия для процессов транскрипции *in vitro* и или самосплайсинга могут включать любые условия (например, раствор или буфер, такой как водный буфер или раствор), которые имитируют физиологические условия в одном или нескольких отношениях. В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают 0,1-100 мМ ионов Mg^{2+} или их соли (например, 1-100 мМ, 1-50 мМ, 1-20 мМ, 5-50 мМ, 5-20 мМ или 5-15 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают 1-1000 мМ ионов K^{+} или их соли, такой как KCl (например, 1-1000 мМ, 1-500 мМ, 1-200 мМ, 50-500 мМ, 100-500 мМ или 100-300 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают 1-1000 мМ ионов Cl^{-} или их соли, такой как KCl (например, 1-1000 мМ, 1-500 мМ, 1-200 мМ, 50-500 мМ, 100-500 мМ или 100-300 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают 0,1-100 мМ ионов Mn^{2+} или их соли, такой как $MnCl_2$ (например, 0,1-100 мМ, 0,1-50 мМ, 0,1-20 мМ, 0,1-10 мМ, 0,1-5 мМ, 0,1-2 мМ, 0,5-50 мМ, 0,5-20 мМ, 0,5-15 мМ, 0,5-5 мМ, 0,5-2 мМ или 0,1-10 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают дитиотреитол (ДТТ) (например, 1-1000 мкМ, 1-500 мкМ, 1-200 мкМ, 50-500 мкМ, 100-500 мкМ, 100-300 мкМ, 0,1-100 мМ, 0,1-50 мМ, 0,1-20 мМ, 0,1-10 мМ, 0,1-5 мМ, 0,1-2 мМ, 0,5-50 мМ, 0,5-20 мМ, 0,5-15 мМ, 0,5-5 мМ, 0,5-2 мМ или 0,1-10 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают от 0,1 мМ до 100 мМ рибонуклеозидтрифосфата (НТФ) (например, 0,1-100 мМ, 0,1-50 мМ, 0,1-10 мМ, 1-100 мМ, 1-50 мМ или 1-10 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают значение рН, составляющее 4-10 (например, значение рН, составляющее 5-9, значение рН, составляющее 6-9, или значение рН, составляющее 6,5-8,5). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают температуру от 4°C до 50°C (например, от 10°C до 40°C, от 15°C до 40°C, от 20°C до 40°C или от 30°C до 40°C).

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид получают из дезоксирибонуклеиновой кислоты, например, дезоксирибонуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, такой как ДНК-вектор, линейаризованный ДНК-вектор или cDNA. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается транскрипция линейного полирибонуклеотида с дезоксирибонуклеиновой кислоты путем транскрипции в бесклеточной системе (например, транскрипции *in vitro*).

В другом примере кольцевой полирибонуклеотид может быть получен в клетке, например, прокариотической клетке или эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полирибонуклеотид доставляют в клетку (например, линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, или молекулу ДНК, кодирующую транскрипцию линейного полирибонуклеотида, описанного в данном документе). Линейные полирибонуклеотиды могут быть транскрибированы в клетке из экзогенной молекулы ДНК, доставленной в клетку. Линейный полирибонуклеотид может быть транскрибирован в клетке с экзогенной рекомбинантной молекулы ДНК, транзитно доставленной в клетку. В некоторых вариантах осуществления экзогенная молекула ДНК не интегрируется в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид транскрибируется в клетке с рекомбинантной молекулы ДНК, которая включена в геном клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления прокариотическая клетка, содержащая полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, может представлять собой бактериальную клетку или архейную клетку. Например, прокариотическая клетка, содержащая полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, может представлять собой клетку *E coli*, галофильных архей (например, *Haloferax volcani*), *Sphingomonas*, цианобактерий (например, *Synechococcus elongatus*, *Spirulina (Arthrospira) spp.*, и *Synechocystis spp.*), *Streptomyces*, актиномицетов (например, *Nonomuraea*, *Kitasatospora* или *Thermobifida*), *Bacillus spp.* (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*), бетапротеобактерий (например, *Burkholderia*), альфапротеобактериальную клетку (например, *Agrobacterium*), клетку *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas putida*) и энтеробактерий. Прокариотические клетки могут быть выращены в среде для культивирования. Прокариотические клетки могут содержаться в биореакторе.

Клетка может представлять собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой одноклеточную эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой клетку одноклеточного гриба, такую как клетка дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae* и других представителей *Saccharomyces spp.*, *Brettanomyces spp.*, *Schizosaccharomyces spp.*, *Torulaspora spp.* и *Pichia spp.*). В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой одноклеточную животную клетку. Одноклеточная животная клетка может представлять собой клетку, выделенную из многоклеточного животного и выращенную в культуре, или ее дочерние клетки. В некоторых вариантах осуществления

одноклеточная животная клетка может быть дедифференцированной. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой одноклеточную растительную клетку. Одноклеточная растительная клетка может представлять собой клетку, выделенную из многоклеточного растения и выращенную в культуре, или ее дочерние клетки. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная растительная клетка может быть дедифференцированной. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная растительная клетка получена из каллуса растения. В вариантах осуществления одноклеточная клетка представляет собой протопласт растительной клетки. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой клетку одноклеточной эукариотической водоросли, такой как одноклеточная зеленая водоросль, представитель диатомовых, эвгленовых или динофлагеллятов. Неограничивающие примеры одноклеточных эукариотических водорослей, представляющих интерес, включают *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Neochloris oleoabundans* и других представителей *Neochloris spp.*, *Protosiphon botryoides*, *Botryococcus braunii*, *Cryptococcus spp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* и других представителей *Chlamydomonas spp.* В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой клетку протиста. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой клетку простейших.

В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку многоклеточного эукариота. Например, многоклеточный эукариот может быть выбран из группы, состоящей из позвоночного животного, беспозвоночного животного, многоклеточного гриба, многоклеточной водоросли и многоклеточного растения. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой позвоночное животное, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой многоклеточный гриб. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой многоклеточное растение. В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку человека или клетку отличного от человека млекопитающего, такого как отличный от человека примат (например, нечеловекообразные обезьяны, человекообразные обезьяны), копытное животное (например, полорогие, включая крупный рогатый скот, буйвола, бизона, овцу, козу и мускусного быка; свинья; представитель верблюдовых, включая верблюда, ламу и

альпаку; олень, антилопа и представитель лошадиных, включая лошадь и осла), хищное млекопитающее (например, собака, кошка), грызун (например, крыса, мышь, морская свинка, хомяк, белка) или зайцеобразное (например, кролик, заяц). В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку птицы, такой как представитель таких таксонов птиц, как *Galliformes* (например, куры, индейки, фазаны, перепела), *Anseriformes* (например, утки, гуси), *Paleaognathae* (например, страусы, эму), *Columbiformes* (например, голуби, горлицы) или *Psittaciformes* (например, попугаи). В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку членистоногого (например, насекомых, арахнидов, ракообразных), нематоды, аннелиды, гельминта или моллюска. В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку многоклеточного растения, такого как покрытосеменное растение (которое может быть двудольным или однодольным) или голосеменное растение (например, хвойное, саговник, гнетовидное, гинкго), папоротник, хвощ, плаун или бриофит. В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку эукариотической многоклеточной водоросли.

Эукариотические клетки могут быть выращены в среде для культивирования.

Эукариотические клетки могут содержаться в биореакторе.

Примеры биореакторов включают без ограничения биореакторы с механическим перемешиванием (например, с полным перемешиванием) и трубчатые (например, с пульсирующим потоком) биореакторы, эрлифтные биореакторы, мембранные смесительные баки, смесительные баки с центробежным фильтром, вибросмесители, реакторы с псевдооживленным слоем и мембранные биореакторы. Режим работы биореактора может представлять собой периодический или непрерывный процесс. Биореактор является биореактором с непрерывным режимом работы, когда потоки реагента и продукта непрерывно подаются в систему и удаляются из нее. Биореактор с периодическим режимом работы может характеризоваться непрерывным потоком рециркуляции, но не иметь непрерывной подачи реагентов или сбора продукта. Некоторые способы по настоящему изобретению направлены на крупномасштабное получение кольцевых полирибонуклеотидов. Для способов крупномасштабного получения способ может быть выполнен в объеме от 1 литра (л) до 50 л или больше (например, 5 л, 10 л, 15 л, 20 л, 25 л, 30 л, 35 л, 40 л, 45 л, 50 л или больше). В некоторых вариантах осуществления способ может быть выполнен в объеме от 5 л до 10 л, от 5 л до 15 л, от 5 л до 20 л, от 5 л до 25 л, от 5 л до 30 л, от 5 л до 35 л, от 5 л до 40 л, от 5 л до 45 л, от 10 л до 15 л, от 10 л до 20 л, от 10 л до 25 л, от 20 л до 30 л, от 10 л до 35 л, от 10 л до 40 л, от 10 л до 45 л, от 10 л до 50 л, от 15 л до 20 л, от 15 л до 25 л, от 15 л до 30 л, от

15 л до 35 л, от 15 л до 40 л, от 15 л до 45 л или от 15 л до 50 л. В некоторых вариантах осуществления биореактор может обеспечивать получение 1 г кольцевой РНК. В некоторых вариантах осуществления биореактор может обеспечивать получение 1-200 г кольцевой РНК (например, 1-10 г, 1-20 г, 1-50 г, 10-50 г, 10-100 г, 50-100 г из 50-200 г кольцевой РНК). В некоторых вариантах осуществления получаемое количество измеряют в расчете на литр (например, 1-200 г на литр), на партию или реакцию (например, 1-200 г на партию или реакцию) или на единицу времени (например, 1-200 г в час или в день). В некоторых вариантах осуществления более одного биореактора могут применяться последовательно для увеличения производственной мощности (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять биореакторов могут применяться последовательно).

Способы получения кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, описаны, например, в Khudyakov & Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications*, CRC Press (2002); в Zhao, **SYNTHETIC BIOLOGY: TOOLS AND APPLICATIONS**, (первое издание), Academic Press (2013); и Egli & Herdewijn, **CHEMISTRY AND BIOLOGY OF ARTIFICIAL NUCLEIC ACIDS**, (первое издание), Wiley-VCH (2012).

Различные способы синтеза кольцевых полирибонуклеотидов также описаны в других источниках (см., например, патент США № US6210931, патент США № US5773244, патент США № US5766903, патент США № US5712128, патент США № US5426180, публикацию заявки на патент США № US20100137407, международную публикацию № WO1992001813, международную публикацию № WO2010084371 и Petkovic et al., *Nucleic Acids Res.* 43:2454-65 (2015); полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид подвергают очистке, например, удаляют свободные рибонуклеиновые кислоты, линейную РНК или РНК с односторонним разрывом, ДНК, белки и т. п. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут быть очищены посредством любого известного способа, обычно используемого в данной области техники. Неограничивающие примеры способов очистки включают колоночную хроматографию, вырезание из геля, исключение по размеру и т. д.

Иммунизация

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают иммунизацию субъекта иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуноген экспрессируется из кольцевого полирибонуклеотида. В

некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует у субъекта иммунный ответ в отношении иммуногена, экспрессируемого с кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует иммунный ответ у субъекта (например, индуцирует продуцирование антител, которые связываются с иммуногеном, экспрессируемым с кольцевого полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления иммунизация проводится с целью лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта (например, субъекта-человека). В некоторых вариантах осуществления иммунизация проводится с целью продуцирования антител у субъекта (например, продуцирования антител для очистки, например, у отличного от человека млекопитающего). В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию в одной композиции. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют вторым адъювантом. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют второй иммуногенной композицией.

Субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими любое количество кольцевых полирибонуклеотидов. Субъекта иммунизируют, например, одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 1 кольцевой полирибонуклеотид. Субъекта иммунизируют, например, одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов или большее количество отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими не более 1 кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 1 кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-15, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 4-4, 4-3, 5-20, 5-15, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 5-10, 10-15 или 15-20 отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов. Отличающиеся кольцевые

полирибонуклеотиды содержат последовательности, отличающиеся друг от друга. Например, они могут включать или кодировать отличающиеся иммуногены, перекрывающиеся иммуногены, сходные иммуногены или одни и те же иммуногены (например, с одинаковыми или отличающимися регуляторными элементами, последовательностями инициации, промоторами, терминирующими элементами или другими элементами по настоящему изобретению). В случаях, когда субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов, при этом два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов могут находиться в одной и той же или отличающихся иммуногенных композициях и иммунизацию ими осуществляют в одно и то же или в разное время. Иммуногенные композиции, содержащие два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов, могут вводиться в одно и то же анатомическое место или в отличающиеся анатомические места.

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

В определенных вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят второй адъювант. Адъювант обеспечивает усиление врожденного иммунного ответа, который в свою очередь обеспечивает усиление адаптивного иммунного ответа у субъекта. Адъювант может представлять собой любой адъювант, описанный ниже. В определенных вариантах осуществления адъювант составляют с кольцевым полирибонуклеотидом в качестве части иммуногенной композиции. В определенных вариантах осуществления адъювант не является частью иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В определенных вариантах осуществления адъювант вводят отдельно от иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В данном аспекте адъювант вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличающийся от момента времени введения иммуногенной

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

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

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

Субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией любое подходящее число раз для достижения требуемого ответа. Например, для индукции системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек можно использовать стратегию иммунизации "прайм-буст". Субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению, например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 раз или больше.

В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не более 10, не более 15, не более 20 раз или меньше.

В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 раз.

В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению один раз. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению два раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению три раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению четыре раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией,

адьювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению пять раз. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адьювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению семь раз.

Для разделения двух или больше иммунизаций можно выбирать подходящие промежутки времени. Промежутки времени могут относиться к многократным иммунизациям с помощью одной и той же иммуногенной композиции, адьюванта или вакцины (например, белковой субъединичной вакцины) или их комбинации, например, ту же иммуногенную композицию, адьювант или вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию можно вводить в том же количестве или в отличающихся количествах посредством того же пути иммунизации или посредством отличающихся путей иммунизации. Промежутки времени могут относиться к многократным иммунизациям с помощью отличающейся иммуногенной композиции, адьюванта или вакцины (например, белковой субъединичной вакцины) или их комбинации, например, отличающуюся иммуногенную композицию, адьювант или вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию можно вводить в том же количестве или в отличающихся количествах посредством того же пути иммунизации или посредством отличающихся путей иммунизации. Промежутки времени могут относиться к иммунизациям с помощью разных средств, например первой иммуногенной композиции, содержащей первый кольцевой полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей второй кольцевой полирибонуклеотид. Промежутки времени могут относиться к иммунизациям с помощью отличающихся средств, например, первой иммуногенной композиции, содержащей первый кольцевой полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей белковый иммуноген (например, белковую субъединицу). В некоторых примерах между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 48 или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 28 или 30 дней. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель. В некоторых примерах между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей

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

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26 по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30 дней или больше. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не более 10, не более 15, не более 20, не более 21, не более 22, не более 23, не более 24, не более 25, не более 26, не более 27, не более 28, не более 29, не более 30, не более 32, не более 34 или не более 36 дней или меньше.

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

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или по меньшей мере 8 месяцев или больше. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8 месяцев, не более 9 месяцев, не более 10 месяцев, не более 11 месяцев или не более 12 месяцев или меньше.

В некоторых вариантах осуществления способ включает предварительное введение субъекту средства для улучшения иммуногенных ответов на кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой иммуноген, раскрытый в данном документе (например, белковый иммуноген). Например, способ включает введение белкового иммуногена за 1-7 дней до введения кольцевого полирибонуклеотида,

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

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту средства для улучшения иммуногенных ответов на кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген, после того, как субъекту ввели кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой иммуноген, раскрытый в данном документе (например, белковый иммуноген). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую белковый иммуноген. Например, способ включает введение субъекту белкового иммуногена в течение 1 года (например, в течение 11 месяцев, 10 месяцев, 9 месяцев, 8 месяцев, 7 месяцев, 6 месяцев, 5 месяцев, 4 месяцев, 3 месяцев, 2 месяцев и 1 месяца) с момента введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую иммуноген. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту любого из кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, или любой из иммуногенных композиций, описанных в данном документе, и белковой субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления белковый иммуноген имеет ту же аминокислотную последовательность, что и иммуноген, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом. Например, полипептидный иммуноген может соответствовать (например, характеризуется 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности) полипептидному иммуногену, кодируемому последовательностью кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления белковый иммуноген имеет аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности иммуногена, кодируемого кольцевым полирибонуклеотидом. Например, полипептидный иммуноген может характеризоваться менее чем 90% (например, 80%, 70%, 30%, 20% или 10%) идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидным иммуногеном, кодируемым последовательностью кольцевого полирибонуклеотида.

Субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адьювантом или вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией в любом

подходящем количестве анатомических участков. Одну и ту же иммуногенную композицию, адъювант, вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию можно вводить в несколько анатомических участков, отличающиеся иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или отличающиеся кольцевые полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию можно вводить в отличающиеся анатомические участки, отличающиеся иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или отличающиеся кольцевые полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, белковые субъединичные вакцины) или их комбинацию можно вводить в один и тот же анатомический участок или любую их комбинацию. Например, иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, можно вводить в два отличающихся анатомических участка, и/или иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, можно вводить в один анатомический участок, а адъювант можно вводить в отличающийся анатомический участок.

Иммунизацию с использованием двух или больше анатомических путей можно осуществлять посредством одного и того же пути иммунизации (например, внутримышечного) или посредством двух или больше путей иммунизации. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, адъювант или вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию по настоящему изобретению, проводят в по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 анатомических участках субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, адъювант или вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию по настоящему изобретению, проводят в не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9 или не более 10 анатомических участках или в меньшем количестве анатомических участков субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид или адъювант по настоящему изобретению, проводят в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 анатомических участках субъекта.

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

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

Любое подходящее количество кольцевого полирибонуклеотида может быть введено субъекту по настоящему изобретению. Например, субъекта можно иммунизировать с помощью по меньшей мере приблизительно 1 нг, по меньшей мере приблизительно 10 нг, по меньшей мере приблизительно 100 нг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг, по меньшей мере приблизительно 100 мкг, по меньшей мере приблизительно 1 мг, по меньшей мере приблизительно 10 мг, по меньшей мере приблизительно 100 мг или по меньшей мере приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью не более чем приблизительно 1 нг, не более чем приблизительно 10 нг, не более чем приблизительно 100 нг, не более чем приблизительно 1 мкг, не более чем приблизительно 10 мкг, не более чем приблизительно 100 мкг, не более чем приблизительно 1 мг, не более чем приблизительно 10 мг, не более чем приблизительно 100 мг или не более чем приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью приблизительно 1 нг, приблизительно 10 нг, приблизительно 100 нг, приблизительно 1 мкг, приблизительно 10 мкг, приблизительно 100 мкг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 100 мг или приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает оценку у субъекта ответа с образованием антител на введение иммуногена. В некоторых вариантах осуществления оценка проводится до и/или после введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую иммуноген.

Получение и очистка антител

Иммунизация субъекта полирибонуклеотидом, описанным в данном документе (например, полирибонуклеотидом, кодирующим иммуноген VZV), может индуцировать продуцирование антител у субъекта, которые связываются с иммуногеном, экспрессируемым с кольцевого полирибонуклеотида (например, обеспечивать продуцирование антител к VZV). В некоторых вариантах осуществления иммунизация предназначена для получения антител у субъекта (например, человека или отличного от человека животного), которые количественно определяют или очищают у субъекта

(например, для диагностического или терапевтического применения). Таким образом, кольцевые полирибонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть использованы в способах получения поликлональных или моноклональных антител (например, поликлональных или моноклональных антител к VZV).

Например, в настоящем изобретении представлено введение кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе (например, кодирующего иммуноген VZV), отличному от человека животному (например, отличному от человека млекопитающему, такому как коза, свинья, кролик, крыса, мышь, лама, верблюд, лошадь, осел или крупный рогатый скот (корова)). Кольцевой полирибонуклеотид может быть введен в соответствии с любой композицией, составом, путем или введением, количеством или режимом введения доз, описанными в данном документе (например, необязательно с адъювантом, вводимым в той же композиции или как часть режима введения доз). В некоторых вариантах осуществления отличное от человека животное характеризуется наличием гуманизированной иммунной системы (например, крупный рогатый скот, характеризующийся наличием гуманизированной иммунной системы).

Плазму крови, содержащую поликлональные антитела, полученные с использованием иммуногенных композиций, содержащих кольцевые полирибонуклеотиды, раскрытые в данном документе, можно собирать у субъекта, которого иммунизировали с помощью кольцевого полирибонуклеотида. Эти поликлональные антитела можно количественно оценить (например, для диагностических целей у субъекта-человека) или очистить (например, для применения в способе лечения или для разработки моноклональных антител). Плазму крови можно собирать посредством способов, известных специалистам в данной области техники, например, посредством плазмафереза. Плазму крови можно собирать у одного и того же субъекта один раз или несколько раз, например, несколько раз, каждый раз через заданный промежуток времени после иммунизации, несколько раз после иммунизации, несколько раз между иммунизациями или при любой их комбинации.

Антитела или их фрагменты (например, поликлональные антитела, такие как человеческие или гуманизированные поликлональные антитела), которые специфически связываются с иммуногеном VZV (например, иммуногеном VZV, описанным в данном документе), могут быть получены посредством способов, описанных в данном документе. Антитела или их фрагменты могут быть очищены из крови (например, из плазмы крови или сыворотки крови) посредством способов, известных специалистам в данной области техники.

Поликлональные антитела можно подвергать очистке от плазмы крови с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, значение

pH плазмы крови доводят до 4,8 (например, посредством добавления по каплям 20% уксусной кислоты), плазму крови фракционируют с помощью каприловой кислоты при соотношении каприловая кислота/общий белок, составляющем 1,0, и затем осветляют посредством центрифугирования (например, при 10000 g в течение 20 мин при комнатной температуре). Супернатант, содержащий поликлональные антитела (например, поликлональные антитела IgG), нейтрализуют до pH 7,5 с помощью 1 М Tris, фильтруют через поры диаметром 0,22 мкм и очищают посредством аффинной хроматографии с помощью колонки со специфичностью в отношении иммуноглобулина человека (например, колонки со специфичностью в отношении легкой цепи IgG человека). Поликлональные антитела дополнительно очищают посредством пропускания через колонку для аффинной хроматографии, которая специфически связывает примеси, например, отличные от человеческих антитела от животного, отличного от человека. Поликлональные антитела хранят в подходящем буфере, например, в стерилизованном фильтрацией буфере, содержащем 10 мМ мононатриевой соли глутаминовой кислоты, 262 мМ D-сорбита и Tween (0,05 мг/мл) (pH 5,5). Определяют количество и концентрацию очищенных поликлональных антител. Проводят эксклюзионную хроматографию HPLC для определения наличия агрегатов или мультимеров. В некоторых вариантах осуществления человеческие поликлональные антитела очищают от компонентов животного, отличного от человека, характеризующегося наличием гуманизированной иммунной системы, в соответствии с Beigel, JH et al. (Lancet Infect. Dis., 18:410-418 (2018), включая дополнительное приложение), содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В настоящем изобретении также представлены способы получения антител у субъекта-человека, например, для терапевтического лечения и/или диагностики. Например, в настоящем изобретении представлен способ количественной оценки уровня антител к VZV у субъекта после введения кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции, описанных в данном документе. Количественная оценка может быть выполнена посредством способов, известных из уровня техники (например, определение титра антитела), например, посредством получения образца крови от субъекта и количественной оценки уровня антител к VZV с использованием стандартных методик, таких как иммуноферментный анализ (ELISA). Антитела также могут быть очищены посредством способов, известных специалистам в данной области техники.

Адьюванты

Адьювант обеспечивает усиление иммунных ответов (гуморального и/или клеточного), вызываемых у субъекта, который получает адьювант и/или иммуногенную композицию,

содержащую адъювант. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят адъювант, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в способах, описанных в данном документе, применяется адъювант для получения иммунного ответа, как описано в данном документе. В конкретном варианте осуществления адъювант применяют для содействия иммунному ответу у субъекта на иммуноген, экспрессируемый кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления адъювант и полирибонуклеотид вводят совместно в виде отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления адъювант смешивают или составляют с полирибонуклеотидом в одной композиции и вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления адъювант и кольцевой полирибонуклеотид вводят совместно в отдельных композициях. В некоторых вариантах осуществления адъювант смешивают или составляют с кольцевым полирибонуклеотидом в виде одной композиции с получением иммуногенной композиции, которую вводят субъекту.

Адъювант может представлять собой компонент кольцевого полирибонуклеотида (например, полирибонуклеотидной последовательности), может представлять собой полипептидный адъювант, кодируемый экспрессионной последовательностью полирибонуклеотида, может представлять собой молекулу (например, малую молекулу, полипептид или молекулу нуклеиновой кислоты), которая не кодируется полирибонуклеотидом. Адъювант может быть составлен с полирибонуклеотидом в одной и той же фармацевтической композиции. Адъювант может вводиться отдельно (например, в виде отдельной фармацевтической композиции) в комбинации с полирибонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления адъювант кодируется кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует более одного адъюванта. Например, кольцевой полирибонуклеотид кодирует от 2 до 100 адъювантов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует от 2 до 10 адъювантов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует 2 адъюванта. Один или несколько адъювантов, кодируемых кольцевым полирибонуклеотидом, могут содержать N-концевую сигнальную последовательность, например, такую, которая направляет экспрессируемый полипептидный адъювант по секреторному пути. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 3 адъюванта. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 4 адъюванта. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 5 адъювантов. В некоторых вариантах осуществления адъювант кодируется тем же полирибонуклеотидом, который кодирует один или несколько иммуногенов. Адъювант(-

ы) и иммуноген(-ы) могут быть совместно доставлены на одном и том же полирибонуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления адъювант, кодируемый полирибонуклеотидом, представляет собой последовательность (например, полирибонуклеотидную последовательность), которая является стимулятором врожденной иммунной системы. Последовательность стимулятора врожденной иммунной системы может содержать по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100 или по меньшей мере 500 рибонуклеотидов. Последовательность стимулятора врожденной иммунной системы может содержать от 5 до 1000, от 10 до 500, от 20 до 500, от 10 до 100, от 20 до 100, от 20 до 50, от 100 до 500, от 500 до 1000 или от 10 и 1000 рибонуклеотидов. Например, последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы, может быть выбрана из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

Адъюванты могут представлять собой адъювант ТН1 и/или адъювант ТН2. Дополнительные адъюванты, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают без ограничения одно или несколько из следующего.

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

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

Малые молекулы. Малые молекулы, пригодные для применения в качестве адъювантов, включают имиквимод или 847, резиквимод или R848 и гардиквимод.

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

Сапонин (т. е. гликозид, полициклические агликоны, присоединенные к одной или нескольким сахарным боковым цепям). Составы на основе сапонины, подходящие для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включают очищенные составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOM и матрица ISCOM. QS21 представлен на рынке как STIMULON (TM). Составы на основе сапонины могут также предусматривать стерин, такой как холестерин. Комбинации сапонинов и холестеринных могут применяться для образования уникальных частиц, называемых иммуностимулирующими комплексами (ISCOM). ISCOM, как правило, также содержат фосфолипид, такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. Любой известный сапонин можно применять в ISCOM. Предпочтительно ISCOM предусматривает один или несколько из QuilA, QHA и QHC. Необязательно ISCOM могут быть лишены дополнительного детергента.

Липополисахариды. Адъюванты, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают нетоксичные производные энтеробактериального липополисахарида (LPS). Такие производные включают монофосфорил-липид А (MPLA), глюкопиранозил-липид А (GLA) и 3-О-деацелированный MPL (3dMPL). 3dMPL представляет собой смесь 3-О-деацелированного монофосфорил-липид А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. Другие нетоксичные производные LPS включают миметики монофосфорил-липид А, такие как производные аминоалкилглюкозаминидфосфата (например, RC-529).

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

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

Липопептиды (т. е. соединения, содержащие один или несколько остатков жирных кислот и два или больше аминокислотных остатков). Липопептид, подходящий для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включает Pam2 (Pam2CSK4) и Pam3 (Pam3CSK4).

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

Пептиды и пептидогликаны (синтетические или очищенные), полученные из грамотрицательных или грамположительных бактерий, такие как MDP (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин), являются подходящими для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении.

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

Адъюванты на основе РНК. Адъюванты на основе РНК, подходящие для применения в настоящем изобретении, представляют собой поли(IC), поли(IC:LC), шпилечные РНК с 5'-трифосфатом или без него, вирусные последовательности, поли(U)-содержащую последовательность, природные или синтетические РНК-последовательности dsRNA (например, поли(I:C)) и аналоги нуклеиновой кислоты (например, циклический GMP-AMP или другие циклические динуклеотиды, например, циклический ди-GMP, иммуностимулирующие аналоги оснований, например, C8-замещенные и N7,C8-дизамещенные по гуанину рибонуклеотиды). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой аналог кольцевого полирибонуклеотида, представляющий собой линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе.

Адъюванты на основе ДНК. Адъюванты на основе ДНК, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают CpG (например, CpG1018), dsDNA и природные или синтетические иммуностимулирующие последовательности ДНК.

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

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

Адъювант для применения в настоящем изобретении может быть получен из бактерий, например, флагеллин, LPS или бактериальный токсин (например, энтеротоксины (белок), например, термолабильный токсин или холерный токсин). Адъювант для применения в настоящем изобретении может представлять собой гибридную молекулу, такую как CpG, конъюгированную с имиквимодом. Адъювант для применения в настоящем изобретении может представлять собой ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, такой как хитин или бета-глюкан. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганическую наночастицу, такую как

золотые наностержни или наночастицы на основе диоксида кремния (например, наночастицы на основе мезопористого диоксида кремния (MSN)). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой многокомпонентный адъювант или систему на основе адъюванта, такие как AS01 (AS01B), AS03, AS04 (MLP5 + квасцы), квасцы (смесь гидроксида алюминия и гидроксида магния), гидроксид алюминия, гидроксид магния, CFA (полный адъювант Фрейнда: IFA + пептидогликан + димиколят трегалозы), CAF01 (двухкомпонентная система, состоящая из среды-носителя на основе катионной липосомы (диметилдиоктадециламмония (DDA)), стабилизированной с помощью гликолипидного иммуномодулятора (6,6-дибегената трегалозы (TDB), который может представлять собой синтетический вариант фактора жгутообразования, расположенного в клеточной стенке микобактерий).

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

Хемокины. Адъювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие хемокин, такой как MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes или TCA-3.

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

Адъювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие стимулятор врожденной иммунной системы (частичный, полноразмерный или мутированный), такой как TLR4, TLR3, TLR3, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 или MDA-5/IFIH1, или конститутивно активный (са) стимулятор врожденного иммунитета, такой как саTLR4, саTLR3, саTLR3, саTLR9, саTLR7, саTLR8, саTLR7, саRIG-I/DDX58 или саMDA-5/IFIH1.

Адъювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие адапторную или сигнальную молекулу, такую как STING (например, саSTING), TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, IKK-альфа, комплекс IKK, TBK1, бета-катенин и каспаза 1.

Адъювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие активатор транскрипции, такой как активатор транскрипции, который обладает способностью

усиливать иммунный ответ (например, AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 или IRF5).

Адьювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую рецептор цитокина, такой как IL-2-бета, IFN-гамма или IL-6.

Адьювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие бактериальный компонент, такой как флагеллин или MBL.

Адьювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие любой компонент врожденной иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий один или несколько иммуногенов, в комбинации с адьювантом (например, адьювантом, который представляет собой молекулярную единицу, отдельную от кольцевого полирибонуклеотида, или адьювант, который кодируется отдельным полирибонуклеотидом). Термин "в комбинации с", используемый в данном описании, предусматривает любые две композиции, вводимые в качестве части терапевтического режима. Это может предусматривать, например, полирибонуклеотид и адьювант, составленные в виде одной фармацевтической композиции. Это также предусматривает, например, полирибонуклеотид и адьювант, вводимые субъекту в виде отдельных композиций в соответствии с определенным терапевтическим режимом или режимом введения доз. Адьювант можно вводить субъекту до, по сути одновременно или после введения полирибонуклеотида. Адьювант можно вводить в пределах 1 дня, 2 дней, 5 дней, 10 дней, 20 дней, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев до или после введения полирибонуклеотида. Адьювант можно вводить тем же путем введения (например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутривенно, внутривенно, внутривенно, местно или перорально), что и полирибонуклеотид, или отличающимся путем.

Доставка

Кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может быть включен в фармацевтические композиции с носителем или без носителя.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены, например, таким образом, чтобы они содержали носитель, такой как фармацевтический носитель и/или полимерный носитель, например, липосому, и доставляться посредством известных способов нуждающемуся в этом субъекту (например, человеку или отличному от человека сельскохозяйственному или домашнему животному, например, крупному рогатому скоту, собаке, кошке, лошади, домашней

птице). Такие способы включают без ограничения трансфекцию (например, опосредованную липидами, катионными полимерами, фосфатом кальция, дендримерами); электропорацию или другие способы разрушения мембран (например, нуклеофекцию), вирусную доставку (например, с помощью лентивируса, ретровируса, аденовируса, AAV), микроинъекцию, бомбардировку микрочастицами ("генную пушку"), использование *fungene*, прямую ультразвуковую нагрузку, сдавливание клеток, оптическую трансфекцию, слияние протопластов, импалефекцию, магнитофекцию, перенос, опосредованный экзосомами, перенос, опосредованный липидными наночастицами, и любую их комбинацию. Способы доставки также описаны, например, в Gori et al., *Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. Human Gene Therapy. July 2015, 26(7): 443-451. doi:10.1089/hum.2015.074*; и Zuris et al. *Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. Nat Biotechnol. 2014 Oct 30;33(1):73–80.*

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут быть доставлены в составе для доставки в "голом" виде. Состав для доставки в "голом" виде обеспечивает доставку кольцевого полирибонуклеотида в клетку без помощи носителя и без ковалентной модификации кольцевого полирибонуклеотида или частичной или полной инкапсуляции кольцевого полирибонуклеотида.

Состав для доставки в "голом" виде представляет собой состав, который не содержит носителя, и в котором кольцевой полирибонуклеотид не имеет ковалентной модификации, которая связывает компонент, способствующий доставке в клетку, и при этом кольцевой полирибонуклеотид не является частично или полностью инкапсулированным. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид не является ковалентно связанным с компонентом, таким как белок, малая молекула, частица, полимер или биополимер, который способствует доставке в клетку. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут доставляться в составе для доставки с протамином или солью протамина (например, сульфатом протамина).

Полирибонуклеотид без ковалентной модификации, который связывается с компонентом, способствующим доставке в клетку, может не содержать модифицированную фосфатную группу. Например, полирибонуклеотид без ковалентной модификации, который связывается с компонентом, способствующим доставке в клетку, может не содержать тиофосфатов, фосфороселенатов, боранофосфатов, сложных эфиров боранофосфатов, гидрофосфонатов, фосфорамидатов, фосфородиамидатов, алкил- или арилфосфонатов или фосфотриэфиров.

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде может не содержать некоторых или всех реагентов из следующих: реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. Например, состав для доставки в "голом" виде может не содержать фитогликогена октенилсукцината, фитогликогена бета-декстрина, модифицированного ангидридом фитогликогена бета-декстрина, липофектамина, полиэтиленimina, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимина, аминогликозид-полиамина, дидезоксиамино- β -циклодекстрина, спермина, спермидина, поли(2-диметиламино)этилметакрилата, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированного желатина, дендримеров, хитозана, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), хлорида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорида 1-[2-(олеилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолия (DOTIM), трифторацетата 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорида 3 β -[N-(N,N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HC1), дигептадециламидоглицилспермидина (DOGS), бромида N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромида N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопroteина низкой плотности (LDL), липопroteина высокой плотности (HDL) или глобулина.

Состав для доставки в "голом" виде может содержать вспомогательное вещество, отличное от носителя. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество, отличное от носителя, может содержать неактивный ингредиент, который не проявляет активного эффекта способствования проникновению в клетку. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество, отличное от носителя, может содержать буфер, например PBS. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой растворитель, неводный растворитель, разбавитель, суспендирующее средство, поверхностно-активное средство, изотоническое средство, загуститель, эмульгатор, консервант, полимер, пептид, белок, клетку, гиалуронидазу, диспергирующее средство, гранулирующее средство, средство для улучшения распадаемости, связывающее средство, буферное средство, смазывающее средство или масло.

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде может содержать разбавитель, такой как разбавитель, приемлемый для парентерального введения. Разбавитель (например, разбавитель, приемлемый для парентерального

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

В некоторых вариантах осуществления состав содержит средство, способствующее проникновению в клетку. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой состав для местного применения и содержит средство, способствующее проникновению в клетку. Средство, способствующее проникновению в клетку, может включать органические соединения, такие как спирты, содержащие одну или несколько функциональных гидроксильных групп. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, включает спирт, такой как без ограничения одноатомные спирты, многоатомные спирты, ненасыщенные алифатические спирты и алициклические спирты. Средство, способствующее проникновению в клетку, может включать один или несколько из метанола, этанола, изопропанола, феноксиэтанола, триэтаноламина, фенилэтилового спирта, бутанола, пентанола, цетилового спирта, этиленгликоля, пропиленгликоля, денатурированного спирта, бензилового спирта, специально денатурированного спирта, гликоля, стеарилового спирта, цетеарилового спирта, ментола, полиэтиленгликоля (PEG)-400, этоксилированных жирных кислот или гидроксиэтилцеллюлозы. В определенных вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, содержит этанол. Средства, способствующие проникновению в клетку, могут включать любое средство, способствующее проникновению в клетку, в любом количестве или в любом составе, как описано в WO 2020/180751 или WO 2020/180752, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат, раскрытый в данном документе, фармацевтическая композиция, раскрытая в данном документе,

фармацевтическое лекарственное вещество, раскрытое в данном документе, или фармацевтический лекарственный продукт, раскрытый в данном документе, находятся в системе парентеральной доставки нуклеиновой кислоты. Система парентеральной доставки нуклеиновой кислоты может содержать фармацевтический препарат, раскрытый в данном документе, фармацевтическую композицию, раскрытую в данном документе, фармацевтическое лекарственное вещество, раскрытое в данном документе, или фармацевтический лекарственный продукт, раскрытый в данном документе, и разбавитель, приемлемый для парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат, раскрытый в данном документе, фармацевтическая композиция, раскрытая в данном документе, фармацевтическое лекарственное вещество, раскрытое в данном документе, или фармацевтический лекарственный продукт, раскрытый в данном документе, в системе парентеральной доставки нуклеиновой кислоты не содержат какого-либо носителя.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на хозяина или клетку-хозяина, содержащих кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления хозяин или клетка-хозяин являются позвоночным, млекопитающим (например, человеком) или другим организмом или клеткой.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид вызывает сниженный нежелательный ответ иммунной системы хозяина или неспособен его вызывать по сравнению с ответом, запускаемым эталонным соединением, например, линейным полинуклеотидом, соответствующим описанному кольцевому полирибонуклеотиду. В вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является неиммуногенным в организме хозяина. Некоторые иммунные ответы включают без ограничения гуморальные иммунные ответы (например, продуцирование иммуногенспецифических антител) и клеточноопосредованные иммунные ответы (например, пролиферацию лимфоцитов).

В некоторых вариантах осуществления хозяина или клетку-хозяина приводят в контакт с кольцевым полирибонуклеотидом (например, им его доставляют или вводят). В некоторых вариантах осуществления хозяин является млекопитающим, таким как человек. Количество кольцевого или линейного полирибонуклеотида, продукта экспрессии или их обоих у хозяина может быть измерено в любое время после введения. В определенных вариантах осуществления определяют динамику роста хозяина в культуре. Если темпы роста повышаются или снижаются в присутствии кольцевого полирибонуклеотида или линейного, то кольцевой полирибонуклеотид, или продукт экспрессии, или они оба

идентифицируются как эффективные в отношении повышения или снижения темпов роста хозяина.

Способ доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанный в данном документе, в клетку, ткань или субъекту включает введение фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, описанных в данном документе, в клетку, ткань или субъекту.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку копытного. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой соединительную ткань, мышечную ткань, нервную ткань или эпителиальную ткань. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой орган (например, печень, легкое, селезенку, почку и т. п.).

В некоторых вариантах осуществления способ доставки представляет собой способ *in vivo*. Например, способ доставки кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, включает парентеральное введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В качестве другого примера способ доставки кольцевого полирибонуклеотида в клетку или ткань субъекта включает парентеральное введение в клетку или ткань фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид присутствует в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать биологический ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид присутствует в количестве, эффективном для оказания биологического эффекта на клетку или ткань субъекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, содержат носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, содержат разбавитель и не содержат какого-либо носителя.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят внутривенно, внутриартериально, внутривнутрибрюшинно, внутривнутрикожно, внутривнутричерепно, интратекально, интралимфатически, подкожно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение осуществляется внутривенно, внутримышечно, офтальмологически, подкожно, внутривнутрикожно или местно.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, вводят местно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят интратрахеально.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят с помощью инъекции. Введение может являться системным введением или местным введением. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе способов доставки осуществляется с использованием носителя. В некоторых вариантах осуществления любые описанные в данном документе способы доставки осуществляются без использования носителя или средства, способствующего проникновению в клетку.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид или продукт, полученный в результате трансляции из кольцевого полирибонуклеотида, выявляют в клетке, ткани или в организме субъекта через по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня или по меньшей мере 5 дней после стадии введения. В некоторых вариантах осуществления присутствие кольцевого полирибонуклеотида или продукта, полученного в результате трансляции из кольцевого полирибонуклеотида, оценивают в клетке, ткани или в организме субъекта перед стадией введения. В некоторых вариантах осуществления присутствие кольцевого

полирибонуклеотида или продукта, полученного в результате трансляции из кольцевого полирибонуклеотида, оценивают в клетке, ткани или в организме субъекта после стадии введения.

Составы

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид) или препарат на его основе, полученный посредством способов, описанных в данном документе, может быть составлен в виде композиции, например, композиции для доставки в клетку, растение, беспозвоночное животное, позвоночное животное, отличное от человека, или субъекта-человека, например, композиции для применения в сельском хозяйстве, ветеринарной или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид составлен в виде фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, адъювант или их комбинацию. В конкретном варианте осуществления композиция содержит полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и носитель или разбавитель, не содержащий какого-либо носителя. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая полирибонуклеотид с разбавителем, не содержащим какого-либо носителя, применяется для доставки в "голом" виде полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида) субъекту.

Фармацевтические композиции могут необязательно содержать одно или несколько дополнительных активных веществ, например, терапевтически и/или профилактически активных веществ. Фармацевтические композиции могут необязательно содержать неактивное вещество, которое служит средой-носителем или средой для композиций, описанных в данном документе (например, композиций, содержащих кольцевые полирибонуклеотиды, такие как любой из неактивных ингредиентов, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и приведенных в базе данных неактивных ингредиентов). Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть стерильными и/или апирогенными. Общие соображения относительно составления и/или изготовления фармацевтических средств можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (включенной в данный документ посредством ссылки). Неограничивающие примеры неактивного вещества включают растворители, водные растворители, неводные растворители, дисперсионные среды, разбавители, дисперсии, суспендирующие средства, поверхностно-активные средства, изотонические средства, загустители, эмульгаторы, консерванты, полимеры, пептиды, белки, клетки,

гиалуронидазы, диспергирующие средства, гранулирующие средства, средства для улучшения распадаемости, связывающие средства, буферные средства (например, фосфатно-солевой буфер (PBS)), смазывающие средства, масла и их смеси.

Хотя описания фармацевтических композиций, представленных в данном документе, главным образом направлены на фармацевтические композиции, которые являются подходящими для введения людям, специалисту в данной области будет понятно, что такие композиции в целом являются подходящими для введения любому другому животному, например, отличным от человека животным, например, отличным от человека млекопитающим. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения людям, для того, чтобы сделать композиции подходящими для введения различным животным, является широко распространенной, и средний специалист в области ветеринарной фармакологии может разработать и/или осуществить такую модификацию путем проведения лишь обычных экспериментов в случае необходимости в таковых. Субъекты, для которых рассматривается введение фармацевтических композиций, включают без ограничения людей и/или других приматов; млекопитающих, в том числе коммерчески значимых млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, мыши и/или крысы; и/или птиц, в том числе коммерчески значимых птиц, таких как домашняя птица, куры, утки, гуси и/или индейки.

Составы на основе фармацевтических композиций, описанных в данном документе, могут быть получены посредством любого способа, известного или разработанного в будущем в области фармакологии. Как правило, такие способы получения включают стадию объединения активного ингредиента со вспомогательным веществом и/или одним или несколькими другими вспомогательными ингредиентами и затем, при необходимости и/или при желании, разделения, придания формы и/или упаковки продукта.

В некоторых вариантах осуществления эталонным критерием количества молекул линейных полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, является наличие не более 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 г/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл, 600 мкг/мл, 700 мкг/мл, 800 мкг/мл, 900 мкг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл или 2 мг/мл молекул линейных полирибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества молекул кольцевых полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, составляет по меньшей мере 30% (вес/вес), 40% (вес/вес), 50% (вес/вес), 60% (вес/вес), 70% (вес/вес), 80% (вес/вес), 85% (вес/вес), 90% (вес/вес), 91% (вес/вес), 92% (вес/вес), 93% (вес/вес), 94%

(вес/вес), 95% (вес/вес), 96% (вес/вес), 97% (вес/вес), 98% (вес/вес), 99% (вес/вес), 99,1% (вес/вес), 99,2% (вес/вес), 99,3% (вес/вес), 99,4% (вес/вес), 99,5% (вес/вес), 99,6% (вес/вес), 99,7% (вес/вес), 99,8% (вес/вес), 99,9% (вес/вес) или 100% (вес/вес) от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества линейных молекул полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, составляет не более 0,5% (вес/вес), 1% (вес/вес), 2% (вес/вес), 5% (вес/вес), 10% (вес/вес), 15% (вес/вес), 20% (вес/вес), 25% (вес/вес), 30% (вес/вес), 40% (вес/вес), 50% (вес/вес) молекул линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом, присутствующих в препарате, составляет не более 0,5% (вес/вес), 1% (вес/вес), 2% (вес/вес), 5% (вес/вес), 10% (вес/вес) или 15% (вес/вес) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества совокупных молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом и линейных полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, составляет не более 0,5% (вес/вес), 1% (вес/вес), 2% (вес/вес), 5% (вес/вес), 10% (вес/вес), 15% (вес/вес), 20% (вес/вес), 25% (вес/вес), 30% (вес/вес), 40% (вес/вес), 50% (вес/вес) совокупных молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом и линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат представляет собой промежуточный фармацевтический препарат конечного лекарственного продукта на основе кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат представляет собой лекарственное вещество или активный фармацевтический ингредиент (API). В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат представляет собой лекарственный продукт для введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевых полирибонуклеотидов дополнительно обрабатывают (до, во время или после восстановления линейной РНК) для удаления значительного количества ДНК, контаминации белками (например, клеточным белком, таким как белок клетки-хозяина или технологические белковые примеси), эндотоксином, молекулами мононуклеотидов и/или производственной примесью.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, может содержать: (i) соединение (например, кольцевой полирибонуклеотид), раскрытое в данном документе; (ii) буфер; (iii) неионогенный детергент; (iv) средство, регулирующее тоничность; и/или (v) стабилизатор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, представляет собой стабильный жидкий фармацевтический состав. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, содержит протамина или соль протамина (например, сульфат протамина).

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

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению применяются для повышения иммунного ответа у субъекта. Иммунный ответ предпочтительно является защитным и предпочтительно включает ответ с образованием антител (обычно включая IgG) и/или клеточноопосредованный иммунный ответ. Например, субъекта иммунизируют иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению, для индуцирования иммунного ответа. В качестве другого примера субъекта иммунизируют иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, содержащий иммуноген, для стимуляции выработки антител, которые связываются с иммуногеном. Повышая иммунный ответ у субъекта посредством этих вариантов применения и способов, можно обеспечить защиту субъекта от различных заболеваний и/или инфекций, например, от бактериальных и/или вирусных заболеваний, обсуждаемых выше. В определенных вариантах осуществления иммуногенные композиции представляют собой вакцинные композиции. Вакцины согласно настоящему изобретению могут быть либо профилактическими (т. е. для предупреждения инфекции), либо терапевтическими (т. е. для лечения инфекции), но, как правило, являются профилактическими. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой

животное, предпочтительно млекопитающее, например, человека. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека. В других вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, например, выбранное из коровы (например, молочного и мясного скота), овцы, козы, свиньи, лошади, собаки или кошки. В других вариантах осуществления субъект представляет собой птицу, например, курицу или петуха, индейку, попугая. В некоторых вариантах осуществления животное не представляет собой мышь, кролика или корову. В конкретном варианте осуществления, где иммуногенная композиция предназначена для профилактического применения, человек представляет собой ребенка (например, ребенка ясельного возраста или ребенка грудного возраста) или подростка. В другом варианте осуществления, где иммуногенная композиция предназначена для терапевтического применения, человек представляет собой подростка или взрослого. Иммуногенная композиция, предназначенная для детей, может также вводиться взрослым, например, для оценки безопасности, дозировки, иммуногенности и т. п.

Иммуногенная композиция, полученная согласно настоящему изобретению, может применяться для лечения как детей, так и взрослых. Возраст субъекта-человека может составлять менее 1 года, менее 5 лет, от 1 до 5 лет, от 5 до 15 лет, от 15 до 55 лет или по меньшей мере 55 лет. В конкретном варианте осуществления субъекты-люди, для которых предусмотрено получение иммуногенных композиций, представляют собой пожилых людей (например, ≥ 50 лет, ≥ 60 лет и ≥ 65 лет), молодых людей (например, ≤ 5 лет), госпитализированных пациентов, медицинских работников, военнослужащих и военный персонал, беременных женщин, больных с хроническими заболеваниями или пациентов с иммунодефицитом. Однако иммуногенные композиции подходят не только для данных групп и могут применяться более широко в популяции.

В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют с использованием адъюванта. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют вакциной.

Консерванты

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может содержать материал для однократного введения или может содержать материал для многократного введения (например, "многодозовый" набор). Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме. Композиция или фармацевтическая композиция может содержать один или несколько консервантов, таких как тиомерсал или 2-феноксиэтанол. Консерванты могут применяться для предупреждения микробного загрязнения во время применения. Подходящие консерванты

включают: хлорид бензалкония, тимеросал, хлорбутанол, метилпарабен, пропилпарабен, фенолэтиловый спирт, динатрия эдетат, сорбиновую кислоту, Onamer M или другие средства, известные специалистам в данной области техники. В офтальмологических продуктах, например, такие консерванты могут применяться на уровне от 0,004% до 0,02%. В композициях, описываемых в данном документе, консервант, например, хлорид бензалкония, может применяться в количестве от 0,001% до менее чем 0,01%, например, от 0,001% до 0,008%, предпочтительно приблизительно 0,005% по весу.

Полирибонуклеотиды могут быть восприимчивы к РНКазе, которая может находиться в избытке в окружающей среде. Композиции, представленные в данном документе, могут включать реагенты, которые ингибируют активность РНКазы, тем самым предохраняя полирибонуклеотид от разрушения. В некоторых случаях композиция или фармацевтическая композиция содержит любой ингибитор РНКазы, известный специалисту в данной области техники. В качестве альтернативы или дополнительно, полирибонуклеотид и средство, способствующее проникновению в клетку, и/или фармацевтически приемлемые разбавители или носители, среды-носители, вспомогательные вещества или другие реагенты в композиции, представленной в данном документе, могут быть получены в среде, не содержащей РНКазы. Композиция может быть составлена в среде, не содержащей РНКазы.

В некоторых случаях композиция, представленная в данном документе, может являться стерильной. Композиция может быть составлена в виде стерильного раствора или суспензии в подходящих средах-носителях, известных из уровня техники. Композицию можно подвергать стерилизации посредством обычных известных методик стерилизации, например, композицию можно подвергать стерилизующей фильтрации.

Соли

В некоторых случаях композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит одну или несколько солей. Для контроля тоничности в композицию, представленную в данном документе, может быть включена физиологическая соль, такая как натриевая соль. Другие соли могут включать хлорид калия, дигидрофосфат калия, динатрийфосфат и/или хлорид магния и т. п. В некоторых случаях композиция составлена с одной или несколькими фармацевтически приемлемыми солями. Одна или несколько фармацевтически приемлемых солей могут включать соли неорганических ионов, таких как, например, ионы натрия, калия, кальция, магния и т. п. Такие соли могут включать соли с неорганическими или органическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, азотная кислота, серная кислота, метансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота,

уксусная кислота, фумаровая кислота, янтарная кислота, молочная кислота, миндальная кислота, яблочная кислота, лимонная кислота, винная кислота или малеиновая кислота. Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

Буферы/pH

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может содержать один или несколько буферов, таких как Tris-буфер; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер (например, с адьювантом, представляющим собой гидроксид алюминия) или цитратный буфер. Буферы в некоторых случаях содержатся в диапазоне 5-20 мМ.

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может иметь значение pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,5, от приблизительно 6,0 до приблизительно 8,0, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5 или от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,8. Композиция или фармацевтическая композиция может иметь значение pH приблизительно 7. Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

Детергенты/поверхностно-активные вещества

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может содержать один или несколько детергентов и/или поверхностно-активных веществ, в зависимости от предполагаемого пути введения, например, поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемые "Tween"), например, полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), продаваемые под торговой маркой DOWFAX™, такие как линейные блок-сополимеры EO/PO; октоксинолы, которые могут различаться по числу повторяющихся этокси(окси-1,2-этандиильных) групп, например, октоксинол-9 (Triton X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (лецитин); этоксилаты нонилфенола, такие как серия Tergitol™ NP; эфиры полиоксиэтилена и жирных кислот, полученные из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известные как поверхностно-активные вещества Brij), такие как монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30), и сложные эфиры сорбитана (широко известные как "SPAN"), такие как сорбитантриолеат (Span 85) и сорбитанмонолаурат, октоксинол (такой как октоксинол-9 (Triton X-100) или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол), бромид цетилтриметиламмония ("СТАВ") или дезоксихолат натрия. Один или несколько детергентов и/или поверхностно-активных веществ могут присутствовать только в следовых количествах. В некоторых случаях

композиция может содержать менее 1 мг/мл каждого из октоксинала-10 и полисорбата 80. В данном документе могут применяться неионогенные поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества можно классифицировать по их "HLB" (гидрофильно-липофильный баланс). В некоторых случаях поверхностно-активные вещества обладают HLB по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 и/или по меньшей мере 16.

Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

Разбавители

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть доставлен в виде состава для доставки в "голом" виде, например, содержащего разбавитель. Состав для доставки в "голом" виде обеспечивает доставку кольцевого

полирибонуклеотида к клетке без помощи носителя и без модификации или частичной или полной инкапсуляции кольцевого полирибонуклеотида, кэпированного полирибонуклеотида или их комплекса.

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

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде не содержит каких-либо или всех из реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде не содержит фитогликогена октенилсукцината, фитогликогена бета-декстрина, модифицированного ангидридом фитогликогена бета-декстрина, липофектамина, полиэтиленimina, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимина, аминокликозид-полиамина, дидезоксиамино-*b*-циклодекстрина, спермина, спермидина, поли(2-диметиламино)этилметакрилата, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированного желатина, дендримеров, хитозана, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), хлорида N-[1-(2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорида 1-[2-(олеилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолиния (DOTIM), трифторацетата 2,3-диолеоилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорида 3β-[N—(N\N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HC1), дигептадециламидоглицилспермидина (DOGS), бромида N,N-дистеарил-N,N-

диметиламмония (DDAB), бромида N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопротеина низкой плотности (LDL), липопротеина высокой плотности (HDL) или глобулина.

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

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

Носители

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

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

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в клетке, везикуле или другом носителе на основе мембран, или такой кольцевой полирибонуклеотид обеспечивается с их помощью. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в липосомах или других сходных везикулах. Липосомы представляют собой сферические везикулярные структуры, состоящие из одно- или многослойного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и относительно непроницаемого внешнего липофильного фосфолипидного бислоя. Липосомы могут быть анионными, нейтральными или катионными. Липосомы являются биосовместимыми, нетоксичными, могут доставлять как гидрофильные, так и липофильные молекулы лекарственных средств, защищать свой "груз" от разрушения под действием ферментов плазмы крови и транспортировать свою нагрузку через биологические мембраны и гематоэнцефалический барьер (BBB) (обзор см., например, в Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, vol. 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679).

Везикулы можно получать из нескольких отличающихся типов липидов; однако для образования липосом в качестве носителей лекарственных средств чаще всего используются фосфолипиды. Способы получения многослойных липидных везикул известны из уровня техники (см., например, патент США № 6693086, идеи которого, относящиеся к получению многослойных липидных везикул, включены в данный документ посредством ссылки). Хотя образование везикул может быть спонтанным при смешивании липидной пленки с водным раствором, его также можно ускорить путем применения силы в форме встряхивания с применением гомогенизатора, соникатора или экструзионного аппарата (обзор см., например, в Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, vol. 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679). Экструдированные липиды можно получать посредством экструзии через фильтры с уменьшающимся размером пор, как описано в работе Templeton et al., *Nature Biotech*, 15:647-652, 1997, идеи которой, относящиеся к получению экструдированных липидов, включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит кольцевой полирибонуклеотид и липидные наночастицы, например липидные наночастицы, описанные в данном документе. Липидные наночастицы представляют собой другой пример носителя, который обеспечивает биосовместимую и биоразлагаемую систему доставки для молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Наноструктурированные липидные носители (NLC) представляют собой модифицированные твердые липидные наночастицы

(SLN), которые сохраняют характеристики SLN, улучшают стабильность и емкость загрузки лекарственного средства и предупреждают утечку лекарственного средства. Полимерные наночастицы (PNP) являются важным компонентом для доставки лекарственных средств. Эти наночастицы могут эффективно направлять доставку лекарственного средства к конкретным мишеням и улучшать стабильность лекарственного средства и контролируемое высвобождение лекарственного средства. Также можно использовать липидно-полимерные наночастицы (PLN), новый тип носителя, который является комбинацией липосом и полимеров. Эти наночастицы обладают взаимодополняющими преимуществами PNP и липосом. PLN состоит из структуры сердцевина-оболочка; полимерная сердцевина обеспечивает стабильную структуру, а фосфолипидная оболочка обеспечивает хорошую биосовместимость. Таким образом, эти два компонента обеспечивают повышение показателя эффективности инкапсуляции лекарственного средства, способствуют модификации поверхности и предупреждают утечку водорастворимых лекарственных средств. Обзор см., например, в Li et al. 2017, *Nanomaterials* 7, 122; doi:10.3390/nano7060122.

Дополнительные неограничивающие примеры носителей включают углеводные носители (например, ангидрид-модифицированный фитогликоген или материал типа гликогена), белковые носители (например, белок, ковалентно связанный с кольцевым полирибонуклеотидом), или катионные носители (например, катионный липополимер или реагент для трансфекции). Неограничивающие примеры углеводных носителей включают фитогликоген октенилсукцинат, фитогликоген бета-декстрин, модифицированный ангидридом фитогликоген бета-декстрин. Неограничивающие примеры катионных носителей включают липофектамин, полиэтиленимин, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимин, аминокликозид-полиамин, дидезоксиамино-b-циклодекстрин, спермин, спермидин, поли(2-диметиламино)этилметакрилат, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированный желатин, дендримеры, хитозан, 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP), хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорид 1-[2-(олеилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолия (DOTIM), трифторацетат 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорид 3β-[N-(N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HC1), дигептадециламидоглицилспермидин (DOGS), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромид N-(1,2-диамиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE) и хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC).

Неограничивающие примеры белковых носителей включают человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин.

Экзосомы также могут применяться в качестве сред-носителей для доставки лекарственных средств для композиции или препарата на основе кольцевой РНК, описанных в данном документе. Обзор см. в работе Ha et al. за июль 2016 года, *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, том 6, выпуск 4, страницы 287-296; <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>.

Дифференцированные *ex vivo* эритроциты также можно применять в качестве носителя для композиции или препарата на основе кольцевой РНК, описанных в данном документе. См., например, международные публикации заявок на патент № WO2015/073587; WO2017/123646; WO2017/123644; WO2018/102740; WO2016/183482; WO2015/153102; WO2018/151829; WO2018/009838; Shi et al. 2014. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(28): 10131–10136; патент США № 9644180; Huang et al. 2017. *Nature Communications* 8: 423; Shi et al. 2014. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(28): 10131-10136.

Композиции на основе фузосом, например, описанные в международной публикации заявки на патент № WO2018/208728, также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе.

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

Нановезикулы растений и пакеты-мессенджеры растений (PMP), например, описанные в международных публикациях заявок на патент № WO2011/097480, WO2013/070324, WO2017/004526 или WO2020/041784, также могут применяться в качестве носителей для доставки композиции или препарата на основе кольцевой РНК, описанных в данном документе.

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

Носитель, содержащий описанные в данном документе кольцевые полирибонуклеотиды, может содержать множество частиц. Частицы могут

характеризоваться средним размером от 30 до 700 нанометров (например, от 30 до 50, от 50 до 100, от 100 до 200, от 200 до 300, от 300 до 400, от 400 до 500, от 500 до 600, от 600 до 700, от 100 до 500, от 50 до 500 или от 200 до 700 нанометров). Размер частицы может быть оптимизирован для способствования отложению нагрузки, включая кольцевой полирибонуклеотид, в клетке. Отложению кольцевого полирибонуклеотида в определенных типах клеток могут способствовать отличающиеся размеры частиц. Например, размер частиц может быть оптимизирован для отложения кольцевого полирибонуклеотида в антигенпрезентирующих клетках. Размер частиц может быть оптимизирован для отложения кольцевого полирибонуклеотида в дендритных клетках. Кроме того, размер частиц может быть оптимизирован для отложения кольцевого полирибонуклеотида в клетках дренирующих лимфатических узлов.

Липидные наночастицы

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

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

В некоторых вариантах осуществления конъюгированные липиды в случае их присутствия могут включать одно или несколько из PEG-диацилглицерина (DAG) (такого как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG)), PEG-диалкилоксипропила (DAA), PEG-фосфолипида, PEG-церамида (Cer), пегилированного фосфатидилэтаноламина (PEG-PE), PEG-сукцинатдиацилглицерина (PEG-DAG) (такого как 4-0-(2',3'-ди(тетрадеканоиокси)пропил-1-0-(ω-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат

(PEG-S-DMG)), PEG-диалкоксипропилкарбама, натриевой соли N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина и соединений, описанных в таблице 2 документа WO2019051289 (включенного посредством ссылки), а также комбинаций вышеперечисленного.

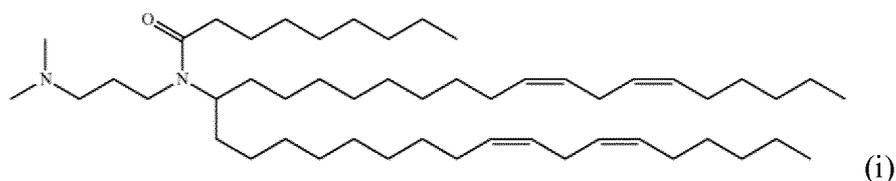
В некоторых вариантах осуществления стерина, которые могут быть включены в липидные наночастицы, включают одно или несколько из холестерина или производных холестерина, например, таких, как в документах W02009/127060 или US2010/0130588, которые включены посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные стерина включают фитостерина, в том числе описанные в работе Eurgeris et al. (2020), [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386), включенной в данный документ посредством ссылки.

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

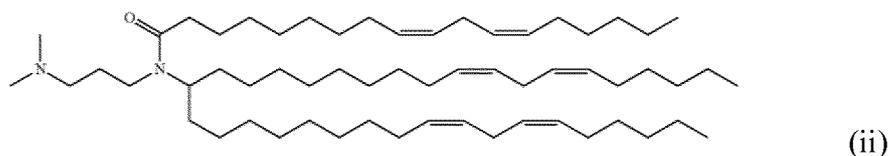
В некоторых вариантах осуществления отношение липидов к нуклеиновой кислоте (отношение масса/масса; отношение вес/вес) может находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от приблизительно 10:1 до приблизительно 14:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от приблизительно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

в составе на основе липидных наночастиц может находиться в диапазоне от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 30 мг/мл.

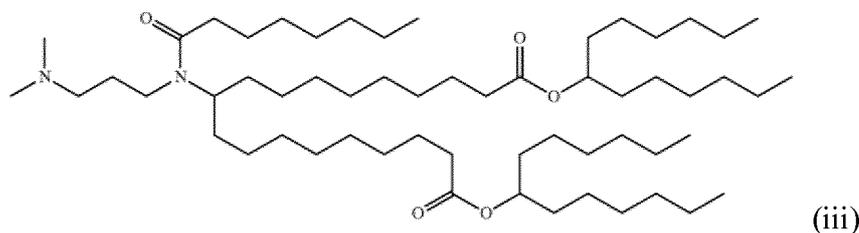
Некоторые неограничивающие примеры липидных соединений, которые можно применять (например, в комбинации с другими липидными компонентами) для образования липидных наночастиц для доставки композиций, описанных в данном документе, например, нуклеиновой кислоты (например, РНК (например, кольцевого полирибонуклеотида,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



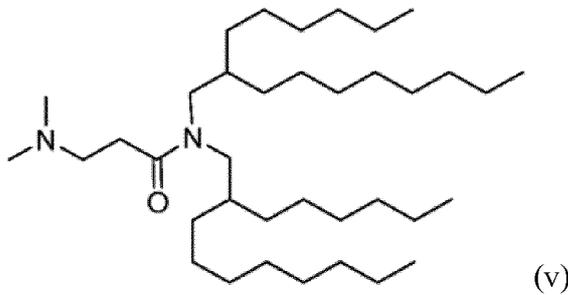
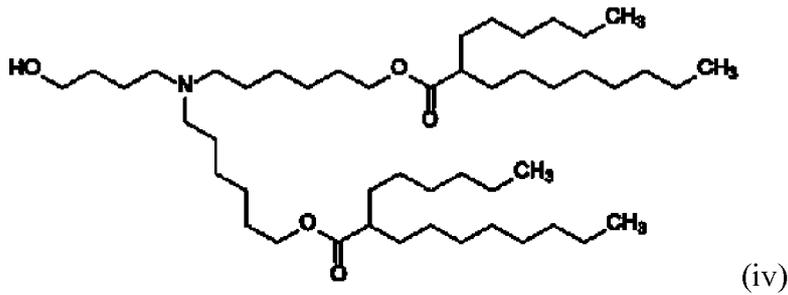
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (i), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



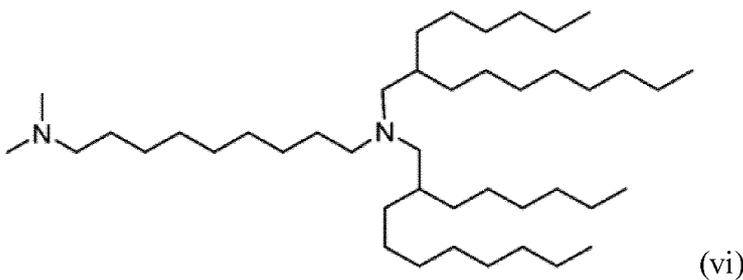
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (ii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



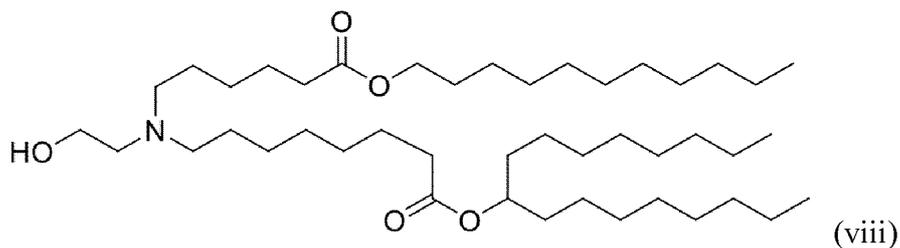
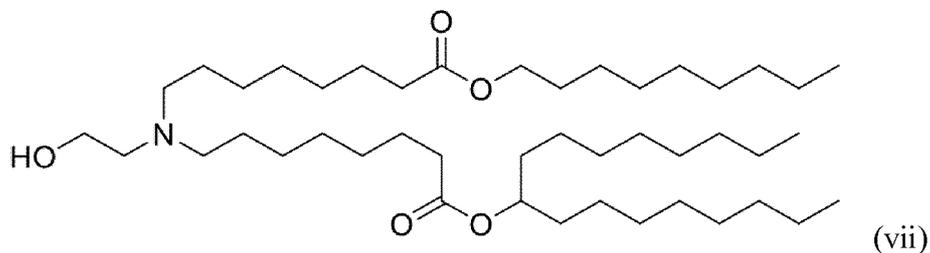
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (iii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



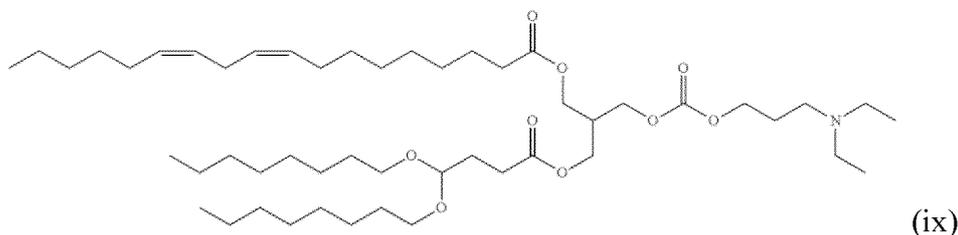
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (v), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



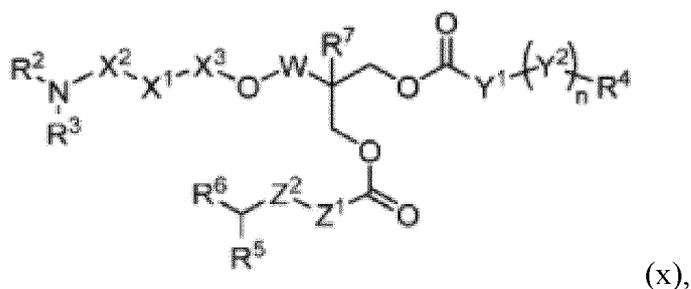
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (vi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



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

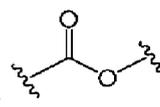
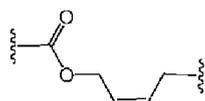
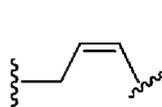


В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (ix), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



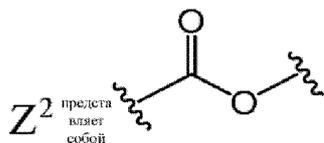
где

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



(в любой ориентации), (в любой ориентации), (в любой ориентации),

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

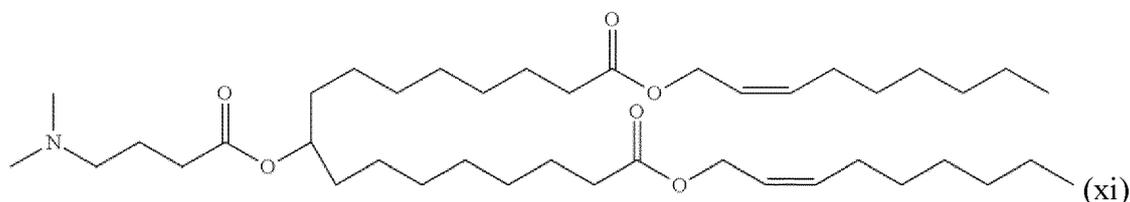


(в любой ориентации) или отсутствует, при условии, что если Z^1 представляет собой прямую связь, то Z^2 отсутствует;

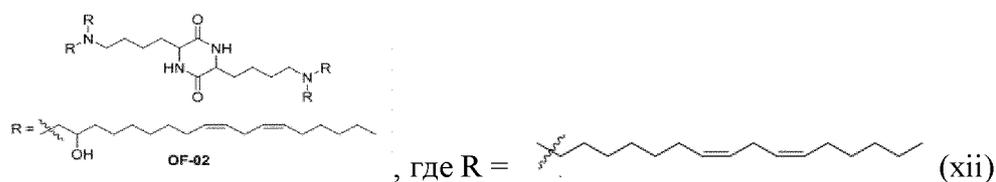
R^5 представляет собой C5-9-алкил или C6-10-алкокси, R^6 представляет собой C5-9-алкил или C6-10-алкокси, W представляет собой метилен или прямую связь, и R^7 представляет собой H или Me или их соль, при условии, что если R^3 и R^2 представляют собой C2-алкилы, X^1 представляет собой O, X^2 представляет собой линейный C3-алкилен, X^3 представляет собой C(=O), Y^1 представляет собой линейный C6-алкилен, $(Y^2)_n-R^4$ представляет собой

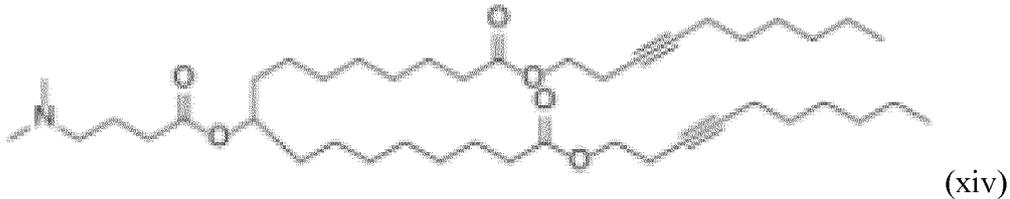
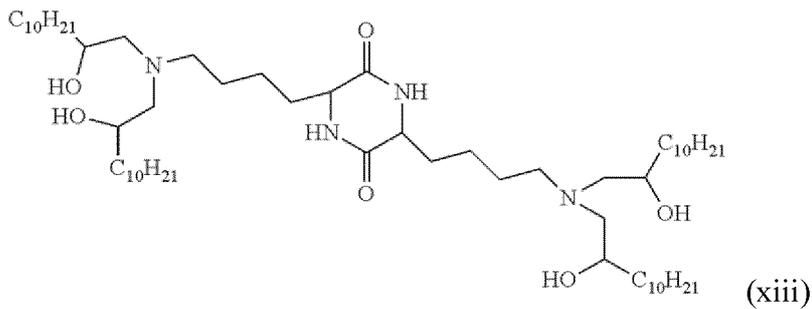
, R^4 представляет собой линейный C5-алкил, Z^1 представляет собой C2-алкилен, Z^2 отсутствует, W представляет собой метилен, и R^7 представляет собой H, то R^5 и R^6 не представляют собой Cx-алкокси.

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

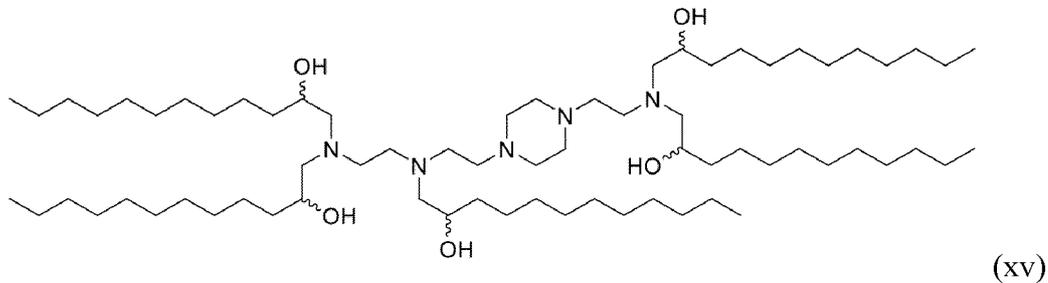


В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.

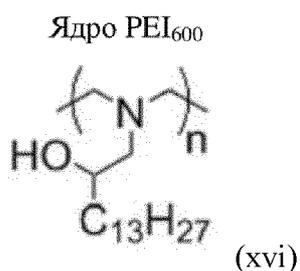




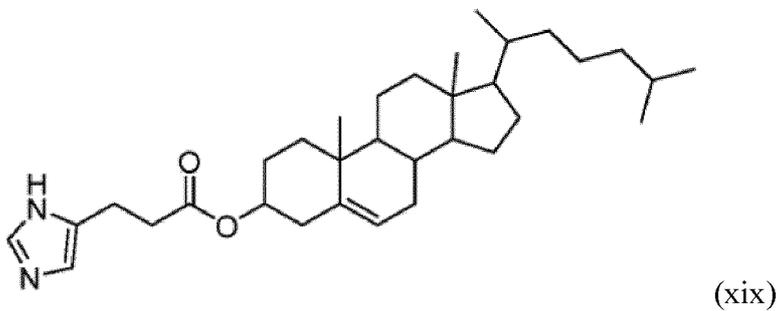
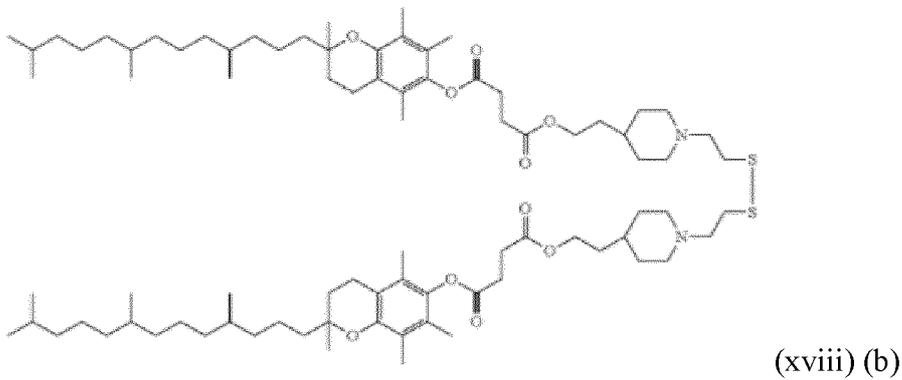
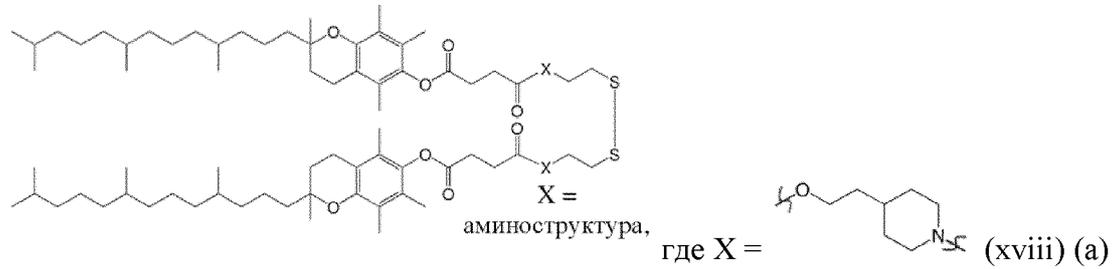
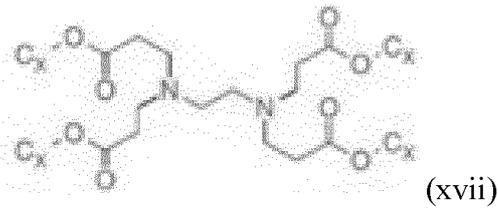
В некоторых вариантах осуществления LNP содержит соединение формулы (xiii) и соединение формулы (xiv).



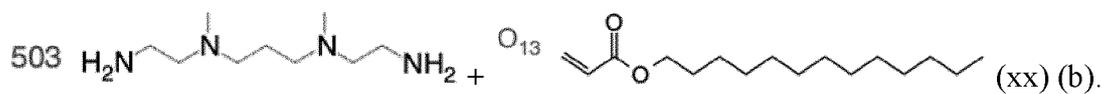
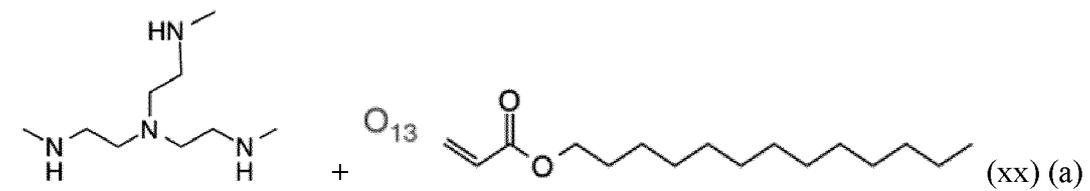
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xv), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



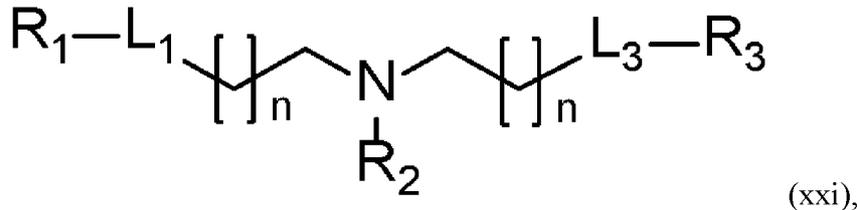
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xvi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



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



В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxi) представляет собой LNP, описанную в WO2021113777 (например, липид формулы (1), такой как липид из таблицы 1 в WO2021113777).

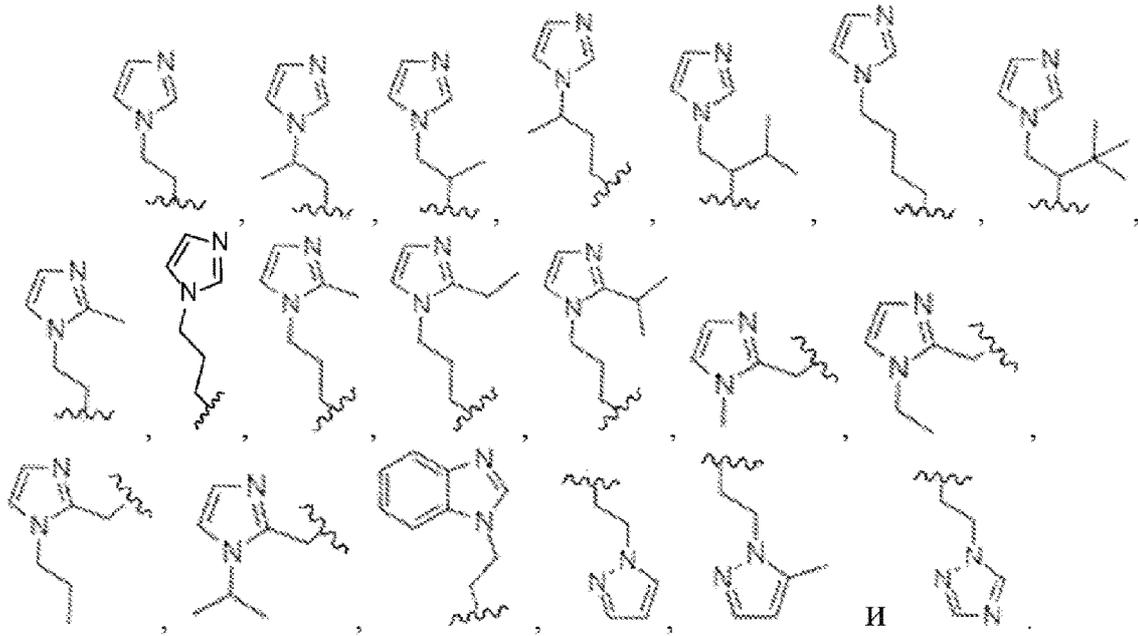


где

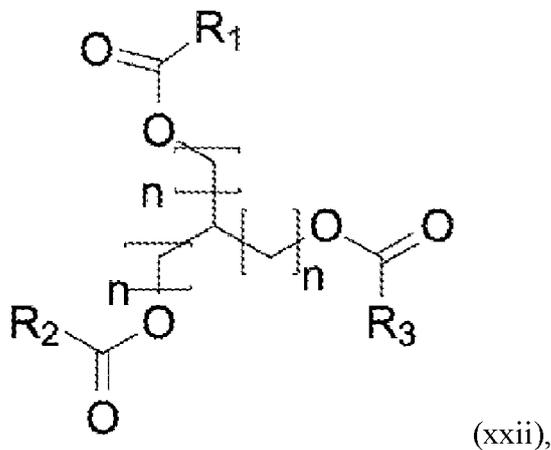
каждый n независимо представляет собой целое число от 2 до 15; каждый из L_1 и L_3 независимо представляют собой $-\text{OC}(\text{O})-^*$ или $-\text{C}(\text{O})\text{O}-^*$, где "*" указывает точку присоединения к R_1 или R_3 ;

каждый из R_1 и R_3 независимо представляют собой линейный или разветвленный C_9 - C_{20} алкил или C_9 - C_{20} алкенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо, галогена, гидрокси, циано, алкила, алкенила, альдегида, гетероциклилалкила, гидроксиалкила, дигидроксиалкила, гидроксиалкиламиноалкила, аминоалкила, алкиламиноалкила, диалкиламиноалкила, (гетероциклил)(алкил)аминоалкила, гетероциклила, гетероарила, алкилгетероарила, алкинила, алкокси, amino, диалкиламино, аминоалкилкарбониламино, аминокарбонилалкиламино, (аминокарбонилалкил)(алкил)амино, алкенилкарбониламино, гидроксикарбонила, алкилоксикарбонила, аминокарбонила, аминоалкиламинокарбонила, алкиламиноалкиламинокарбонила, диалкиламиноалкиламинокарбонила, гетероциклилалкиламинокарбонила, (алкиламиноалкил)(алкил)аминокарбонила, алкиламиноалкилкарбонила, диалкиламиноалкилкарбонила, гетероциклилкарбонила, алкенилкарбонила, алкинилкарбонила, алкилсульфоксида, алкилсульфоксидалкила, алкилсульфонила и алкилсульфоналкила; и

R_2 выбран из группы, состоящей из:



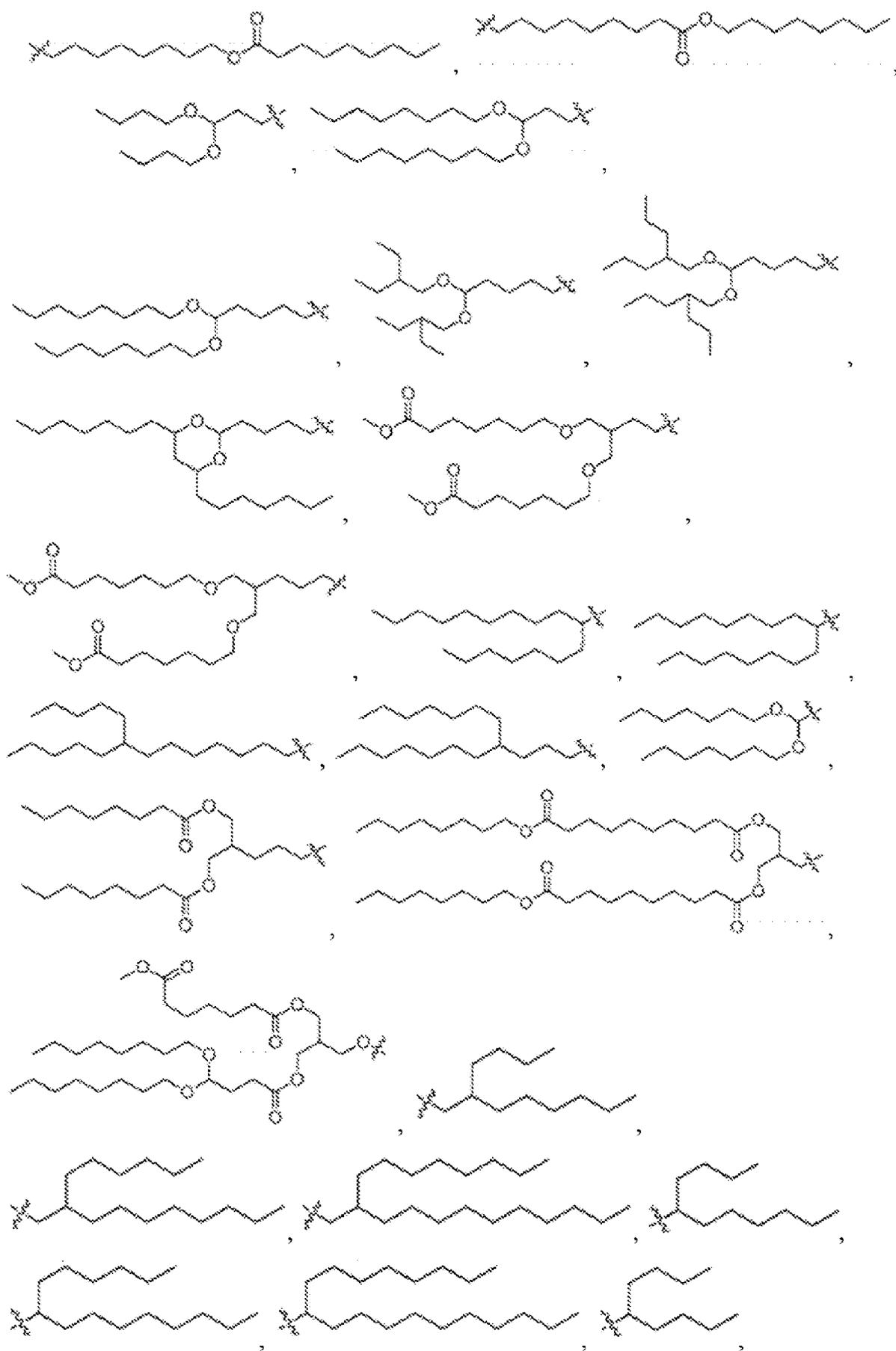
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxii) представляет собой LNP, описанную в WO2021113777 (например, липид формулы (2), такой как липид из таблицы 2 в WO2021113777).



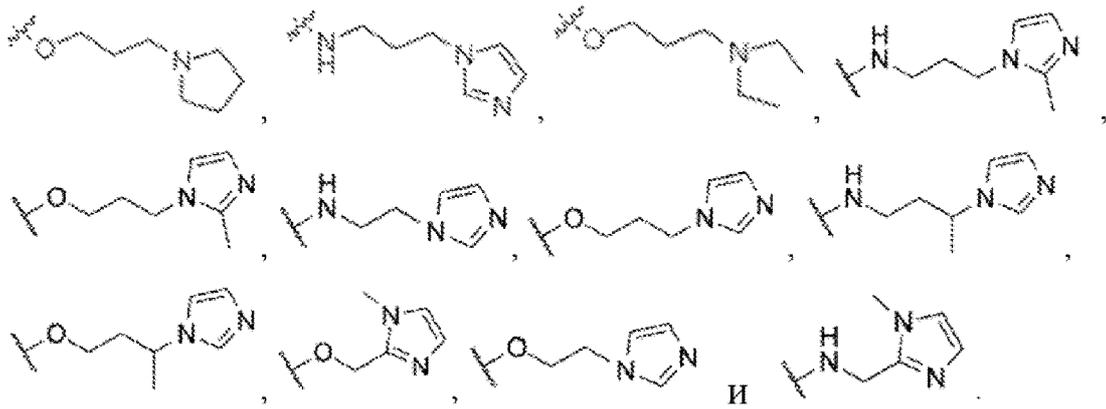
где

каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 15;

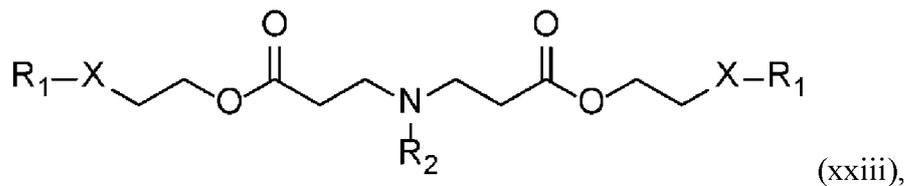
Каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из:



R₃ выбран из группы, состоящей из:



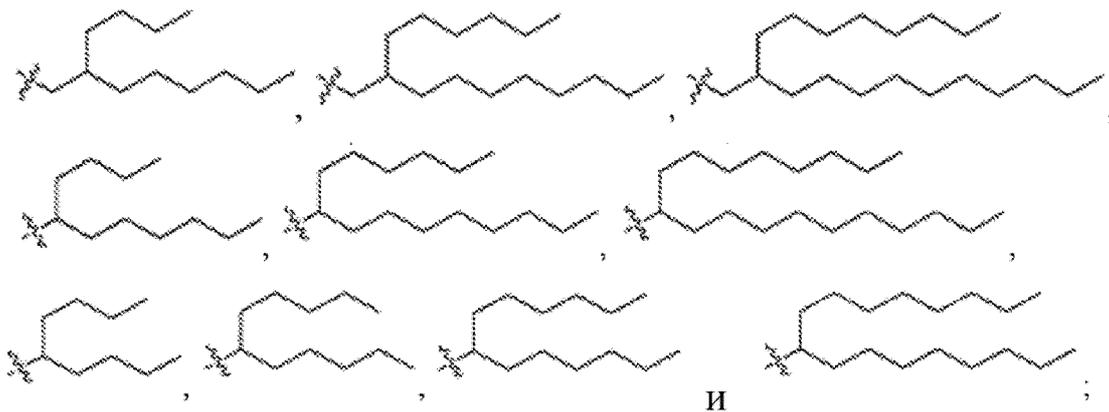
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxiii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxiii) представляет собой LNP, описанную в WO2021113777 (например, липид формулы (3), такой как липид из таблицы 3 в WO2021113777).



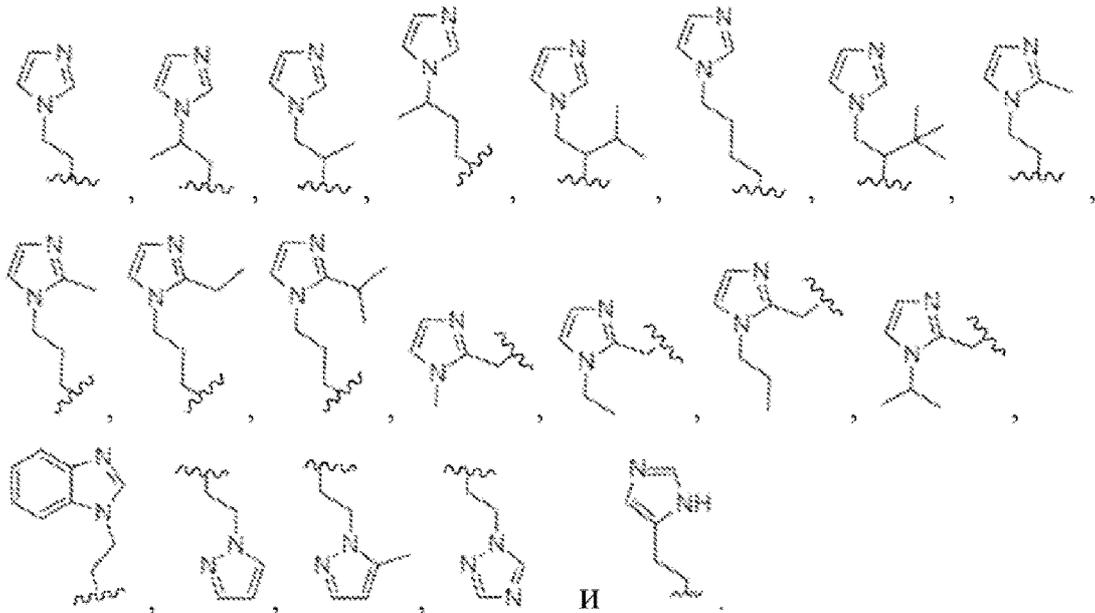
где

X выбран из -O-, -S- или -OC(O)-*, где * указывает точку присоединения к R₁;

R₁ выбран из группы, состоящей из:



и R₂ выбран из группы, состоящей из:



В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе (например, нуклеиновая кислота (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид) или белок), представлена в LNP, которая содержит ионизируемый липид. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой гептадекан-9-ил-8-((2-гидроксиэтил)(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил)амино)октаноат (SM-102); например, описанный в примере 1 документа US9867888 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилотдадека-9,12-диеноат (LP01), например, синтезированный в примере 13 из документа WO2015/095340 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)-9-(((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L319), например, синтезированный в примере 7, 8 или 9 документа US2012/0027803 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой 1,1'-((2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азандиил)бис(додекан-2-ол) (C12-200), например, синтезированный в примерах 14 и 16 документа WO2010/053572 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой липид на основе сложного эфира холестерина и имидазола (ICE) – (3S,10R,13R,17R)-10, 13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил-3-(1H-имидазол-4-ил)пропаноат, например, структуру (I) из документа WO2020/106946 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид может представлять собой катионный липид, ионизируемый катионный липид, например, катионный липид, который может существовать в положительно заряженной или нейтральной форме в зависимости от pH, или аминокислотный липид, который легко поддается протонированию. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой липид, способный быть положительно заряженным, например, в физиологических условиях. Иллюстративные катионные липиды содержат одну или несколько аминогрупп, которые несут положительный заряд. В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит катионный липид в составе с одним или несколькими нейтральными липидами, ионизируемыми аминокислотными липидами, биоразлагаемыми алкиновыми липидами, стероидами, фосфолипидами, включая полиненасыщенные липиды, структурными липидами (например, стеринами), PEG, холестерином и липидами, конъюгированными с полимером. В некоторых вариантах осуществления катионный липид может представлять собой ионизируемый катионный липид. Иллюстративный катионный липид, раскрытый в данном документе, может характеризоваться значением эффективной pK_a , составляющим более 6,0. В вариантах осуществления липидная наночастица может содержать второй катионный липид, характеризующийся другим значением эффективной pK_a (например, более высоким, чем значение первой эффективной pK_a) по сравнению с первым катионным липидом. Липидная наночастица может содержать от 40 до 60 молярных процентов катионного липида, нейтрального липида, стероида, липида, конъюгированного с полимером, и терапевтического средства, например, нуклеиновой кислоты (например, РНК (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида)), описанной в данном документе, инкапсулированной внутри липидной наночастицы или ассоциированной с ней. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота составлена совместно с катионным липидом. Нуклеиновая кислота может быть адсорбирована на поверхности LNP, например, LNP, содержащей катионный липид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть инкапсулирована в LNP, например, в LNP, содержащую катионный липид. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица может содержать нацеливающий компонент, например, она покрыта нацеливающим средством. В вариантах осуществления состав на основе LNP является биоразлагаемым. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица,

содержащая один или несколько липидов, описанных в данном документе, например, соединения формулы (i), (ii), (ii), (vii) и/или (ix), инкапсулирует по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или 100% молекулы РНК.

Иллюстративные ионизируемые липиды, которые можно применять в составах на основе липидных наночастиц, включают без ограничения липиды, перечисленные в таблице 1 документа WO2019051289, включенного в данный документ посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные липиды включают без ограничения соединения одной или нескольких из следующих формул: X из US2016/0311759; I из US20150376115 или из US2016/0376224; I, II или III из US20160151284; I, IA, II или IIA из US20170210967; I-с из US20150140070; A из US2013/0178541; I из US2013/0303587 или US2013/0123338; I из US2015/0141678; II, III, IV или V из US2015/0239926; I из US2017/0119904; I или II из WO2017/117528; A из US2012/0149894; A из US2015/0057373; A из WO2013/116126; A из US2013/0090372; A из US2013/0274523; A из US2013/0274504; A из US2013/0053572; A из WO2013/016058; A из WO2012/162210; I из US2008/042973; I, II, III или IV из US2012/01287670; I или II из US2014/0200257; I, II или III из US2015/0203446; I или III из US2015/0005363; I, IA, IB, IC, ID, II, IIA, IIB, IIC, IID или III-XXIV из US2014/0308304; из US2013/0338210; I, II, III или IV из WO2009/132131; A из US2012/01011478; I или XXXV из US2012/0027796; XIV или XVII из US2012/0058144; из US2013/0323269; I из US2011/0117125; I, II или III из US2011/0256175; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII из US2012/0202871; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV или XVI из US2011/0076335; I или II из US2006/008378; I из US2013/0123338; I или X-A-Y-Z из US2015/0064242; XVI, XVII или XVIII из US2013/0022649; I, II или III из US2013/0116307; I, II или III из US2013/0116307; I или II из US2010/0062967; I-X из US2013/0189351; I из US2014/0039032; V из US2018/0028664; I из US2016/0317458; I из US2013/0195920; 5, 6 или 10 из US10,221,127; III-3 из WO2018/081480; I-5 или I-8 из WO2020/081938; 18 или 25 из US9,867,888; A из US2019/0136231; II из WO2020/219876; 1 из US2012/0027803; OF-02 из US2019/0240349; 23 из US10,086,013; cKK-E12/A6 из Miao et al (2020); C12-200 из WO2010/053572; 7C1 из Dahlman et al (2017); 304-O13 или 503-O13 из Whitehead et al; TS-P4C2 из US9,708,628; I из WO2020/106946; I из WO2020/106946 и (1), (2), (3) или (4) из WO2021/113777. Иллюстративные липиды дополнительно предусматривают липид, указанный в любой из таблиц 1-16 из WO2021/113777.

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

Иллюстративные некатионные липиды включают без ограничения дистеароил-sn-глицерофосфоэтаноламин, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), монометилфосфатидилэтаноламин (такой как 16-О-монометил-PE), диметилфосфатидилэтаноламин (такой как 16-О-диметил-PE), 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE), гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC), яичный фосфатидилхолин (EPC), диолеоилфосфатидилсерин (DOPS), сфингомиелин (SM), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG), диэрукоилфосфатидилхолин (DEPC), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG), диэлаидоилфосфатидилэтаноламин (DEPE), лецитин, фосфатидилэтаноламин, лизолецитин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, сфингомиелин, яичный сфингомиелин (ESM), цефалин, кардиолипин, фосфатидную кислоту, цереброзиды, дицетилфосфат, лизофосфатидилхолин, дилинолеоилфосфатидилхолин или их смеси. Понятно, что можно также применять другие диацилфосфатидилхолиновые и диацилфосфатидилэтаноламиновые фосфолипиды.

Ацильные группы в данных липидах предпочтительно представляют собой ацильные группы, полученные из жирных кислот, имеющих C10-C24-углеродные цепи, например, лауроила, миристоила, пальмитоила, стеароила или олеоила. Дополнительные иллюстративные липиды в определенных вариантах осуществления включают без ограничения липиды, описанные в работе Kim et al. (2020) [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386), включенной в данный документ посредством ссылки. Такие липиды включают в некоторых вариантах осуществления растительные липиды, которые, как было обнаружено, обеспечивают улучшение трансфекции с использованием mRNA в печени (например, DGTS).

Другие примеры неcatiонных липидов, пригодных для применения в липидных наночастицах, включают без ограничения липиды, не содержащие фосфор, такие как, например, стеариламин, додециламин, гексадециламин, ацетилпальмитат, глицеринрицинолеат, гексадецилстеарат, изопропилмиристат, амфотерные акриловые полимеры, лаурилсульфат триэтаноламина, алкиларилсульфат, полиэтилоксилированные амиды жирных кислот, бромид диоктадецилдиметиламмония, церамид, сфингомиелин и т. п. Другие неcatiонные липиды описаны в документе WO2017/099823 или в публикации заявки на патент США US2018/0028664, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления неcatiонный липид представляет собой олеиновую кислоту или соединение формулы I, II или IV из документа US2018/0028664, включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Неcatiонный липид может составлять, например, 0-30% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления содержание неcatiонных липидов составляет 5-20% (мол.) или 10-15% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. В вариантах осуществления молярное соотношение ионизируемых липидов и нейтральных липидов находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 8:1 (например, составляет приблизительно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 или 8:1).

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

В некоторых аспектах липидная наночастица может дополнительно содержать компонент, такой как стерин, для обеспечения целостности мембраны. Одним иллюстративным стеринном, который можно применять в липидной наночастице, является холестерин и его производные. Неограничивающие примеры производных холестерина включают полярные аналоги, такие как 5 α -холестанол, 5 β -копростанол, холестерил-(2-

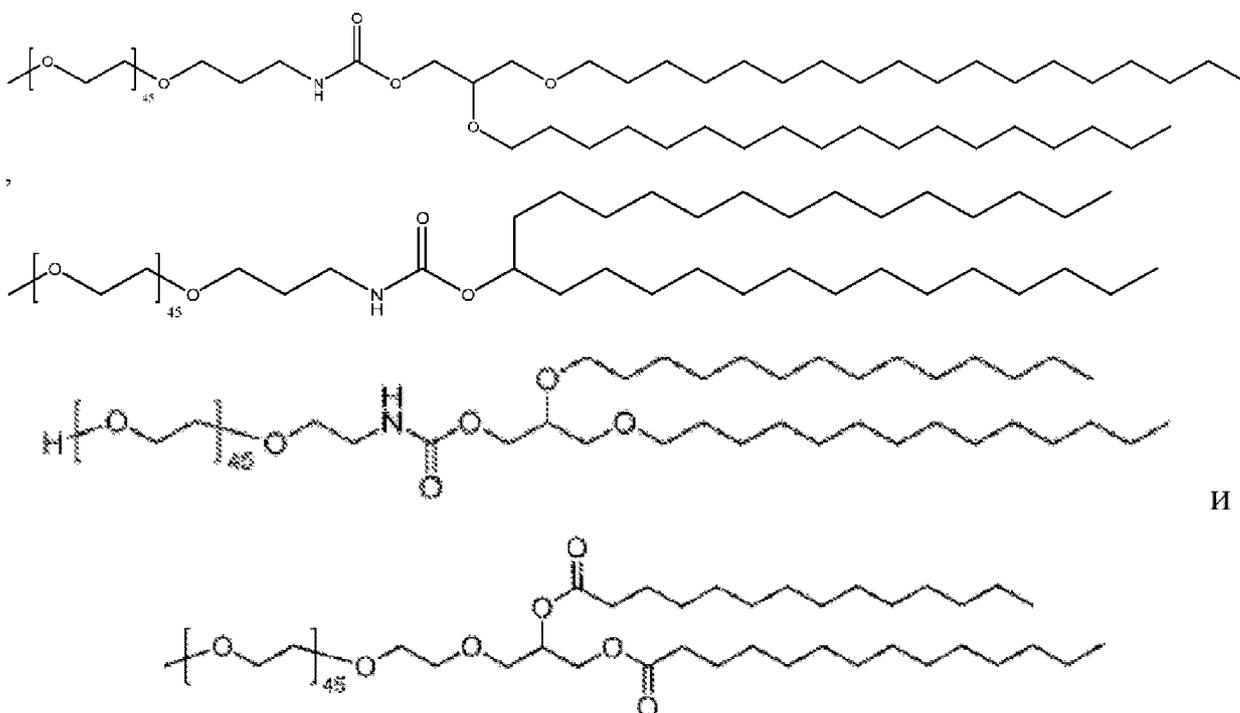
гидроксид)-этиловый эфир, холестерил-(4'-гидроксид)-бутиловый эфир и 6-кетохолестанол; неполярные аналоги, такие как 5 α -холестан, холестенон, 5 α -холестанон, 5 β -холестанон и холестерилдеcanoат и их смеси. В некоторых вариантах осуществления производное холестерина представляет собой полярный аналог, например, холестерил-(4'-гидроксид)бутиловый эфир. Иллюстративные производные холестерина описаны в публикации согласно РСТ W02009/127060 и публикации заявки на патент США US2010/0130588, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

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

Иллюстративные конъюгаты PEG-липид включают без ограничения PEG-диацилглицерин (DAG) (такой как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG)), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer), пегилированный фосфатидилэтанолламин (PEG-PE), PEG-сукцинатдиацилглицерин (PEGS-DAG) (например, 4-0-(2',3'-ди(тетрадеcanoилокси)пропил-1-0-(w-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG)), PEG-диалкоксипропилкарбам, натриевую соль N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламина или их смесь. Дополнительные иллюстративные конъюгаты PEG-липид описаны, например, в US5,885,613, US6,287,591, US2003/0077829, US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2010/0130588, US2016/0376224, US2017/0119904, US2018/0028664 и WO2017/099823, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых

вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы III, III-a-I, III-a-2, III-b-1, III-b-2 или V из документа US2018/0028664, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы II из документа US20150376115 или US2016/0376224, содержание обоих из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил, PEG-димиристилоксипропил, PEG-дипальмитилоксипропил или PEG-дистеарилоксипропил. PEG-липид может представлять собой один или несколько из PEG-DMG, PEG-дилаурилглицерина, PEG-дипальмитоилглицерина, PEG-дистерилглицерина, PEG-дилаурилгликамида, PEG-димирилглицерила, PEG-дипальмитоилгликамида, PEG-дистерилгликамида, PEG-холестерин-(1-[8'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диооксактанил]карбамоил-[омега]-метилполи(этиленгликоль), PEG-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполи(этиленгликолевого) эфира) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид предусматривает PEG-DMG, 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид предусматривает структуру, выбранную из следующего:



В некоторых вариантах осуществления вместо PEG-липида также можно использовать липиды, конъюгированные с молекулой, отличной от PEG. Например, вместо PEG-липида

или в дополнение к нему можно использовать конъюгаты полиоксазолин (POZ)-липид, конъюгаты полиамид-липид (такие как конъюгаты АТТА-липид) и конъюгаты катионный полимер-липид (GPL).

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

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

липиды по молям или от общего веса композиции, 2-25% холестерина по молям или от общего веса композиции, 10-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 5% холестерина по молям или от общего веса композиции; или 2-30% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 2-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, 1-15% холестерина по молям или от общего веса композиции, 2-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 1-20% холестерина по молям или от общего веса композиции, или даже не более 90% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции и 2-10% некатионных липидов по молям или от общего веса композиции, или даже 100% катионного липида по молям или от общего веса композиции. В некоторых вариантах осуществления состав на основе липидных частиц содержит ионизируемый липид, фосфолипид, холестерин и пегелированный липид при молярном соотношении 50:10:38,5: 1,5. В некоторых других вариантах осуществления состав на основе липидных частиц содержит ионизируемый липид, холестерин и пегелированный липид при молярном соотношении 60:38,5: 1,5.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления также могут быть включены одно или несколько дополнительных соединений. Данные соединения можно вводить отдельно, или дополнительные соединения могут быть включены в липидные наночастицы по настоящему изобретению. Другими словами, липидные наночастицы могут содержать другие соединения в дополнение к нуклеиновой кислоте или по меньшей мере вторую нуклеиновую кислоту, отличающуюся от первой. Другие дополнительные соединения

могут без ограничений быть выбраны из группы, состоящей из малых или больших органических или неорганических молекул, моносахаридов, дисахаридов, трисахаридов, олигосахаридов, полисахаридов, пептидов, белков, аналогов пептидов и их производных, пептидомиметиков, нуклеиновых кислот, аналогов нуклеиновых кислот и производных, экстрактов, полученных из биологических материалов, или любых их комбинаций.

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

В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от нескольких 10 нм до нескольких 100 нм, например, как измерено посредством динамического светорассеяния (DLS). В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 40 нм до приблизительно 150 нм, например приблизительно 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 50 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 70 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 60 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 70 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 90 нм или от приблизительно 90 нм до приблизительно 100 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP

может составлять от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм. В конкретном варианте осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять приблизительно 80 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять приблизительно 100 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP находится в диапазоне от приблизительно 1 мкм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 10 мкм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 20 мкм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 25 мкм до приблизительно 60 нм, от приблизительно 30 мкм до приблизительно 55 нм, от приблизительно 35 мкм до приблизительно 50 нм или от приблизительно 38 мкм до приблизительно 42 мкм.

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

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

приблизительно 0 мВ до приблизительно +10 мВ, от приблизительно 0 мВ до приблизительно +5 мВ, от приблизительно +5 мВ до приблизительно +20 мВ, от приблизительно +5 мВ до приблизительно +15 мВ или от приблизительно +5 мВ до приблизительно +10 мВ.

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

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

Дополнительные иллюстративные липиды, составы, способы и определение характеристик LNP описаны в документах WO2020/061457, WO2021/113777 и WO2021226597, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительные иллюстративные липиды, составы, способы и определение характеристик LNP описаны в работе Hou et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater* (2021). doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (см., например, иллюстративные липиды и производные липидов на фиг. 2 в работе Hou et al.).

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

Составы на основе LNP, оптимизированные для доставки систем CRISPR-Cas, например, RNP Cas9-gRNA, gRNA, mRNA Cas9, описаны в документах WO2019067992 и WO2019067910, оба из которых включены посредством ссылки, и являются применимыми для доставки кольцевых полирибонуклеотидов и линейных полирибонуклеотидов, описанных в данном документе.

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

В вариантах осуществления полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид), кодирующий по меньшей мере часть (например, антигенную часть) иммуногена или полипептида, описанных в данном документе, составлен в виде LNP, где: (a) LNP содержат катионный липид, нейтральный липид, холестерин и PEG-липид, (b) LNP характеризуются средним размером частиц от 80 нм до 160 нм, и (c) полирибонуклеотид содержит: (i) структуру 5'-кэп; (ii) 5'-UTR; (iii) N1-метилпсевдоуридин, цитозин, аденин и гуанин; (iv) 3'-UTR; и (v) область поли(A). В вариантах осуществления полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид), составленный в LNP, представляет собой вакцину.

Иллюстративная дозировка LNP на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида) может предусматривать приблизительно 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 или 100 мг/кг (ПНК). В некоторых вариантах осуществления доза иммуногенной композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, составляет 30-200 мкг, например, 30 мкг, 50 мкг, 75 мкг, 100 мкг, 150

мкг или 200 мкг. Иллюстративная дозировка AAV, содержащего полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид), может предусматривать МОИ, составляющую приблизительно 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} и 10^{14} в. г./кг.

Наборы

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает набор. В некоторых вариантах осуществления набор содержит (а) кольцевой полирибонуклеотид, иммуногенную композицию или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, и необязательно (b) информационный материал. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит адъювант, описанный в данном документе, который может быть представлен в виде отдельной композиции для введения в комбинации с кольцевым полирибонуклеотидом, иммуногенной композицией или фармацевтической композицией как часть определенного режима введения доз. Информационный материал может представлять собой описательный, учебный, маркетинговый или другой материал, который относится к способам, описанным в данном документе, и/или к применению фармацевтической композиции или кольцевого полирибонуклеотида для способов, описанных в данном документе. Фармацевтическая композиция или кольцевой полирибонуклеотид могут содержать материал для однократного введения (например, лекарственную форму для однократного введения) или могут содержать материал для многократного введения (например, "многодозовый" набор).

Информационный материал в наборах не ограничен по форме. В одном варианте осуществления информационный материал может включать информацию о получении фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, молекулярную массу фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, концентрацию, дату истечения срока годности, информацию о партии или месте производства и т. п. В одном варианте осуществления информационный материал относится к способам введения лекарственной формы фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления информационный материал относится к способам введения лекарственной формы кольцевого полирибонуклеотида.

В дополнение к лекарственной форме фармацевтической композиции и кольцевого полирибонуклеотида, описанных в данном документе, набор может содержать другие ингредиенты, такие как растворитель или буфер, стабилизатор, консервант, ароматизатор (например, антагонист горького вкуса или подсластитель), ароматическая добавка, краситель или красящее средство, например, для окрашивания одного или нескольких

компонентов в наборе или придания им оттенка, или другой косметический ингредиент и/или второе средство для лечения состояния или нарушения, описанных в данном документе. В качестве альтернативы, другие ингредиенты могут быть включены в набор, но в композициях или контейнерах, отличных от фармацевтической композиции или кольцевого полирибонуклеотида, описанных в данном документе. В таких вариантах осуществления набор может содержать инструкции для смешивания фармацевтической композиции или молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), описанных в данном документе, и других ингредиентов, или для применения фармацевтической композиции или молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), описанных в данном документе, вместе с другими ингредиентами.

В некоторых вариантах осуществления компоненты набора хранят в инертных условиях (например, в атмосфере азота или другого инертного газа, такого как аргон). В некоторых вариантах осуществления компоненты набора хранят в безводных условиях (например, с осушителем). В некоторых вариантах осуществления компоненты хранят в светоблокирующем контейнере, таком как флакон из желтого стекла.

Лекарственная форма фармацевтической композиции или молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), описанных в данном документе, может быть представлена в любой форме, например, в жидкой, высушенной или лиофилизированной форме. Предпочтительно, чтобы фармацевтическая композиция или молекула нуклеиновой кислоты (например, кольцевой полирибонуклеотид), описанные в данном документе, были по сути чистыми и/или стерильными. Если фармацевтическая композиция или молекула нуклеиновой кислоты (например, кольцевой полирибонуклеотид), описанные в данном документе, представлены в жидком растворе, жидкий раствор предпочтительно представляет собой водный раствор, при этом стерильный водный раствор является предпочтительным. Если фармацевтическая композиция или молекула нуклеиновой кислоты (например, кольцевой полирибонуклеотид), описанные в данном документе, представлены в виде высушенной формы, восстановление обычно происходит посредством добавления подходящего растворителя. Растворитель, например, стерильная вода или буфер, необязательно может быть предоставлен в наборе.

Набор может содержать один или несколько контейнеров для композиции, содержащей лекарственную форму, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит отдельные контейнеры, перегородки или отсеки для композиции и информационного материала. Например, фармацевтическая композиция

или кольцевой полирибонуклеотид могут содержаться в бутылке, флаконе или шприце, а информационный материал может содержаться в пластиковом рукаве или пакете. В других вариантах осуществления отдельные элементы набора содержатся в одном контейнере без перегородок. Например, лекарственная форма фармацевтической композиции или молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), описанных в данном документе, содержится в бутылке, флаконе или шприце, к которым прикреплен информационный материал в форме этикетки. В некоторых вариантах осуществления набор содержит множество (например, упаковку) отдельных контейнеров, каждый из которых содержит одну или несколько стандартных лекарственных форм фармацевтической композиции или кольцевого полирибонуклеотида, описанных в данном документе. Например, набор содержит множество шприцев, ампул, пакетов из фольги или блистерных упаковок, при этом каждое из них содержит одну стандартную дозу лекарственной формы, описанной в данном документе.

Контейнеры в наборах могут быть воздухонепроницаемыми, водонепроницаемыми (например, невосприимчивыми к изменениям влажности или испарения) и/или светонепроницаемыми.

Набор необязательно содержит устройство, подходящее для применения лекарственной формы, например, шприц, пипетку, щипцы, мерную ложку, тампон (например, ватный тампон или деревянный тампон) или любое такое устройство.

Наборы по настоящему изобретению могут содержать лекарственные формы с различными концентрациями для обеспечения субъекта дозами, подходящими для одного или нескольких из режимов фазы инициации, режимов фазы индукции или режимов фазы поддерживающей терапии, описанных в данном документе. В качестве альтернативы набор может содержать делимую таблетку, позволяющую пользователю вводить разделенные дозы по мере необходимости.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры, которые предназначены для иллюстрации, а не для ограничения настоящего изобретения, представлены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники описание того, как композиции и способы, описанные в данном документе, могут применяться, изготавливаться и оцениваться. Примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением.

Пример 1. Экспрессия секретлируемых иммуногенов VZV *in vitro*

В данном примере продемонстрирована экспрессия секретлируемых иммуногенов VZV с кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

Кольцевую РНК конструировали таким образом, чтобы она содержала сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) и нуклеотидную последовательность, кодирующую секретлируемый иммуноген VZV. В данном примере ДНК-конструкции разрабатывали таким образом, что они содержали IRES, полинуклеотидный груз и спейсерный элемент. Конструкцию разрабатывали таким образом, чтобы она содержала polyA50 в качестве спейсерного элемента и комбинацию модифицированного IRES CVB3 (SEQ ID NO:113) и ORF в качестве полинуклеотидного груза. ORF содержала сигнальную последовательность секретируемой люциферазы *Gaussia* (Gluc), нуклеотидную последовательность gE VZV и нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT, содержащую последовательность VSGWRLFKKIS (SEQ ID NO: 123) с пептидным линкером GGGGS (SEQ ID NO: 112).

В данном примере кольцевые РНК получали посредством самосплайсинга с использованием способа, описанного в данном документе. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с применением РНК-полимеразы T7 с ДНК-матрицы, содержащей перечисленные выше мотивы, в присутствии 7,5 mM NTP. ДНК-матрицу удаляли путем обработки ДНКазой. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050). Самосплайсинг происходил во время транскрипции; дополнительной реакции не требовалось. Кольцевую РНК, кодирующую gE VZV, очищали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной (PAGE с мочевиной) или посредством колоночной хроматографии с обращенной фазой.

Кольцевой РНК (2 пикомоля) трансфицировали клетки HEK293T (200000 клеток на лунку в 96-луночной планшете в бессывороточной среде) с применением Lipofectamine MessengerMax (Invitrogen, LMRNA015) в соответствии с инструкциями производителя. MessengerMax отдельно использовали в качестве контроля (отрицательный контроль). В

качестве контроля также использовали плазмиду со вставленной нуклеотидной последовательностью секретируемого gE VZV (плазида Sec gE). Супернатант собирали через 18 часов и измеряли экспрессию с использованием gE-специфического ELISA. Планшеты для ELISA покрывали 5 мкг/мл антитела к gE в 100 мкл покрывающего буфера и инкубировали в течение ночи при 4°C. Супернатанты с трансфицированными клетками загружали в планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего трижды промывали с помощью TBS-T. Биотинилированное моноклональное антитело к gE (9C8) добавляли в планшет при разбавлении 1:1000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего трижды промывали с помощью TBS-T. Конъюгированный с HRP стрептавидин добавляли в планшет при разбавлении 1:10000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего четыре раза промывали с помощью TBS-T.

На фиг. 6 показано, что кольцевая РНК, кодирующая секретируемый gE (Sec gE), была успешно транслирована *in vitro*.

Пример 2. Экспрессия несекретируемых иммуногенов VZV *in vitro*

В данном примере продемонстрирована экспрессия несекретируемых иммуногенов VZV с кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

Кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали IRES и нуклеотидную последовательность, кодирующую трансмембранный иммуноген VZV. В данном примере ДНК-конструкции разрабатывали таким образом, что они содержали IRES, полинуклеотидный груз и спейсерный элемент. Конструкции №1, №2 и №3 разрабатывали таким образом, чтобы они содержали polyA50 в качестве спейсерного элемента и комбинацию модифицированного сайта внутренней посадки рибосомы CVB3 (IRES) (SEQ ID NO:113) и ORF в качестве полинуклеотидного груза. Конструкцию №4 разрабатывали таким образом, чтобы она содержала polyA50 в качестве спейсерного элемента и комбинацию IRES EV71 (SEQ ID NO:115) и ORF в качестве полинуклеотидного груза. ORF конструировали таким образом, чтобы она содержала нуклеотидную последовательность трансмембранного gE VZV и нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT с пептидным линкером G4S. В данном примере получали четыре различные конструкции, при этом каждая характеризовалась отличающейся нуклеотидной последовательностью трансмембранного gE VZV (SEQ ID NO: 124-128), описанной в таблице 4. Кольцевые РНК получали, как описано в примере 1.

Кольцевой РНК (2 пикомоля) трансфицировали клетки HEK293T (20000 клеток на лунку в 96-луночном планшете в бессывороточной среде) с применением Lipofectamine

MessengerMax (Invitrogen, LMRNA015) в соответствии с инструкциями производителя.

MessengerMax отдельно использовали в качестве контроля. Клетки собирали через 24 часа после трансфекции, окрашивали красителем, позволяющим отличить живые клетки от мертвых, и зондировали антителом к gE (9C8), а затем конъюгированным с PE антителом к мышиному антителу. Экспрессию gE измеряли через 24 часа посредством проточной цитометрии.

На фиг. 7 показано, что умеренные и высокие уровни экспрессии gE были выявлены на клеточной поверхности клеток НЕК293Т из всех кольцевых РНК, кодирующих трансмембранный gE.

Таблица 4

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
124	atgggctcaaggtcctgttcgcctgatctgcatcgccgtggccgagggccatgggcaccgtgaacaagcccgtggtggc gtctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgaggatcaccaacccgtgcccggcagcgtgctgaggatgacgat ttccacatgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacggcagagctcctg ggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacgg ctctctggagaacggccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccgggcatcgacagcggcgagcggctgatgca gcccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacga ccggcacaagatcgtgaactggaccagcggcagtagggcagcgtgttaagggcgacctgaacccaagccccaggg ccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccttcaccctgcccggccccatccagcggatctacggcgtgc ggtacaccgaaacctggagcttctgcccagcctgacctgcaccggcgacggcctcccgccatccagcacatctgcctga agcacaccacctgctccaggacgtgggtgtgactgacgtggactgcgcccagagaacaccaaggaggaccagctggccgagat cagctaccggtccagggcaagaagaggccaccagcccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctgg agctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgaggaccgagaagcagtagctggcgtgtacatctgg aacatgcggggcagcagcggcaccagcacctacggcacccttctggtgacctggaaggcgacgagaagaccgggaac cccacccccggctgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtggg cgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggtgtacgtg cccatgacccccacctgccagccatgaggctgtacagcacctgcctgtaccacccaacggccccagtgctgagcca catgaacagcggctgcaccttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacg ccgacaactacaccgcctactgctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatctgcacgacggcggaacc accctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggcc gtggcctacaccgtggtcagcaccgtggacccttctgtaacgcatcgaggagcggggcttctcctaccgcccggccag cccccagccaccactaagccaaggagatcacccccgtgaacccccggcaccagccccctgatccggtacggcctgga

	<i>ccggcggcctggccggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc</i>
125	<p> <i>atggtgagcggctggcggctgttcaagaaatcagcggcggaggaggagtggcaccgtgaacaagcccgtggtggg</i> <i>cgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacga</i> <i>ttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctg</i> <i>ggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacgg</i> <i>cttctggagaaccccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgca</i> <i>gcccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacga</i> <i>ccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtagcggcagctgttcaaggggcagctgaacccaagccccaggg</i> <i>ccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccccttcacctgcgggccccatccagcggatctacggcgtgc</i> <i>ggtacaccgaaacctggagcttctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctga</i> <i>agcacaccacctgcttccaggacgtggtggtgactggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagat</i> <i>cagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctg</i> <i>gagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagctacctggcgtgtacatctg</i> <i>gaacatgcggggcgagcagcggcaccagcacctacgccaccttctggtgacctggaagggcgacgagaagaccggaa</i> <i>ccccacccccgcgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgg</i> <i>gcgacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtactg</i> <i>gcccacgacccccactgccagccatggcgtgtacagcacctgcctgtaccacccaacgccccagtgectgagcc</i> <i>acatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcac</i> <i>ggcgacaactacaccgctactgctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatctgcacgacggcggcac</i> <i>cacctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtactgttctggtgtacttcaacggccacgtggaggc</i> <i>cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttctgtaacgccatcgaggagcggggcttctcctaccgccggcca</i> <i>gccccagccaccactaagccaaggagatccccctgtaacccggcaccagccccctgatccggtacgccgcctgg</i> <i>accggcggcctggccgagtggtgctgtgtgctgctgctgatcttctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggcc</i> <i>gcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcggcctgccctggacgacttcgaggacagcagag</i> <i>agcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcgggaagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgaca</i> <i>agaccggg</i> </p>
126	<p> <i>atgggcaccgtgaacaagcccgtggtggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaacccc</i> <i>gtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgattccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagcccta</i> <i>ctatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagccc</i> <i>ctacatctggccccggaacgactacgacggcttctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccgg</i> <i>ggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcat</i> <i>ccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtagcggcagctgttc</i> </p>

	<p>aagggcgacctgaacccaagccccagggccagcggctgatcaggtgagcgtggaggaaaaccacccttcacctgc gggccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttctgccagcctgacctgcaccggcgac gccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgctccaggacgtggtggtgacgtggactgcgccgag aacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggtccagggaagaaagaggccgaccagccctggatcgtg gtgaacaccagcacctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggac cgagaagcagctacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttctgtga cctggaagggcgacgagaagaccggaaacccccccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgt ggaactaccacagccacgtgttcagcgtggcgacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcc cccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgccatcgacccccacctgccagccatgcggctgtacgacacctgctgt accacccaacgcccccaagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggccccagcgggtg gccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgctggcatcagccacatggagcca gttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccacctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgt tcgtggtgacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgcatc aggagcggggcttctcctaccgccggccagccccagccaccactaagcccaaggagatccccctgtaacccgg caccagccccctgatccggtacgccgctggaccggcggcctggccgacgtggtgctgtgtgctggtgatcttctgatc tgcaccgcaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcgccggc ctgcccgtggacgacttcaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgcatcggcgggagccac ggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagaccggggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgtcaag aagatcagc</p>
127	<p>atggtgagcggctggcggctgtcaagaaatcagcggcggaggaggagtggtgaccctgaacaagcccgtggtggg cgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggacagcgtgctgcggtacgacga ttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctg ggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacgg cttctggagaaccccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccgggcatcgacagcggcgagcggctgatgca gcccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacctgaacggcgacga ccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagctacggcgacgtgttaaggggcagctgaacccaagccccaggg ccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccttcacctgcgggccccatccagcggatctacggcgtgc ggtacaccgaaacctggagcttctgccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctga agcacaccacctgctccaggacgtggtggtgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagat cagctaccggtccagggaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcacctgttcgacgagctg gagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagctacctggcgtgtacatctg gaacatgcggggcagcagcggcaccagcacctacgccaccttctggtgacctggaagggcgacgagaagaccggaa ccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgg</p>

	<p>gcgacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtactg gcccacgacccacctgccagccatgaggctgtacagcacctgcctgtaccacccaacgccccagtgctgagcc acatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcac gccgacaactacaccgctactgcctgggcatcagccacatggagcccagctcggcctgatcctgcacgacggcggcac caccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtactgttctgtgtgtacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggcttctcctaccgccggcca gccccagccaccactaagccaaggagatccccctgaacccccggcaccagccccctgttgcggtacgccgctgg accggcggcctggccgagtggtgctgctgtgcctggtgatcttctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggcc gccccgggtggacaag</p>
128	<p>atggtgagcggctggcggctgtcaagaaatcagcggcggaggaggagtggtgaccctgaacaagcccgtggtggg cgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtcggggcagcgtgctgcggtacgacga ttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctg ggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacgg cttcttgagaaccccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgca gcccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacga ccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtagggcagctgttcaaggcgacctgaacccaagccccagggg ccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccccttcacctgcgggccccatccagcggatctacggcgtgc ggtacaccgaaacctggagcttctgccagcctgacctgcaccggcgacgccgtcccgccatccagcacatctgcctga agcacaccacctgcttccaggacgtggtggtgactgcgcccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagat cagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctg gagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtagctggcgtgtacatctg gaacatgcggggcagcagcggcaccagcacctacgccaccttctggtgacctggaagggcgacgagaagaccggaa ccccacccccgctgacccccagccccggggcggcgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgg gcgacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtactg gcccacgacccacctgccagccatgaggctgtacagcacctgcctgtaccacccaacgccccagtgctgagcc acatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcac gccgacaactacaccgctactgcctgggcatcagccacatggagcccagctcggcctgatcctgcacgacggcggcac caccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtactgttctgtgtgtacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggcttctcctaccgccggcca gccccagccaccactaagccaaggagatccccctgaacccccggcaccagccccctgatccggtacgccgctgg accggcggcctggccgagtggtgctgtgtgctggtgatcttctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggcc gccccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcggcggcctgccctggacgacttcgaggacagcgag agcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcgggaagccacggcggcagctttacaccgtgtacatcgaca agaccggg</p>

Пример 3. Экспрессия несекретируемых иммуногенов VZV с различными элементами IRES *in vitro*

В данном примере продемонстрирована экспрессия трансмембранного иммуногена gE VZV с кольцевой РНК с различными элементами IRES в клетках млекопитающих.

В данном примере создавали набор кольцевой РНК, кодирующей трансмембранный gE VZV, при этом каждый из них характеризовался различными IRES. ДНК-конструкции разрабатывали таким образом, что они содержали IRES, полинуклеотидный груз и спейсерный элемент. Полезная нагрузка, представляющая собой полинуклеотид, предусматривает комбинацию IRES и нуклеотидной последовательности трансмембранного gE VZV, а также нуклеотидной последовательности, кодирующей пептидную метку HiBiT с пептидным линкером G4S, как представлено в таблице 5.

Таблица 5

IRES	Последовательность нуклеиновой кислоты IRES	Последовательность нуклеиновой кислоты Tm gE VZV
Модифицированный CVB3	ТТААААСАСССТГТGGGTTGATCCCAC ССАСАGGCCCATTTGGGCGCTAGCACTC TGGTATCACGGTACSTTTGTGCGCCTGT ТТТАТАССССССТСССССААСТGТААСТТ АГААGТААСАСАСАССGATCAACAGTC АGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGAT САAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGT АТСААТАGACTGCTCACGCGGTTGAAG GAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAАСТ АСТTCGAAAACCTAGТААСАССGТGG АAGTTGCAGAGTGTTCGCTCAGCACT АСССCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGT САССGСАТТССССАСGGGCGACCGTGG CGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCAT GGGGAAACCCATGGGACGCTCTAATAC АGАСАТGGTGCGAAGAGTCTATTGAGC TAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATG CGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACA	ATGGGGACAGTTAATAAACCTGTGGT GGGGGTATTGATGGGGTTCGGAATTA TCACGGGAACGTTGCGTATAACGAAT CCGGTCAGAGCATCCGTCTTGCGATA CGATGATTTTCACATCGATGAAGACA ААСТGGATACAAACTCCGTATATGAG CCTTACTACCATTCAGATCATGCGGA GTCTTCATGGGTAAATCGGGGAGAGT СТTCGCGAAAAGCGTACGATCATAAC TCACCTTATATATGGCCACGTAATGAT TATGATGGATTTTTAGAGAACGCACA CGAACACCATGGGGTGTATAATCAGG GCCGTGGTATCGATAGCGGGGAACGG ТТААТGСААСССАСАСАААТGTCTGC АСAGGAGGATCTTGGGGACGATACGG GCATCCACGTTATCCCTACGTТАААСG GCGATGACAGACATAAAATTGТАААТ GTGGACCAACGTCAATACGGTGACGT

CCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGT
AACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGAC
TACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATT
CCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATT
GAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGG
ATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCT
ATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATAC
CACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACAT
TACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGC
AAC (SEQ ID NO: 113)

GTTTAAAGGAGATCTTAATCCAAAAC
CCCAAGGCCAAAGACTCATTGAGGTG
TCAGTGGAAGAAAATCACCCGTTTAC
TTTACGCGCACCGATTACAGCGGATTTA
TGGAGTCCGGTACACCGAGACTTGGA
GCTTTTTGCCGTCATTAACCTGTACGG
GAGACGCAGCGCCCGCCATCCAGCAT
ATATGTTTTAAAACATAACAACATGCTTT
CAAGACGTGGTGGTGGATGTGGATTG
CGCGGAAAATACTAAAGAGGATCAGT
TGGCCGAAATCAGTTACCGTTTTCAA
GGTAAGAAGGAAGCGGACCAACCGT
GGATTGTTGTAAACACGAGCACACTG
TTTGATGAACTCGAATTAGACCCCCC
GAGATTGAACCGGGTGTCTTGAAAGT
ACTTCGGACAGAAAAACAATACTTGG
GTGTGTACATTTGGAACATGCGCGGC
TCCGATGGTACGTCTACCTACGCCAC
GTTTTTGGTCACCTGGAAAGGGGATG
AAAAACAAGAAACCCTACGCCCGCA
GTAACCTCTCAACCAAGAGGGGCTGA
GTTTCATATGTGGAATTACCACTCGCA
TGTATTTTCAGTTGGTGATACGTTTAG
CTTGGCAATGCATCTTCAGTATAAGAT
ACATGAAGCGCCATTTGATTTGCTGTT
AGAGTGGTTGTATGTCCCATCGATCC
TACATGTCAACCAATGCGGTTATATTC
TACGTGTTTGTATCATCCCAACGCACC
CCAATGCCTCTCTCATATGAATTCCGG
TTGTACATTTACCTCGCCACATTTAGC
CCAGCGTGTTGCAAGCACAGTGTATC
AAAATTGTGAACATGCAGATAACTAC
ACCGCATATTGTCTGGGAATATCTCAT
ATGGAGCCTAGCTTTGGTCTAATCTTA

		<p>CACGACGGGGGCACCACGTTAAAGTT TG TAGATA CACCCGAGAGTTTGTCCG GATTATACGTTTTTTGTGGTGTATTTA ACGGGCATGTTGAAGCCGTAGCATA ACTGTTGTATCCACAGTAGATCATTTT GTAAACGCAATTGAGGAGCGTGGATT TCCGCCAACGGCCGGTCAGCCACCGG CGACTACTAAACCCAAGGAAATTACC CCCGTAAACCCCGGAACGTCACCACT TCTACGATATGCCGCATGGACCGGAG GGCTTGCAGCAGTAGTACTTTTATGTC TCGTAATATTTTAAATCTGTACGGCTA AACGAATGAGGGTTAAAGCCGCCAGG GTAGACAAGTGA (SEQ ID NO: 121)</p>
EMCV	<p>ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAT AAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTT ATTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGC AATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCT GTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTC TTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAG GTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAG TTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAAC AACGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCA GCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTG CCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATA AGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACC CCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTT GTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCA AGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT GCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGA TCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCT TTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAA ACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGA</p>	<p>SEQ ID NO: 121</p>

	CGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGA TAATA (SEQ ID NO: 114)	
EV71	TTAAAACAGCTGTGGGTTGTCACCCAC CCACAGGGTCCACTGGGCGCTAGTACA CTGGTATCTCGGTACCTTTGTACGCCTG TTTTATACCCCTCCCTGATTTGCAACT TAGAAGCAACGCAAACCAGATCAATAG TAGGTGTGACATAACCAGTCGCATCTTG ATCAAGCACTTCTGTATCCCCGGACCG AGTATCAATAGACTGTGCACACGGTTG AAGGAGAAAACGTCCGTTACCCGGCTA ACTACTTCGAGAAGCCTAGTAACGCCA TTGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCA CTCCCCCGTGTAGATCAGGTCGATGA GTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGT GGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCT ATGGGGTAACCCATAGGACGCTCTAAT ACGGACATGGCGTGAAGAGTCTATTGA GCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAA TGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACA TACCCTTAATCCAAAGGGCAGTGTGTC GTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCG ACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTT ATTCTTGTATTGGCTGCTTATGGTGACA ATTAAAGAATTGTTACCATATAGCTATT GGATTGGCCATCCAGTGTCAAACAGAG CTATTGTATATCTCTTTGTTGGATTAC ACCTCTCACTCTTGAAACGTTACACACC CTCAATTACATTATACTGCTGAACACGA AGCGGCCACC (SEQ D NO: 115)	SEQ ID NO: 121
HRV-2 (ринови рус	TTAAAACAGCTGTGGGTTGTCACCCAC CACTCCACCCATGCGGTGTTGTA CTCTG TTATTACGGTAACTTTGTACGCCAGTTT	SEQ ID NO: 121

<p>человек а типа 89 (HRV89)</p>	<p>TTCCCACCCTTCCCCATAATGTAACCTTA GAAGTTTGTACAATATGACCAATAGGT GACAATCATCCAGACTGTCAAAGGTCA AGCACTTCTGTTTCCCCGGTCAATGAGG) ATATGCTTTACCCAAGGCAAAAACCTT AGAGATCGTTATCCCCACACTGCCTAC ACAGAGCCCAGTACCATTTTTGATATA ATTGGGTTGGTCGCTCCCTGCAAACCCA GCAGTAGACCTGGCAGATGAGGCTGGA CATTCCCCACTGGCGACAGTGGTCCAG CCTGCGTGGCTGCCTGCTCACCTTCTT GGGTGAGAAGCCTAATTATTGACAAGG TGTAAGAGCCGCGTGTGCTCAGTGTG CTTCTCCGGCCCCTGAATGTGGCTAAC CTTAACCCTGCAGCCGTTGCCATAATC CAATGGGTTTGCGGTCGTAATGCGTAA GTGCGGGATGGGACCAACTACTTTGGG TGTCGCGTGTTCCTGTTTTTCTTTTGATT GCATTTTATGGTGACAATTTATAGTGTA TAGATTGTCATC (SEQ ID NO: 116)</p>	
<p>AEV</p>	<p>TTTGAAGAGGGCCTCCGGAGTGTCCGG AGGCTCTCTTTCGACCCAACCCATACTG GGGGGTGTGTGGGACCGTACCTGGAGT GCACGGTATATATGCATTCCCGCATGG CAAGGGCGTGCTACCTTGCCCCTTGAC GCATGGTATGCGTCATCATTGCTTGG TTAAGCCCCATAGAAACGAGGCGTCAC GTGCCGAAAATCCCTTTGCGTTTCACAG AACCATCCTAACCATGGGTGTAGTATG GGAATCGTGTATGGGGATGATTAGGAT CTCTCGTAGAGGGATAGGTGTGCCATT CAAATCCAGGGAGTACTCTGGCTCTGA CATTGGGACATTTGATGTAACCGGACC TGTTTCAGTATCCGGGTTGTCCTGTATT</p>	<p>SEQ ID NO: 121</p>

	<p>GTTACGGTGTATCCGTCTTGGCACACTG AAAGGGTATTTTTGGGTAATCCTTTCCT ACTGCCTGATAGGGTGGCGTGCCCGGC CACGAGAGATTAAGGGTAGCAATTTAA ACGCCACC (SEQ ID NO: 122)</p>	
<p>Айчиви рус</p>	<p>TTTGAAAAGGGGGTGGGGGGGCCTCGG CCCCCTCACCTCTTTTCCGGTGGTCTG GTCCCGGACCACCGTACTCCATTCAGC TTCTTCGGAACCTGTTCGGAGGAATTAA ACGGGCACCCATACTCCCCCACCCCC CTTTTGTAACATAAGTATGTGTGCTCGTG ATCTTGACTCCCACGGAACGGACCGAT CCGTTGGTGAACAAACAGCTAGGTCCA CATCCTCCCTTCCCCTGGGAGGGCCCCC GCCCTCCCACATCCTCCCCCAGCCTGA CGTATCACAGGCTGTGTGAAGCCCCCG CGAAAGCTGCTCACGTGGCAATTGTGG GTCCCCCTTCATCAAGACACCAGGTCT TTCCTCCTTAAGGCTAGCCCCGGCGTGT GAATTCACGTTGGGCAACTAGTGGTGT CACTGTGCGCTCCCAATCTCGGCCGCG GAGTGCTGTTCCCAAGCCAAACCCCT GGCCCTTCACTATGTGCCTGGCAAGCAT ATCTGAGAAGGTGTTCCGCTGTGGCTG CCAACCTGGTGACAGGTGCCCCAGTGT GCGTAAACCTTCTTCCGTCTCCGGACGGT AGTGATTGGTTAAGATTTGGTGTAAGG TTCATGTGCCAACGCCCTGTGCGGGAT GAAACCTCTACTGCCCTAGGAATGCCA GGCAGGTACCCACCTCCGGGTGGGAT CTGAGCCTGGGCTAATTGTCTACGGGT AGTTTCATTTCCAATCCTTTTATGTCGG AGTCGCCACC (SEQ ID NO: 117)</p>	<p>SEQ ID NO: 121</p>

Крохив ирус В	<p>GTATAAGAGACAGGTGTTTGCCTTGTCT TCGGACTGGCATCTTGGGACCAACCCC CCTTTTCCCAGCCATGGGTAAATGGC AATAAAGGACGTAACAACCTTGTAAACC ATTAAGCTTTGTAATTTTGTAAACCTA AGCTTTGTGCACATAATGTAACCATCA AGCTTGTTAGTCCCAGCAGGAGGTTTG CATGCTTGTAGCCGAAATGGGGCTCGA CCCCCATAGTAGGATACTTGATTTTGC ATTCCATTGTGGACCTGCAAACCTCTACA CATAGAGGCTTTGTCTTGCATCTAAACA CCTGAGTACAGTGTGTACCTAGACCCT ATAGTACGGGAGGACCGTTTGTTCCTC AATAACCCTACATAATAGGCTAGGTGG GCATGCCCAATTTGCAAGATCCCAGAC TGGGGGTTCGGTCTGGGCAGGGTTAGAT CCCTGTTAGCTACTGCCTGATAGGGTGG TGCTCAACCATGTGTAGTTTAAATTGAG CTGTTTCATATACCGCCACC (SEQ ID NO: 118)</p>	SEQ ID NO: 121
Эховир ус 11	<p>TTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCCATC CACAGGGCCCACTGGGCGCCAGCACTC TGGTATTGCGGTACCTTAGTGCGCCTGT TTTATATACCCGTCCCCAAACGTAACCT TAGACGCATGTCAACGAAGACCAATAG TAAGCGCAGCACACCAGCTGTGTTCCG GTCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACCG AGTATCAATAAGCTACTCACGTGGCTG AAGGAGAAAACGTTTCGTTACCCGACCA ATTACTTCAAGAAACCTAGTAACACCA TGAAGGTTGCGCAGTGTTTCGCTCCGCA CAACCCAGTGTAGATCAGGTCGATGA GTCACCGCATTCCCCACGGGTGACCGT GGCGGTGGCTGCGCTGGCGGCCTGCC</p>	SEQ ID NO: 121

	ATGGGGAAACCCATGGGACGCTTCAAT ACTGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGA GCTAATTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAA TGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCAGA TACCCACACACCAGTGGGCAGTCTGTC GTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCG ACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTCTTT ATCCTTATACTGGCTGCTTATGGTGACA ATTGAGAGATTGTTACCATATAGCTATT GGATTGGCCATCCGGTGACAAATAGAG CAATTGTGTATTTGTTTGGTTTCGT GCCATTAATTACAAGGTTCTAAACAC CCTTAATCTTATTATAGCATTCAACACA ACAAAGCCACC (SEQ ID NO: 119)	
Модифицированный CVB3	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 121

Кольцевые РНК получали, как описано в примере 1.

Кольцевой РНК (1,0 пикомоля) трансфицировали клетки НЕК293Т (100000 клеток на лунку в 96-луночном планшете в бессывороточной среде) с применением Lipofectamine MessengerMax (Invitrogen, LMRNA015) в соответствии с инструкциями производителя. MessengerMax отдельно использовали в качестве контроля. Клетки собирали через 24 часа после трансфекции и измеряли экспрессию gE, как описано выше.

На фиг. 8 показано, что иммуногены gE VZV были выявлены на клеточной поверхности клеток НЕК293Т из каждой из кольцевых РНК, кодирующих трансмембранный gE, за исключением кольцевой РНК, содержащей IRES AEV.

Пример 4. Экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевой РНК в мышинной модели

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевых РНК в мышинной модели.

Кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали IRES и нуклеотидную последовательность, кодирующую секретлируемый иммуноген VZV или несекретлируемый иммуноген VZV (например, трансмембранный иммуноген VZV).

В данном примере ДНК-конструкции разрабатывали таким образом, что они содержали IRES, полинуклеотидный груз и спейсерный элемент. Конструкции

разрабатывали таким образом, чтобы они содержали polyA50 в качестве спейсерного элемента и комбинацию модифицированного сайта внутренней посадки рибосомы CVB3 (IRES) (SEQ ID NO: 48) и ORF в качестве полинуклеотидного груза. В случае ДНК-конструкции, кодирующей секретлируемый иммуноген VZV, ORF конструировали таким образом, чтобы она содержала сигнальную последовательность секреции, нуклеотидную последовательность gE VZV и нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT с пептидным линкером G4S (SEQ ID NO: 113). В случае конструкции ДНК, кодирующей несекретлируемый иммуноген VZV, ORF конструировали таким образом, чтобы она содержала нуклеотидную последовательность трансмембранного gE VZV и нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT (SEQ ID NO: 123) с пептидным линкером G4S (SEQ ID NO: 112).

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с применением РНК-полимеразы T7 с ДНК-матриц в присутствии 7,5 mM NTP. ДНК-матрицу удаляли путем обработки ДНКазой в течение 20 минут. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050). Самосплайсинг происходил во время транскрипции; дополнительной реакции не требовалось. Кольцевую РНК, кодирующую gE VZV, очищали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной (PAGE с мочевиной) или посредством колоночной хроматографии с обращенной фазой.

Очищенную кольцевую РНК составляли с липидной наночастицей с получением препарата на основе кольцевой РНК. Вкратце, кольцевую РНК разбавляли 25 mM ацетатным буфером с pH = 4 (профильтрованным через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм) до концентрации 0,2 мкг/мкл. Липидные наночастицы (LNP) составляли посредством предварительного растворения ионизируемого липида (например, ALC0315), холестерина, DSPC и DMG-PEG2000 в этаноле (профильтрованном через стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,2 мкм) при молярном соотношении 50/38,5/10/1,5 мол. %. Конечное весовое соотношение ионизируемый липид/РНК составляло 6/1 вес/вес. Растворы липида и РНК смешивали в чипе-микромиксере с применением микрофлюидной системы при соотношении скоростей потока буфер/этанол 3/1 и общей скорости потока 1 мл/мин. Затем LNP подвергали диализу в PBS с pH = 7,4 в течение 3 часов с удалением этанола. LNP концентрировали до требуемой концентрации РНК с применением центрифужных фильтров Amicon с отсечкой по 100 кДа, при необходимости.

Три мыши Balb/C на группу (n = 3) получали дозу препарата на основе кольцевой РНК, составляющую либо 10 мкг, либо 50 мкг, путем внутримышечной инъекции в день 0 (праймирующая доза) и день 28 (бустерная доза). Мышам (n = 3) не вводили кольцевую

РНК путем внутримышечной инъекции в день 0 и день 28, но вводили PBS, который использовали в качестве контролей. Мышей ($n = 3$), которым путем внутримышечной инъекции вводили 5 мкг вакцины SHINGRIX в день 0 и день 28, также использовали в качестве контролей.

Через 6 часов, 2 дня и 5 дней после введения праймирующей дозы образцы сыворотки крови собирали у каждой мыши, которой путем инъекции вводили дозы 50 мкг препарата на основе кольцевой РНК, кодирующей секретиремый gE VZV, или PBS. Уровни gE VZV измеряли с использованием метки HiBiT; анализа для выявления биолюминесцентного белка в соответствии с инструкциями производителя (система для внеклеточного выявления HiBiT Nano-Glo®, № по каталогу Promega N420). Данные показаны на **фиг. 9** как среднее значение для трех животных на группу. Концентрацию gE (нг/мл) интерполировали из стандарта HiBiT. Через шесть часов после внутримышечной иммунизации кольцевой РНК, кодирующей секретиремый gE, секретиремый gE был выявлен в сыворотке крови в концентрациях ~200 нг/мл.

Пример 5. Иммуногенность иммуногенов VZV из кольцевой РНК в мышинной модели

В данном примере продемонстрировано, что кольцевые РНК, кодирующие иммуноген VZV, индуцируют иммуногенспецифический ответ у мышей.

Кольцевые РНК разрабатывали, получали и составляли в LNP, как описано в примере 4.

Три мыши Balb/C на группу ($n = 3$) получали дозу препарата на основе кольцевой РНК, составляющую либо 10 мкг, либо 50 мкг, путем внутримышечной инъекции в день 0 (праймирующая доза) и день 28 (бустерная доза). Мышам ($n = 3$) не вводили кольцевую РНК путем внутримышечной инъекции, но вводили PBS, который использовали в качестве контролей. Мышей ($n = 3$), которым путем внутримышечной инъекции вводили 5 мкг вакцины SHINGRIX, также использовали в качестве контролей.

Образцы сыворотки крови выделяли из мышей, которым вводили препараты на основе кольцевой РНК, как описано в примере 4, в дни 14, 35 и 42. Образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия VZV-специфического IgG. Планшеты для ELISA покрывали в течение ночи при 4°C белком gE (белок, изготовленный на заказ в Genscript; 100 нг на лунку) в 100 мкл 1X покрывающего буфера (Biolegend, 421701). Затем планшеты блокировали в течение 1 часа с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% BSA и 0,05% Tween 20). Сыворотку крови последовательно разбавляли 8 раз (4-кратные разбавления от 500 до 8192000), затем добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-буферного солевого раствора с детергентом Tween® (TBS-T)

планшеты инкубировали с антителом к IgG мыши для выявления, конъюгированным с HRP (Abcam, ab97023), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, затем добавляли субстрат тетраметилбензол (TMB) для ELISA (ThermoFisher, 34022). Планшет выдерживали в течение 20 минут, а затем реакцию гасили с применением 0,2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (O. D.) определяли при 450 нм. Титр конечной точки определяли как последнее разбавление со значением оптической плотности, в 4 раза превышающим фоновое значение.

Результаты демонстрируют, что антитела к gE начали продуцироваться в день 14 после инъекции для секретлируемого и трансмембранного gE, и титр продолжал повышаться после введения бустерной дозы (**фиг. 10**).

В день 42 после введения праймирующей дозы мышей умерщвляли, а селезенки собирали и тестировали в отношении ответов Т-клеток на gE VZV посредством анализа ELISpot в соответствии с протоколом производителя (Mabtech, 3321-4HPT-10). Вкратце, селезенки собирали и обрабатывали с получением суспензии отдельных клеток. Спленоциты высевали при 0,5 М клеток на лунку в планшеты для ELISpot IFN- γ . Спленоциты либо не стимулировали, либо стимулировали пептидными пулами gE (JPT, PM-VZV-gE) в концентрации 1 мкг/мл. Клетки культивировали в течение ночи и планшет анализировали на следующий день в соответствии с протоколом производителя. **На фиг. 11** показано, что кольцевая РНК, кодирующая секретлируемый gE (Sec gE), и кольцевая РНК, кодирующая трансмембранный gE (Tm gE), обеспечивали праймирование Т-клеточных ответов после иммунизации дозой 10 мкг.

В день 42 после введения праймирующей дозы мышей умерщвляли и селезенки обрабатывали с получением суспензии отдельных клеток, как описано выше. Спленоциты высевали при 0,5/лунка в 96-луночный планшет с U-образным дном. Спленоциты либо не стимулировали, либо стимулировали пептидными пулами gE (JPT, PM-VZV-gE) в концентрации 1 мкг/мл. Спленоциты культивировали в течение 1 часа с последующим добавлением ингибиторов внутриклеточного белка (ингибиторы транспорта белка GolgiPlugTM и GolgiStopTM (BD, 555028)), а затем культивировали в течение дополнительных 5 часов. Затем спленоциты фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали в соответствии с протоколом производителя (BD, 555028).

На фиг. 12А показано, что кольцевая РНК, кодирующая секретлируемый gE (Sec gE), и кольцевая РНК, кодирующая трансмембранный gE (Tm gE), обеспечивали праймирование CD8 Т-клеток после иммунизации дозой 10 мкг. **На фиг. 12В** показано, что кольцевая РНК, кодирующая секретлируемый gE (Sec gE), и кольцевая РНК, кодирующая трансмембранный gE (Tm gE), обеспечивали праймирование CD4 Т-клеток после

иммунизации дозой 10 мкг. Кольцевые РНК обеспечивали праймирование значительно большего количества CD4 Т-клеток по сравнению с вакциной SHINGRIX.

Эти результаты демонстрируют, что кольцевая РНК, кодирующая секретруемый gE или трансмембранный gE, индуцировала gE-специфические гуморальные и клеточные иммунные ответы у мышей.

Пример 11. Разработка, получение и очистка кольцевой РНК, кодирующей иммуногены VZV

В данном примере описаны разработка, получение и очистка *in vitro* кольцевых РНК, которые кодируют иммуногены VZV (например, иммуноген gE VZV). Кольцевые РНК разрабатывают для включения IRES, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, и по меньшей мере одного спейсерного элемента. Некоторые из кольцевых РНК, кодирующих иммуноген VZV, также кодируют нативную лидерную последовательность или сигнал секреции.

В данном примере кольцевые РНК получают посредством одного из двух иллюстративных способов и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Иллюстративный способ 1. Лигирование с помощью ДНК-шунта

Посредством данного способа получают кольцевую РНК с применением лигирования с помощью шунта. Линейную РНК, обработанную RppH, циркуляризируют с применением ДНК-шунта. Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с использованием РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (New England Biolabs), обрабатывают РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356) следуя инструкциям производителя. В качестве альтернативы или дополнительно РНК транскрибируют при избытке GMP относительно GTP.

Лигирование с помощью шунта выполняют следующим образом: кольцевую РНК получают посредством обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов с применением РНК-лигазы. Для очистки кольцевых РНК смеси для лигирования разделяют посредством PAGE в денатурирующих условиях с использованием 4% геля, и вырезают полосы РНК, соответствующие каждой из кольцевых РНК. Вырезанные из геля фрагменты РНК измельчают и РНК элюируют буфером для элюирования из геля (0,5 М ацетат натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA) в течение одного часа при 37°C. В качестве альтернативы или дополнительно кольцевую РНК очищают посредством колоночной хроматографии. Собирают супернатант и снова элюируют РНК, добавляя к измельченному гелю буфер для элюирования геля, и инкубируют в течение одного часа. Остатки геля удаляют посредством центрифужных

фильтров и осаждают этанолом. Электрофорез в агарозном геле применяют в качестве анализа контроля качества для валидации чистоты и циркуляризации.

Иллюстративный способ 2. Циркуляризация посредством самосплайсирующегося интрона

Посредством данного способа получают кольцевую РНК с применением самосплайсинга. Кольцевую РНК получают *in vitro*. Обеспечивают транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы. Реакционные смеси для транскрипции *in vitro* включали 1 мкг ДНК-матрицы с промотором РНК-полимеразы T7, 10X реакционный буфер для T7, 7,5 mM АТР, 7,5 mM СТР, 7,5 mM GTP, 7,5 mM UTP, 10 mM DTT, 40 ед. ингибитора РНКаз и фермент T7. Транскрипцию выполняют при 37°C в течение 4 ч. Транскрибированную РНК обрабатывают ДНКазой с использованием 1 ед. ДНКазы I при 37°C в течение 15 мин. Для содействия циркуляризации путем самосплайсирования добавляют дополнительное количество GTP до конечной концентрации 2 mM, инкубируют при 55°C в течение 15 мин. Затем РНК очищают на колонке и визуализируют посредством PAGE с мочевиной.

Пример 12. Экспрессия иммуногенов VZV *in vitro*

В данном примере описана экспрессия иммуногенов VZV с кольцевых РНК в клетках млекопитающих. Для измерения экспрессии иммуногенов VZV с конструкций РНК получают и очищают кольцевую РНК, кодирующую иммуноген VZV, в соответствии со способами, описанными в данном документе. Кольцевой РНК (0,1 пикомоля) трансфицируют НЕК293 (10000 клеток на лунку в 96-луночной планшете в бессывороточной среде) с применением MessengerMax (Invitrogen, LMRNA). Клеточный супернатант собирают через 24 часа. Анализ посредством ELISA выполняют следующим образом: планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96 лунок) покрывают антителом для захвата в течение ночи при 4°C в 100 мкл PBS. После трехкратной промывки с использованием TBS-T планшеты блокируют в течение 1 часа с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% FBS и 0,05% Tween 20). Затем в каждую лунку добавляют разведения супернатантов в 100 мкл блокирующего буфера и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с использованием TBS-T планшеты инкубируют с HRP детектирующим антителом в течение 1 часа при комнатной температуре. В каждую лунку добавляют тетраметилбензол (Pierce 34021), позволяют прореагировать в течение 5-15 минут и затем гасят 2 н. серной кислотой. Значение оптической плотности (OD) определяют при 450 нм.

Пример 13. Экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевой РНК в мышинной модели

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевых РНК. Кольцевые РНК конструируют и получают, как описано в примере 11. После очистки кольцевые РНК составляют следующим образом:

А. кольцевую РНК разбавляют с помощью PBS с получением препарата на основе кольцевой РНК ("голой").

В. кольцевую РНК составляют с липидной наночастицей с получением препарата на основе кольцевой РНК (составленной с LNP). Вкратце, кольцевую РНК разбавляют 25 мМ ацетатным буфером с рН = 4. Липидные наночастицы (LNP) составляют посредством предварительного растворения ионизируемого липида (например, ALC0315), холестерина, DSPC и DMG-PEG2000 в этаноле при мольном соотношении 50/38,5/10/1,5 мол. %. Конечное весовое соотношение ионизируемый липид/РНК составляет 8/1 вес/вес. Растворы липидов и РНК смешивают на чипе-микросмесителе с использованием микрофлюидной системы. Затем LNP подвергают диализу в PBS с рН = 7,4 с удалением этанола. Концентрацию кольцевой РНК корректируют с помощью PBS.

С. кольцевую РНК составляют с адьювантом, таким как адьювант Addavax™ (Invivogen), адьювант MF59®, AS01/AS01B, AS03, квасцы, CpG1018 или поли(I:C) с получением препарата на основе кольцевой РНК (составленной с адьювантом). Вкратце, кольцевую РНК смешивают с адьювантом.

В одном подходе препараты на основе кольцевой РНК ("голой", составленной с LNP, составленной с адьювантом) вводят мышам внутрикожно или внутримышечно в день 0, при этом второе внутрикожное или внутримышечное введение осуществляют через 4 недели. Во втором подходе мышам вводят препарат на основе кольцевой РНК, полученный посредством разбавления кольцевой РНК с помощью PBS ("голой"), или препарат на основе кольцевой РНК, полученный посредством составления кольцевой РНК в LNP (составленной с LNP), внутрикожно или внутримышечно в день 0, при этом вторую внутрикожную или внутримышечную инъекцию осуществляют через 4 недели. Для второго подхода адьювант (такой как адьювант Addavax™ (Invivogen), адьювант MF59®, AS01/AS01B, AS03, квасцы, CpG1018 или поли(I:C)) вводят мышам в день 0 (одновременная доставка с препаратом на основе кольцевой РНК) или через 24 часа. В случае обоих подходов контрольную группу мышей обрабатывают средой-носителем и не обрабатывают кольцевой РНК. Можно включить дополнительную контрольную группу, включающую введение кольцевой РНК, но не включающую введение адьюванта.

Образцы крови собирают на протяжении всего исследования для мониторинга титров gE-специфических антител в сыворотке крови посредством ELISA. Кровь (35 мкл) собирают из хвостовой вены каждой мыши в сухие пробирки через 1 день, 2 дня, 3 дня и 7 дней, а затем один раз в неделю в течение 9 недель после введения дозы. Сыворотку крови собирают посредством центрифугирования в течение 25 минут при 1300 g при 4°C и уровни иммуногена VZV измеряют посредством ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

В конечной временной точке мышей умерщвляют. Селезенку и лимфатические узлы собирают и тестируют в отношении специфичности иммуногена gE посредством проточной цитометрии и ELISpot. Собранную сыворотку крови тестируют в анализе ингибирования инфекции для определения нейтрализующей способности сывороточных антител.

Пример 14. Экспрессия иммуногенов VZV с кольцевой РНК, доставляемой с адьювантом, в мышинной модели *in vivo*

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевых РНК с иммунным усилением посредством доставки вместе с адьювантом, таким как адьювант AddaSO3™ (Invivogen). Кольцевые РНК конструируют и получают, как описано в примере 11. Кольцевые РНК составляют посредством смешивания с равным объемом раствора адьюванта AddaSO3™. Препараты на основе кольцевой РНК/адьювантов вводят мышам внутримышечно в день 0, при этом второе введение осуществляют через 4 недели. Контрольную группу мышей обрабатывают средой-носителем и не обрабатывают кольцевой РНК. Можно включить дополнительную контрольную группу, включающую введение кольцевой РНК, но не включающую введение адьюванта. Образцы крови собирают на протяжении всего исследования для мониторинга титров gE-специфических антител в сыворотке крови посредством ELISA. Кровь (35 мкл) собирают из хвостовой вены каждой мыши в сухие пробирки через 1 день, 2 дня, 3 дня и 7 дней, а затем один раз в неделю в течение 9 недель после введения дозы. Сыворотку крови собирают посредством центрифугирования в течение 25 минут при 1300 g при 4°C и уровни иммуногена VZV измеряют посредством ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

В конечной временной точке мышей умерщвляют. Селезенку и лимфатические узлы собирают и тестируют в отношении Т-клеток, специфических в отношении иммуногена gE, посредством проточной цитометрии и ELISpot. Собранную сыворотку крови тестируют в анализе ингибирования инфекции для определения нейтрализующей способности сывороточных антител.

Пример 15. Экспрессия иммуногенов VZV с кольцевой РНК, доставляемой с адьювантом, в мышинной модели *in vivo*

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевых РНК с иммунным усилением посредством доставки вместе с адьювантом, таким как адьювант AddaSO3™ (Invivogen). Кольцевые РНК конструируют и получают, как описано в примере 11. Кольцевые РНК составляют посредством смешивания с равным объемом раствора адьюванта AddaSO3™. Препараты на основе кольцевой РНК/адьювантов вводят мышам внутривенно в день 0, при этом второе введение осуществляют через 4 недели. Контрольную группу мышей обрабатывают средой-носителем и не обрабатывают кольцевой РНК. Можно включить дополнительную контрольную группу, включающую введение кольцевой РНК, но не включающую введение адьюванта. Образцы крови собирают на протяжении всего исследования для мониторинга титров gE-специфических антител в сыворотке крови посредством ELISA. Кровь (35 мкл) собирают из хвостовой вены каждой мыши в сухие пробирки через 1 день, 2 дня, 3 дня и 7 дней, а затем один раз в неделю в течение 9 недель после введения дозы. Сыворотку крови собирают посредством центрифугирования в течение 25 минут при 1300 g при 4°C и уровни иммуногена VZV измеряют посредством ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

В конечной временной точке мышей умерщвляют. Селезенку и лимфатические узлы собирают и тестируют в отношении Т-клеток, специфических в отношении иммуногена gE, посредством проточной цитометрии и ELISpot. Собранную сыворотку крови тестируют в анализе ингибирования инфекции для определения нейтрализующей способности сывороточных антител.

Другие варианты осуществления

Различные модификации и варианты описанных композиций, способов и путей применения по настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от объема и сути настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное настоящее изобретение не должно неправомерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Более того, предполагается, что различные модификации описанных режимов для осуществления настоящего изобретения, которые очевидны специалистам в данной области, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Все публикации, патенты и патентные заявки включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждая

отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и отдельно указана как включенная посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[1] Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный иммуноген вируса ветряной оспы (VZV).

[2] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [1], где полипептидный иммуноген VZV представляет собой гликопротеин VZV или его иммуногенный фрагмент.

[3] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [2], где гликопротеин VZV выбран из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV или их иммуногенного фрагмента.

[4] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [3], где гликопротеин VZV представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент.

[5] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где гликопротеин VZV представляет собой мутационный вариант gE VZV или его иммуногенный фрагмент, содержащий не более 10 аминокислотных замен, делеций или вставок относительно gE VZV дикого типа.

[6] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует якорный домен (домен для удерживания в ER).

[7] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует карбоксиконцевой хвостовой домен.

[8] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-524, 1-546, 1-561, 1-573 или 1-623 gE VZV.

[9] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.

[10] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-573 gE VZV и мутацию Y569A.

[11] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-623 gE VZV и мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.

[12] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся

по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68.

[13] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [12], где полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68.

[14] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, а полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70.

[15] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [14], где полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, а полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70.

[16] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83.

[17] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [16], где полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83.

[18] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [1], где полипептидный иммуноген VZV представляет собой немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент.

[19] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [18], где немедленно-ранний белок VZV представляет собой полипептид IE63.

[20] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [19], где полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 84.

[21] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [20], где полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 84.

[22] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [18], где полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 85.

[23] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [22], где полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 85.

[24] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[23], где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием GC, составляющим по меньшей мере 51%.

[25] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [24], где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием GC от 51% до 60%.

[26] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[25], где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием уридина, составляющим более 20%.

[27] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [26], где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием уридина от 20% до 28%.

[28] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[27], где полипептидный иммуноген VZV дополнительно содержит последовательность, кодирующую домен мультимеризации.

[29] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [28], где домен мультимеризации выбран из домена сборки T4, домена ферритина, β -кольцеобразного пептида, пептида AaLS или домена люмазинсинтазы.

[30] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [28] или [29], где домен мультимеризации находится на N-конце полипептидного иммуногена VZV.

[31] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [28] или [29], где домен мультимеризации находится на C-конце полипептидного иммуногена VZV.

[32] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[31], где открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, функционально связана с IRES.

[33] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[32], где открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, кодирует второй полипептид.

[34] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [33], где полипептидный иммуноген VZV и второй полипептид разделены полипептидным линкером, саморасщепляющимся пептидом 2A, сайтом расщепления протеазой или саморасщепляющимся пептидом 2A в тандеме с сайтом расщепления протеазой.

[35] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [34], где сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления фурином.

[36] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[32], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит вторую открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептид, функционально связанный со вторым IRES.

[37] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [33]-[36], где второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген.

[38] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [37], где второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген VZV.

[39] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [38], где второй полипептид представляет собой гликопротеин VZV, выбранный из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV, немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент.

[40] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [39], где второй полипептид представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент.

[41] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [33], где второй полипептид представляет собой IE63 VZV или его иммуногенный фрагмент.

[42] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [33]-[36], где второй полипептид представляет собой полипептидный адъювант.

[43] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [42], где адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

[44] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[43], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит некодирующую

последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[45] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [44], где стимулятор врожденной иммунной системы выбран из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

[46] Иммуногенная композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[45] и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[47] Иммуногенная композиция согласно варианту осуществления [46], где композиция дополнительно содержит второй кольцевой полирибонуклеотид.

[48] Иммуногенная композиция согласно варианту осуществления [47], где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептидный иммуноген.

[49] Иммуногенная композиция согласно варианту осуществления [47], где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный адъювант.

[50] Иммуногенная композиция согласно варианту осуществления [47], где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[51] Способ индуцирования у субъекта иммунного ответа против VZV, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции согласно любому из вариантов осуществления [1]-[50].

[52] Способ предупреждения у субъекта инфекции VZV, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции согласно любому из вариантов осуществления [1]-[50].

[53] Способ лечения субъекта, у которого имеется инфекция VZV или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции согласно любому из вариантов осуществления [1]-[50].

[54] Способ согласно варианту осуществления [53], где у субъекта ранее была диагностирована инфекция VZV или нарушение, ассоциированное с инфекцией VZV.

[55] Способ согласно варианту осуществления [53] или [54], где инфекция VZV является бессимптомной, или инфекция VZV является неактивной.

[56] Способ согласно любому из вариантов осуществления [53]-[55], где у субъекта был диагностирован опоясывающий лишай.

[57] Способ согласно варианту осуществления [56], где введение кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции обеспечивает снижение частоты или тяжести симптомов, ассоциированных с опоясывающим лишаем.

[58] Способ согласно любому из вариантов осуществления [51]-[57], где субъект представляет собой субъекта-человека.

[59] Способ по любому из вариантов осуществления [51]-[58], дополнительно включающий введение субъекту адьюванта.

[60] Способ согласно любому из вариантов осуществления [51]-[59], дополнительно включающий введение субъекту полипептидного иммуногена VZV.

ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Предпосылки изобретения

Вирус ветряной оспы (VZV) представляет собой вирус, который принадлежит к семейству α -герпесвирусов. VZV присутствует повсеместно и является высокоинфекционным. Первичная инфекция приводит к острой ветряной оспе, также называемой "ветрянкой". После первоначальной инфекции VZV устанавливает пожизненную латентность в черепных нервах и ганглиях дорсальных корешков и может реактивироваться спустя годы или десятилетия в виде опоясывающего герпеса (HZ), называемого "опоясывающим лишаем". VZV также может вызывать ряд неврологических состояний, варьирующихся от асептического менингита до энцефалита. Другие серьезные осложнения инфекции VZV включают постгерпетическую невралгию, менингит Молларе, множественный опоясывающий лишай, тромбоцитопению, миокардит, артрит и воспаление артерий в головном мозге, приводящее к инсульту, миелиту, офтальмогерпесу и опоясывающему лишаю без сыпи. Существует потребность в вакцинах и терапевтических средствах, которые активны против вируса ветряной оспы.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлены композиции, фармацевтические препараты и способы, относящиеся к кольцевым полирибонуклеотидам, кодирующим один или несколько иммуногенов VZV. В настоящем изобретении также представлены способы применения кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих один или несколько иммуногенов VZV. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут индуцировать иммунный ответ у субъекта при введении. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта (например, ветрянки или опоясывающего лишая).

В первом аспекте в настоящем изобретении представлен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный иммуноген вируса ветряной оспы (VZV).

В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой гликопротеин VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления гликопротеин VZV выбран из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV или их иммуногенного фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления гликопротеин VZV представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления гликопротеин VZV представляет собой мутационный вариант gE VZV или его иммуногенный фрагмент, содержащий не более 10 аминокислотных замен, делеций или вставок относительно gE VZV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует якорный домен (домен для удерживания в ER). В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует карбоксиконцевой хвостовой домен. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-524, 1-546, 1-561, 1-573 или 1-623 gE VZV. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-573 gE VZV и мутацию Y569A. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-623 gE VZV и мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% аминокислот из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой вариант аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, точечных мутаций, делеций или вставок).

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, и при этом полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность,

характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, и при этом полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% аминокислот из аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой вариант аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, точечных мутаций, делеций или вставок).

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления немедленно-ранний белок VZV представляет собой полипептид IE63. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется

последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, представляет собой фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 39-47. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, представляет собой фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% любой из SEQ ID NO: 39-47.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием GC, составляющим по меньшей мере 51% (например, по меньшей мере 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% или 60%). В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет не более 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, или 59%, или 60%. В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет от 51% до 60%, от 52% до 60%, от 53% до 60%, от 54% до 60%, от 55% до 60%, от 52% до 58%, от 53% до 58%. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием GC от 51% до 60%.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием уридина, составляющим более 20%. В некоторых вариантах осуществления содержание уридина в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет более 10% (например, более 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% или 25%). В некоторых вариантах осуществления содержание уридина в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет не более 30% (например, не более 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21% или 20%). В некоторых вариантах осуществления содержание уридина в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет от 20% до 28%, от 21% до 26%, от 10% до 24%, от 15% до 24%, от 20% до 24%, от 21% до 24%, от 22% до 24%, от

23% до 24%, от 10% до 23%, от 15% до 23%, от 20% до 23%, от 21% до 23% или от 22% до 23%. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием уридина, составляющим от 20% до 28%.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV дополнительно содержит последовательность, кодирующую домен мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации выбран из домена сборки T4, домена ферритина, β -кольцеобразного пептида, пептида AaLS или домена люмазинсинтазы. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации находится на N-конце полипептидного иммуногена VZV. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации находится на C-конце полипептидного иммуногена VZV.

В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, функционально связана с IRES.

В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, кодирует второй полипептид. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV и второй полипептид разделены полипептидным линкером, саморасщепляющимся пептидом 2A, сайтом расщепления протеазой или саморасщепляющимся пептидом 2A в тандеме с сайтом расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления фурином. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит вторую открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептид, функционально связанный со вторым IRES.

В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген VZV. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой гликопротеин VZV, выбранный из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV, немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой IE63 VZV или его иммуногенный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой полипептидный адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет

собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления стимулятор врожденной иммунной системы выбран из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания кодирует конкатемерный иммуноген VZV. В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания содержит 2-100 иммуногенов VZV, соединенных непосредственно друг с другом или перемежающихся линкерами. В других вариантах осуществления иммуноген представляет собой конкатемерный пептидный иммуноген, состоящий из множества пептидных эпитопов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует 2-10 иммуногенов VZV. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 иммуногенов VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуногены VZV разделены полипептидным линкером, саморасщепляющимся пептидом 2A, сайтом расщепления протеазой или саморасщепляющимся пептидом 2A в тандеме с сайтом расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления фурином.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлена иммуногенная композиция, содержащая любой кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит второй кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептидный иммуноген. В некоторых вариантах осуществления второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный адьювант. В некоторых вариантах осуществления второй кольцевой полирибонуклеотид содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ индуцирования у субъекта иммунного ответа против VZV, при этом способ включает введение субъекту

кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ предупреждения у субъекта инфекции VZV, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения субъекта, у которого имеется инфекция VZV или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта ранее была диагностирована инфекция VZV или нарушение, ассоциированное с инфекцией VZV. В некоторых вариантах осуществления инфекция VZV является бессимптомной, или инфекция VZV является неактивной. В некоторых вариантах осуществления у субъекта был диагностирован опоясывающий лишай. В некоторых вариантах осуществления введение кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции обеспечивает снижение частоты или тяжести симптомов, ассоциированных с опоясывающим лишаем. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта-человека.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту адъюванта. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту полипептидного иммуногена VZV.

Определения

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

Используемый в данном документе термин "адаптивный иммунный ответ" означает либо гуморальный, либо клеточноопосредованный иммунный ответ. Для целей настоящего изобретения "гуморальный иммунный ответ" относится к иммунному ответу, опосредованному молекулами антител, тогда как "клеточный иммунный ответ" представляет собой ответ, опосредованный Т-лимфоцитами и/или другими лейкоцитами.

Используемый в данном документе термин "адъювант" относится к композиции (например, на основе соединения, полипептида, нуклеиновой кислоты или липида), которая повышает иммунный ответ, например, повышает специфический иммунный ответ на иммуноген. Повышение иммунного ответа предусматривает усиление или расширение

специфичности любого из иммунного ответа с образованием антител и клеточного иммунного ответа или как первого, так и второго.

Используемый в данном документе термин "носитель" означает соединение, композицию, реагент или молекулу, которые облегчают транспортировку или доставку композиции (например, полирибонуклеотида) в организм субъекта, ткань или клетку. Неограничивающие примеры носителей включают углеводные носители (например, ангидрид-модифицированный фитогликоген или материал типа гликогена), наночастицы (например, наночастицу, которая инкапсулирует кольцевой полирибонуклеотид или ковалентно соединена, связывается с кольцевым полирибонуклеотидом), липосомы, фузосомы, дифференцированные *ex vivo* ретикулоциты, экзосомы, белковые носители (например, белок, ковалентно связанный с полирибонуклеотидом) или катионные носители (например, катионный липополимер или реагент для трансфекции).

Используемые в данном документе термины "circRNA", "кольцевой полирибонуклеотид", "кольцевая РНК" и "молекула кольцевого полирибонуклеотида" применяются взаимозаменяемо и означают молекулу полирибонуклеотида, которая характеризуется структурой без свободных концов (т. е. без свободных 3'- и/или 5'-концов), например, молекулу полирибонуклеотида, которая образует кольцевую или замкнутую структуру посредством ковалентных (например, ковалентно замкнутых) или нековалентных связей. Кольцевой полирибонуклеотид может представлять собой ковалентно замкнутый полирибонуклеотид.

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

Термин "разбавитель" означает среду-носитель, содержащую неактивный растворитель, в которой композиция, описанная в данном документе (например, композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид), может быть разбавлена или растворена. Разбавитель может представлять собой средство для сольubilизации РНК, буфер, изотоническое средство или их смесь. Разбавитель может представлять собой жидкий разбавитель или твердый разбавитель. Неограничивающие примеры жидких разбавителей включают воду или другие растворители, сольubilизирующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, масло из семян хлопчатника, арахисовое масло, кукурузное масло, масло из зародышей пшеницы, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и

сорбитановые сложные эфиры жирных кислот и 1,3-бутандиол. Неограничивающие примеры твердых разбавителей включают карбонат кальция, карбонат натрия, фосфат кальция, дикальцийфосфат, сульфат кальция, гидрофосфат кальция, фосфат натрия, лактозу, сахарозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, сорбит, инозит, хлорид натрия, сухой крахмал, кукурузный крахмал или сахарную пудру.

Каждый из используемых в данном документе терминов "заболевание", "нарушение" и "состояние" относится к субоптимальному состоянию здоровья, например, состоянию, которое, как правило, диагностируется или лечится или диагностировалось бы или лечилось бы медицинским работником.

Используемый в данном документе термин "эпитоп" относится к части или всему иммуногену, который распознается антителом или Т-клеточным рецептором, на который нацелены антитело или Т-клеточный рецептор или который связывается с антителом или Т-клеточным рецептором. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, например, непрерывную последовательность нуклеиновых кислот или аминокислот. Эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, например, эпитоп, который содержит аминокислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации белка. Конформационный эпитоп может содержать несмежные аминокислоты из первичной аминокислотной последовательности. В качестве другого примера конформационный эпитоп включает нуклеиновые кислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации иммуногенной последовательности на основе ее вторичной или третичной структуры.

Используемый в данном документе термин "экспрессионная последовательность" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует продукт, например, пептид или полипептид (например, иммуноген), или регуляторную нуклеиновую кислоту. Иллюстративная экспрессионная последовательность, которая кодирует пептид или полипептид, может содержать множество нуклеотидных триад, каждая из которых может кодировать аминокислоту и называется "кодоном".

Используемый в данном документе термин "фрагмент" в отношении полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты, например, полипептидного иммуногена или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидный иммуноген, относится к непрерывной, менее чем целой части последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты. Фрагмент полипептидного иммуногена или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидный иммуноген, например, относится к непрерывной, менее чем целой доле (например, по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% от всей длины) последовательности, такой как

последовательность, раскрытая в данном документе. Следует понимать, что все настоящее изобретение предусматривает фрагменты (например, иммуногенные фрагменты) всех иммуногенов, раскрытых в данном документе.

Используемый в данном документе термин "содержание GC" относится к процентному содержанию гуанина (G) и цитозина (C) в последовательности нуклеиновой кислоты. Формула для расчета содержания GC представляет собой $(G + C) / (A + G + C + U) \times 100\%$ (для РНК) или $(G + C) / (A + G + C + T) \times 100\%$ (для ДНК). Аналогичным образом, термин "содержание уридина" относится к процентному содержанию уридина (U) в последовательности нуклеиновой кислоты. Формула для расчета содержания уридина представляет собой $U / (A + G + C + U) \times 100\%$. Аналогичным образом, термин "содержание тимидина" относится к процентному содержанию тимидина (T) в последовательности нуклеиновой кислоты. Формула для расчета содержания тимидина представляет собой $T / (A + G + C + T) \times 100\%$.

Используемый в данном документе термин "стимулятор врожденной иммунной системы" относится к веществу, которое индуцирует врожденный иммунологический ответ, частично путем индуцирования экспрессии одного или нескольких генов, участвующих во врожденном иммунитете, включая без ограничения интерферон типа I (например, $IFN\alpha$, $IFN\beta$ и/или $IFN\gamma$), провоспалительный цитокин (например, IL-1, IL-12, IL-18, TNF- α и/или GM-CSF), индуцируемый ретиноевой кислотой ген-I (RIG-I, также известный как DDX58), ген 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5, также известный как IFIH1), 2'-5'-олигоденилатсинтазу 1 (OAS 1), OAS-подобный белок (OASL) и/или протеинкиназу R (PKR). Стимулятор врожденной иммунной системы может действовать как адъювант, например, при введении в комбинации с рибонуклеотидом, который кодирует иммуноген, или при составлении с ним. Стимулятор врожденной иммунной системы может представлять собой отдельный молекулярный объект (например, не кодируемый полирибонуклеотидом или не включенный в его последовательность), например, STING (например, caSTING), TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1 или их конститутивно активный мутантный вариант. Стимулятор врожденной иммунной системы может кодироваться (например, экспрессироваться с) полирибонуклеотидом. Полирибонуклеотид может в качестве альтернативы или дополнительно предусматривать рибонуклеотидную последовательность, которая действует как стимулятор врожденной иммунной системы (например, GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер).

Используемый в данном документе термин "примесь" представляет собой нежелательное вещество, присутствующее в композиции, например, фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой технологическую примесь. В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой родственное продукту вещество, отличное от необходимого продукта в конечной композиции, например, отличное от активного ингредиента лекарственного средства, например, кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Используемый в данном документе термин "технологическая примесь" означает вещество, применяемое, присутствующее или образующееся при изготовлении композиции, препарата или продукта, которое является нежелательным в конечной композиции, препарате или продукте, отличающееся от линейных полирибонуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления технологическая примесь представляет собой фермент, применяемый в синтезе или циркуляризации полирибонуклеотидов. Используемый в данном документе термин "родственное продукту вещество" представляет собой вещество или побочный продукт, образующийся во время синтеза для получения композиции, препарата или продукта или любого их промежуточного соединения. В некоторых вариантах осуществления родственное продукту вещество представляет собой дезоксирибонуклеотидные фрагменты. В некоторых вариантах осуществления родственное продукту вещество представляет собой дезоксирибонуклеотидные мономеры. В некоторых вариантах осуществления родственное продукту вещество представляет собой одно или несколько из производных или фрагментов полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, например, фрагментов из 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 рибонуклеиновых кислот, мономерных рибонуклеиновых кислот, димерных рибонуклеиновых кислот или тримерных рибонуклеиновых кислот.

Используемый в данном документе термин "иммуноген" относится к любой молекуле или молекулярной структуре, которая содержит один или несколько эпитопов, которые распознаются антителом или Т-клеточным рецептором, на которые нацелены антитело или Т-клеточный рецептор или которые связываются с антителом или Т-клеточным рецептором. В частности, иммуноген индуцирует иммунный ответ у субъекта (например, является иммуногенным, как определено в данном документе). Иммуноген способен индуцировать иммунный ответ у субъекта, где иммунный ответ относится к ряду молекулярных, клеточных и организменных событий, которые индуцируются, когда иммуноген сталкивается с иммунной системой. Иммунный ответ может представлять собой гуморальный и/или клеточный иммунный ответ. Они могут предусматривать

выработку антител и размножение В- и Т-клеток. Чтобы определить, возник ли иммунный ответ, и проследить его течение, у иммунизированного субъекта можно осуществлять мониторинг появления иммунных реагентов, направленных на специфический иммуноген. При иммунных ответах на большинство иммуногенов индуцируется продуцирование как специфических антител, так и специфических эффекторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуноген является чужеродным для хозяина. В некоторых вариантах осуществления иммуноген не является чужеродным для хозяина. Иммуноген может предусматривать весь полипептид, полисахарид, полинуклеотид или липид или часть такового. Иммуноген также может представлять собой смешанный полипептид, полисахарид, полинуклеотид и/или липид. Например, иммуноген может представлять собой полипептид, который был трансляционно модифицирован. "Полипептидный иммуноген" относится к иммуногену, который предусматривает полипептид. Полипептидный иммуноген может также предусматривать одну или несколько посттрансляционных модификаций, и/или может образовывать комплекс с одной или несколькими дополнительными молекулами, и/или может характеризоваться третичной или четвертичной структурой, каждая из которых может определять иммуногенность полипептида или влиять на таковую.

Используемый в данном документе термин "иммуногенный" относится к способности индуцировать ответ на вещество в конкретном анализе иммунного ответа выше предварительно определенного порога. Анализ может представлять собой, например, анализ экспрессии определенных маркеров воспаления, анализ выработки антител или анализ иммуногенности, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ может быть индуцирован, когда иммунная система организма или определенный тип иммунных клеток подвергаются воздействию иммуногена.

Иммуногенный ответ можно оценить, оценив количество антитела в плазме или сыворотке крови субъекта с применением анализа общих антител, подтверждающего теста, титрования и изотипирования антител и оценки нейтрализующих антител. При анализе общих антител измеряют содержание всех антител, образующихся как часть иммунного ответа в сыворотке или плазме крови субъекта, которому был введен иммуноген. Наиболее часто применяемым тестом для выявления антител является ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), с помощью которого выявляют антитела в тестируемой сыворотке крови, которые связываются с антителом, представляющим интерес, включая IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Иммуногенный ответ можно дополнительно оценить с помощью подтверждающего анализа. После оценки общих антител можно

применять подтверждающий анализ для подтверждения результатов анализа общих антител. Конкурентный анализ можно применять для подтверждения того, что антитело специфически связывается с мишенью, и что положительный результат скринингового анализа не является результатом неспецифического взаимодействия тестируемой сыворотки крови или реагента для выявления с другими материалами в анализе.

Иммуногенный ответ можно оценить посредством изотипирования и титрования. Анализ для изотипирования можно применять только для оценки соответствующих изотипов антител. Например, ожидаемые изотипы могут представлять собой IgM и IgG, которые можно специфически выявить и количественно определить посредством изотипирования и титрования и затем сравнить с общим количеством присутствующих антител.

Иммуногенный ответ можно оценить с помощью анализа нейтрализующих антител (nAb). Анализ нейтрализующих антител (nAb) можно применять для определения того, нейтрализуют ли антитела, вырабатываемые в ответ на иммуноген, иммуноген, тем самым подавляя влияние иммуногена на мишень и приводя к аномальным фармакокинетическим характеристикам. Анализ nAb часто представляет собой клеточный анализ, при котором клетки-мишени инкубируют с антителом. Могут быть применены различные клеточные анализы nAb, включая без ограничения анализ клеточной пролиферации, жизнеспособности, антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC), ингибирования цитопатического эффекта (CPE), апоптоза, лигандстимулированной передачи клеточного сигнала, ферментативной активности, анализ с использованием репортерных генов, анализ секреции белка, метаболической активности, стресса и митохондриальной функции. Показатели выявления предусматривают поглощение, флуоресценцию, люминесценцию, хемилюминесценцию или проточную цитометрию. Анализ связывания лиганда также можно применять для измерения аффинности связывания иммуногена и антитела *in vitro* для оценки эффективности нейтрализации.

Дополнительно индукция клеточного иммунного ответа может быть оценена с помощью измерения активации Т-клеток у субъекта с применением клеточных маркеров на Т-клетках, полученных от субъекта. Образец крови, биоптат лимфатического узла или образец ткани может быть собран у субъекта, и Т-клетки из образца могут быть оценены на наличие одного или нескольких (например, 2, 3, 4 или больше) маркеров активации: CD25, CD71, CD26, CD27, CD28, CD30, CD154, CD40L, CD134, CD69, CD62L или CD44. Активация Т-клеток также может быть оценена с применением тех же способов в модели на животных *in vivo*. Этот анализ также может быть выполнен посредством добавления

иммуногена к Т-клеткам *in vitro* (например, Т-клеткам, полученным от субъекта, модели на животном, репозитория или коммерческого источника) и измерения уровня вышеупомянутых маркеров для оценки активации Т-клеток. Аналогичные подходы можно применять для оценки влияния активации и на активацию других иммунных клеток, таких как эозинофилы (маркеры: CD35, CD11b, CD66, CD69 и CD81), дендритные клетки (маркеры: IL-8, МНС класса II, CD40, CD80, CD83 и CD86), базофилы (CD63, CD13, CD4 и CD203c) и нейтрофилы (CD11b, CD35, CD66b и CD63). Эти маркеры можно оценить с применением проточной цитометрии, иммуногистохимического анализа, гибридизации *in situ* и других анализов, которые позволяют измерять уровень клеточных маркеров. Сравнение результатов до и после введения иммуногена можно применять для определения его эффекта.

Используемый в данном документе термин "индуцирование иммунного ответа" относится к инициации, усилению или поддержанию иммунного ответа у субъекта. Индуцирование иммунного ответа может относиться к адаптивному иммунному ответу или врожденному иммунному ответу. Индукция иммунного ответа может быть измерена, как обсуждалось выше.

Используемый в данном документе термин "линейный аналог" означает молекулу полирибонуклеотида (и ее фрагменты), характеризующуюся нуклеотидной последовательностью, являющейся такой же, что и у кольцевого полирибонуклеотида, или сходной с таковой (например, характеризующейся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение), и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованная версия (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент (например, версия, предшествующая циркуляризованной версии) представляет собой молекулу полирибонуклеотида (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же или сходной нуклеотидной последовательностью (например, характеризующуюся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) и наличием таких же или сходных модификаций нуклеиновой кислоты, что и кольцевой полирибонуклеотид, и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованную версию (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент представляет собой молекулу полирибонуклеотида (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же нуклеотидной последовательностью, что и кольцевой полирибонуклеотид, или сходной с ним нуклеотидной последовательностью

(например, характеризующейся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) и наличием модификаций нуклеиновой кислоты, отличающихся от таковых в кольцевом полирибонуклеотиде, или их отсутствием и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованная версия (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления фрагмент молекулы полирибонуклеотида, которая является линейным эквивалентом, представляет собой любую часть линейного эквивалента молекулы полирибонуклеотида, которая является более короткой, чем линейный эквивалент молекулы полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 5'-кэп. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит полиаденозиновый хвост. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 5'-UTR.

Используемые в данном документе термины "линейная РНК", "линейный полирибонуклеотид" и "молекула линейного полирибонуклеотида" используются взаимозаменяемо и означают молекулу полирибонуклеотида, характеризующуюся наличием 5'- и 3'-конца. Один или оба из 5'- и 3'-концов могут представлять собой свободные концы или могут быть соединены с другим компонентом. Линейная РНК предусматривает РНК, которая не подверглась циркуляризации (например, предшествующая циркуляризованной) и может применяться в качестве исходного материала для циркуляризации посредством, например, лигирования с помощью шунта или способов циркуляризации, катализируемых химически, ферментативно, с использованием рибозимов или сплайсинга.

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

Используемый в данном документе термин "доставки в "голом" виде" означает состав для доставки в клетку без помощи носителя и без ковалентной модификации компонента, который способствует доставке в клетку. Состав для доставки в "голом" виде не содержит каких-либо реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. Например, состав на основе кольцевого полирибонуклеотида для доставки в "голом" виде представляет собой состав, который содержит кольцевой полирибонуклеотид без ковалентной модификации и не содержит носителя.

Используемые в данном документе термины "РНК с односторонним разрывом", "линейный полирибонуклеотид с односторонним разрывом" и "молекула линейного полирибонуклеотида с односторонним разрывом" применяются взаимозаменяемо и означают молекулу полирибонуклеотида, характеризующуюся наличием 5'- и 3'-конца, которые образуются в результате образования одностороннего разрыва или разрушения кольцевой РНК.

Используемый в данном документе термин "некольцевая РНК" означает РНК с полным разрывом и линейную РНК.

Термин "фармацевтическая композиция" предназначен также для раскрытия того, что кольцевой полирибонуклеотид, содержащийся в фармацевтической композиции, может быть использован для лечения организма человека или животного путем терапии. Таким образом, предполагается, что он эквивалентен термину "кольцевой полирибонуклеотид для применения в терапии".

Используемый в данном документе термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую одну или несколько субъединиц нуклеиновой кислоты или нуклеотидов, и может использоваться взаимозаменяемо с "нуклеиновой кислотой" или "олигонуклеотидом". Полинуклеотид может включать один или несколько нуклеотидов, выбранных из аденозина (А), цитозина (С), гуанина (G), тимина (Т) и урацила (U) или их вариантов. Нуклеотид может включать нуклеозид и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше фосфатных (PO₃) групп. Нуклеотид может включать азотистое основание, пятиуглеродный сахар (либо рибозу, либо дезоксирибозу) и одну или несколько фосфатных групп. Рибонуклеотиды представляют собой нуклеотиды, в которых сахаром является рибоза. Полирибонуклеотиды, или рибонуклеиновые кислоты, или РНК могут относиться к макромолекулам, которые содержат несколько рибонуклеотидов, полимеризующихся посредством фосфодиэфирных связей. Дезоксирибонуклеотиды представляют собой нуклеотиды, в которых сахаром является дезоксирибоза.

"Полидезоксирибонуклеотиды", "дезоксирибонуклеиновые кислоты" и "ДНК" означают макромолекулы, которые содержат несколько дезоксирибонуклеотидов, которые полимеризуются посредством фосфодиэфирных связей. Нуклеотид может представлять собой нуклеозидмонофосфат или нуклеозидполифосфат. Нуклеотид означает дезоксирибонуклеозидполифосфат, такой как, например, дезоксирибонуклеозидтрифосфат (dNTP), который может быть выбран из дезоксиаденозинтрифосфата (dATP), дезоксицитидинтрифосфата (dCTP), дезоксигуанозинтрифосфата (dGTP), уридинтрифосфата (dUTP) и дезокситимидинтрифосфата (dTTP), dNTP, которые содержат выявляемые метки, такие

как люминесцентные метки или маркеры (например, флуорофоры). Нуклеотид может содержать любую субъединицу, которая может быть включена в растущую нить нуклеиновой кислоты. Такая субъединица может представлять собой А, С, G, Т или U или любую другую субъединицу, которая является специфичной для одного или нескольких комплементарных А, С, G, Т или U, или комплементарной пурину (т. е. А или G, или их вариант) или пиримидину (т. е. С, Т или U, или их вариант). В некоторых примерах полинуклеотид представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), рибонуклеиновую кислоту (РНК) или их производные или варианты. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой, среди прочего, короткую интерферирующую РНК (siRNA), микроРНК (miRNA), плазмидную ДНК (pDNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), малую ядерную РНК (snRNA), матричную РНК (mRNA), предшественник mRNA (пре-mRNA), антисмысловую РНК (asRNA) и охватывает как нуклеотидную последовательность, так и любые ее структурные варианты осуществления, такие как однонитевая, двухнитевая, трехнитевая, спиральная, шпилечная и т. п. В некоторых случаях молекула полинуклеотида является кольцевой. Полинуклеотид может характеризоваться различной длиной. Молекула нуклеиновой кислоты может характеризоваться длиной по меньшей мере приблизительно 10 оснований, 20 оснований, 30 оснований, 40 оснований, 50 оснований, 100 оснований, 200 оснований, 300 оснований, 400 оснований, 500 оснований, 1 тысячу оснований (т. о.), 2 т. о., 3 т. о., 4 т. о., 5 т. о., 10 т. о., 50 т. о. или больше. Полинуклеотид можно выделить из клетки или ткани. Как представлено в варианте осуществления в данном документе, полинуклеотидные последовательности могут предусматривать выделенные и очищенные молекулы ДНК/РНК, синтетические молекулы ДНК/РНК и синтетические аналоги ДНК/РНК.

Полинуклеотиды, например, полирибонуклеотиды или полидезоксирибонуклеотиды, могут предусматривать один или несколько вариантов нуклеотидов, включая нестандартный(-е) нуклеотид(-ы), неприродный(-е) нуклеотид(-ы), аналог(-и) нуклеотида и/или модифицированные нуклеотиды. Примеры модифицированных нуклеотидов включают без ограничения диаминопурин, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксихидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламин метил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламин метилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюнозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламин метилурацил, 5-метоксиамин метил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-D46-изопентениладенин,

урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый сложный эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксивпропил)урацил, (аср3)w, 2,6-диаминопурин и т. п. В некоторых случаях нуклеотиды могут предусматривать модификации в их фосфатных компонентах, включая модификации трифосфатного компонента.

Неограничивающие примеры таких модификаций включают фосфатные цепи большей длины (например, фосфатную цепь, содержащую 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше фосфатных компонентов) и модификации с использованием тиольных компонентов (например, альфатриотрифосфат и бета-тиотрифосфаты). Молекулы нуклеиновой кислоты также могут быть модифицированы по основному компоненту (например, по одному или нескольким атомам, которые, как правило, доступны для образования водородной связи с комплементарным нуклеотидом, и/или по одному или нескольким атомам, которые, как правило, не способны образовывать водородную связь с комплементарным нуклеотидом), сахарному компоненту или фосфатному остову. Молекулы нуклеиновой кислоты могут также содержать модифицированные амином группы, такие как аминоаллил-1-dUTP (aa-dUTP) и аминогексилакриламид-dCTP (aha-dCTP) для обеспечения возможности ковалентного присоединения компонентов, способных вступать в реакцию с аминами, таких как сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды (NHS). Альтернативы стандартным парам оснований ДНК или парам оснований РНК в олигонуклеотидах по настоящему изобретению могут обеспечить более высокую плотность в битах на кубический мм, более высокую безопасность (устойчивость к случайному или целенаправленному синтезу природных токсинов), более легкое распознавание для фотопрограммируемых полимераз или более простую вторичную структуру. Такие альтернативные пары оснований, совместимые с природными и мутантными полимеразами для синтеза *de novo* и/или амплификации, описаны в работе Betz K, Malyshev DA, Lavergne T, Welte W, Diederichs K, Dwyer TJ, Ordoukhanian P, Romesberg FE, Marx A. *Nat. Chem. Biol.* 2012 Jul;8(7):612-4, которая включена в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Используемый в данном документе термин "полипептид" означает полимер из аминокислотных остатков (природных или неприродных), соединенных друг с другом чаще всего пептидными связями. Используемый в данном документе термин относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды могут включать генные продукты, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного. Полипептид может представлять

собой одну молекулу или может представлять собой многомолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут включать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды, такие как антитела или инсулин, и могут быть ассоциированы или соединены. Чаще всего дисульфидные связи встречаются в многоцепочечных полипептидах. Термин полипептид может также применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты.

Используемый в данном документе термин "предупреждать" означает снижение вероятности развития заболевания, нарушения или состояния или, в качестве альтернативы, снижение тяжести или частоты симптомов заболевания или нарушения, развивающегося впоследствии. Терапевтическое средство можно вводить субъекту, который подвержен повышенному риску развития заболевания или нарушения по сравнению с представителем общей популяции, для предупреждения развития или уменьшения тяжести заболевания или состояния. Терапевтическое средство можно вводить в качестве профилактического средства, например, до развития любого симптома или проявления заболевания или нарушения.

Применяемые взаимозаменяемо в данном документе термины "поли(A)" и "последовательность поли(A)" относятся к нетранслируемой, непрерывной области молекулы нуклеиновой кислоты, длина которой составляет по меньшей мере 5 нуклеотидов, и которая состоит из остатков аденозина. В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(A) составляет по меньшей мере 10 (SEQ ID NO: 144), по меньшей мере 15 (SEQ ID NO: 145), по меньшей мере 20 (SEQ ID NO: 146), по меньшей мере 30 (SEQ ID NO: 147), по меньшей мере 40 (SEQ ID NO: 148) или по меньшей мере 50 (SEQ ID NO: 149) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) расположена в направлении 3' по отношению к (например, ниже) открытой рамке считывания (например, открытой рамке считывания, кодирующей полипептид), и последовательность поли(A) расположена в направлении 3' по отношению к терминирующему элементу (например, стоп-кодону) так, что поли(A) не подвергается трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) расположена в направлении 3' по отношению к терминирующему элементу и 3'-нетранслируемой области.

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

Используемый в данном документе термин "репликативный элемент" означает последовательность и/или мотив, которые являются применимыми для репликации или которые инициируют транскрипцию кольцевого полирибонуклеотида.

Используемые в данном документе термины "системная доставка" и "системное введение" означают путь введения фармацевтических композиций или других веществ в систему кровообращения (например, в кровь или лимфатическую систему). Системное введение может включать пероральное введение, парентеральное введение, интраназальное введение, подъязычное введение, ректальное введение, чрескожное введение или любые их комбинации. Используемый в данном документе термин "несистемная доставка" или "несистемное введение" может относиться к любым другим путям введения, за исключением системной доставки фармацевтических композиций или других веществ, например, доставляемые вещества не попадают в системы кровообращения (например, в кровь и в лимфатическую систему) организма субъекта.

Используемый в данном документе термин "идентичность последовательностей" определяется с помощью выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с применением алгоритма глобального или локального выравнивания. Затем последовательности могут называться "по сути идентичными" или "по сути сходными", если они (при оптимальном выравнивании, например, программами GAP или BESTFIT с применением параметров по умолчанию) характеризуются по меньшей мере определенным минимальным процентом идентичности последовательностей. В программе GAP используется алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей их длине, максимизирующий число совпадений и минимизирующий число гэпов. Как правило, используются параметры по умолчанию для программы GAP, где штраф за открытие гэпа = 50 (нуклеотиды) / 8 (белки), и штраф за продолжение гэпа = 3 (нуклеотиды) / 2 (белки). Для нуклеотидов используемая матрица замен по умолчанию представляет собой матрицу замен `nwsgapdna.cmp`, и для белков матрица замен по умолчанию представляет собой `Blosum62` (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивания последовательностей и количество баллов для процентного значения идентичности последовательностей можно определять с применением компьютерных программ, таких как GCG Wisconsin Package версии 10.3, доступная от Accelrys Inc., 9685 Скрэнтон Роуд, Сан-Диего, штат Калифорния, 92121-3752, США, или EmbossWin версии 2.10.0 (с применением программы "needle"). В качестве альтернативы или дополнительно процент идентичности можно определить посредством поиска в базах данных с применением таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т. д. Идентичность

последовательностей относится к идентичности последовательностей по всей длине последовательности.

"Сигнальная последовательность" относится к полипептидной последовательности, например, длиной от 10 до 45 аминокислот, которая присутствует на N-конце полипептидной последовательности растущего белка, который направляет полипептидную последовательность на секреторный путь.

Используемые в данном документе термины "лечить" и "осуществление лечения" относятся к терапевтическому лечению заболевания или нарушения (например, инфекционного заболевания, рака, токсичности или аллергической реакции) у субъекта. Эффект лечения может включать реверсирование, облегчение, снижение тяжести, излечение, ингибирование прогрессирования, снижение вероятности рецидива заболевания или одного или нескольких симптомов или проявлений заболевания или нарушения, стабилизацию (т. е. обеспечение отсутствия ухудшения) состояния заболевания или нарушения и/или предупреждения распространения заболевания или нарушения по сравнению с состоянием и/или состоянием заболевания или нарушения при отсутствии терапевтического лечения.

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

Используемый в данном документе термин "общие молекулы рибонуклеотидов" означает общее количество любых молекул рибонуклеотидов, включая молекулы линейных полирибонуклеотидов, молекулы кольцевых полирибонуклеотидов, мономерные рибонуклеотиды, другие молекулы полирибонуклеотидов, их фрагменты и их модифицированные варианты, согласно измерению общей массы молекул рибонуклеотидов.

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

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

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена схема иллюстративной кольцевой РНК, которая содержит две экспрессионные последовательности, каждая экспрессионная последовательность функционально связана с IRES, и при этом по меньшей мере одна экспрессионная последовательность представляет собой иммуноген VZV.

На фиг. 2 представлена схема иллюстративной кольцевой РНК, которая содержит две экспрессионные последовательности, разделенные доменом расщепления (например, 2A, сайтом фурина или фурином-2A), где по меньшей мере одна экспрессионная последовательность представляет собой иммуноген VZV, и все они функционально связаны с IRES.

На фиг. 3 показана схема кольцевой РНК, которая содержит ORF, которая кодирует иммуноген VZV, и полинуклеотидную адьювантную последовательность (например, не кодирующую нуклеотидную последовательность, которая стимулирует врожденную иммунную систему).

На фиг. 4 показана схема множества кольцевых РНК, где первая кольцевая РНК содержит ORF, кодирующую иммуноген VZV, а вторая кольцевая РНК содержит ORF, кодирующую либо второй иммуноген, либо полипептидный адьювант.

На фиг. 5 представлена схема иллюстративных полирибонуклеотидных конструкций, кодирующих иммуноген (например, иммуноген VZV) и один или несколько доменов мультимеризации и иллюстративных соответствующих иммуногенных комплексов.

На фиг. 6 показана экспрессия секретлируемого gE из клеток HEK293T через 18 часов после трансфекции кольцевой РНК, кодирующей gE VZV.

На фиг. 7 показана экспрессия gE, выявленная на клеточной поверхности клеток HEK293T, которые трансфицировали одной из четырех различных кольцевых РНК, каждая из которых содержит отличающуюся нуклеотидную последовательность трансмембранного gE VZV.

На фиг. 8 показана экспрессия gE, выявленная на клеточной поверхности клеток HEK293T, которые трансфицировали различными кольцевыми РНК, кодирующими трансмембранный gE VZV, каждая из которых содержит отличающийся элемент IRES.

На фиг. 9 показана концентрация gE, измеренная в крови мышей через 6 часов, 2 дня или 5 дней после введения начальной дозы (праймирующей дозы) кольцевой РНК, кодирующей секретлируемый gE VZV, или PBS.

На фиг. 10 показаны уровни антител к gE в сыворотке крови, измеренные в образцах крови, собранных у мышей через 14, 35 и 42 дня после введения начальной дозы (праймирующей дозы) кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE VZV, трансмембранный gE VZV, или PBS.

На фиг. 11 показано, что gE-специфические Т-клетки получали в спленоцитах, стимулированных пулами gE VZV, для секретируемого и трансмембранного gE через 42 дня после введения начальной дозы (праймирующей дозы) кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE VZV, трансмембранный gE VZV, или PBS.

На фиг. 12А и фиг. 12В показан процент клеток, которые были положительными по CD8 и IFN- γ (фиг. 12А) или положительными по CD4 и IFN- γ (фиг. 12В) через 42 дня после введения начальной дозы (праймирующей дозы) кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE VZV, трансмембранный gE VZV, или PBS.

Подробное описание

В настоящем изобретении представлены композиции, фармацевтические препараты и способы, относящиеся к кольцевым полирибонуклеотидам, кодирующим один или несколько иммуногенов VZV. В настоящем изобретении также представлены способы применения кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих один или несколько иммуногенов VZV. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут индуцировать иммунный ответ у субъекта при введении. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта (например, ветрянки или опоясывающего лишая).

Иммуногены VZV

Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере одну экспрессионную последовательность, кодирующую иммуноген VZV. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать несколько экспрессионных последовательностей, где по меньшей мере одна экспрессионная последовательность кодирует иммуноген VZV. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать две или более (две, три, четыре, пять, шесть или более) экспрессионных последовательностей, где каждая экспрессионная последовательность кодирует иммуноген VZV. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать первую экспрессионную последовательность, которая кодирует иммуноген VZV, и вторую экспрессионную последовательность, которая кодирует адъювант. Кольцевые

полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать экспрессионную последовательность, которая кодирует иммуноген VZV, и некодирующую последовательность, которая стимулирует врожденную иммунную систему.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой гликопротеин VZV. Например, гликопротеин VZV может представлять собой gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN или gM VZV или его иммуногенный фрагмент или эпитоп. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gE VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gI VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gB VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gH VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gK VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gL VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gC VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gN VZV. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полипептид gM VZV.

В некоторых вариантах осуществления гликопротеин VZV представляет собой полипептид gE или вариант полипептида gE. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует якорный домен (домен для удерживания в ER). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует карбоксиконцевой хвостовой домен. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV содержит по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких мотивах, ассоциированных с удерживанием в ER, при этом мутация(-и) в одном или нескольких мотивах приводит(-ят) к снижению удерживания полипептида gE VZV в ER и/или аппарате Гольджи. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV содержит по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких мотивах, ассоциированных с нацеливанием gE на аппарат Гольджи или сеть транс-Гольджи (TGN), при этом мутация(-и) в одном или нескольких мотивах приводит(-ят) к снижению нацеливания полипептида gE VZV на аппарат Гольджи или TGN или локализации в них. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида gE VZV содержит по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких мотивах, ассоциированных с интернализацией gE VZV или эндоцитозом gE, при этом мутация(-и) в одном или нескольких мотивах приводит(-ят) к снижению эндоцитоза полипептида gE VZV.

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких фосфорилированных кислотных мотивах. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит мутацию Y582G. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит мутацию Y569A. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV содержит мутацию Y582G и мутацию Y569A.

В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-524, 1-546, 1-561, 1-573 или 1-623 gE VZV. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-524. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-546. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-561. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-573, необязательно содержащий мутацию Y569A. В некоторых вариантах осуществления полипептид gE VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий аминокислоты 1-623, необязательно содержащий мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой полипептид gE или его вариант, выбранный из последовательности из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот из последовательности в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% аминокислот из последовательности в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой вариант последовательности в таблице 1, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, точечных мутаций, делеций или вставок).

Таблица 1. Иллюстративные иммуногены gE VZV

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
29	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRD DFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEE NHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPA IQHICLKHTTCFQDVVVDVDC AENTKEDQLAEISYR FQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKV LRTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGD TFS LAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYS TCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFV DTPESLSGLYVVFVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFV NAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYA AWTGGLAAVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARV DK
30	Гликопротеин E, 623 аминокислоты	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRD DFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEE NHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPA IQHICLKHTTCFQDVVVDVDC AENTKEDQLAEISYR FQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKV LRTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGD TFS LAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYS TCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFV DTPESLSGLYVVFVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFV NAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSP LIRYA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		AWTGGLAAVLLCLVIFLICAKRMRVKAYRVDKS PYNQSMYYAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSH GGSSYTVYIDKTR
31	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, мутация Y569A	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRD DFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEE NHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPA IQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYR FQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKV LRTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDFTS LAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYS TCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFV DTPESLSGLYVVFVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFV NAIIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYA AWTGGLAAVLLCLVIFLICAKRMRVKAARVDKS PYNQSMYYAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSH GGSSYTVYIDKTR
32	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, двойная мутация Y569A/Y582G	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRD DFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEE NHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPA IQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYR FQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKV LRTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDFTS LAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYS

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p>TCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFV DTPESLSGLYVVFVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFV NAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYA AWTGGLAAVLLCLVIFLICAKRMRVKAARVDKS PYNQSMYGAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSH GGSSYTVYIDKTR</p>
33	Гликопротеин E, 546 аминокислот	<p>MGTVNKPVVGVLMGFGIITGLRITNPVRASVLRD DFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSR KAYDHNSPYIWPRNDYDGFLANAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVITLNGDD RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEE NHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPA IQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYR FQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKV LRTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDFTS LAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYS TCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFV DTPESLSGLYVVFVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFV NAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYA AWTGGLA</p>
65	Гликопротеин E, 524 аминокислоты	<p>MGVTAPRTLILLLSGALALTETWAGSRITNPVRASVL RYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRG ESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLANAHEHHGVYN QGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVITLN GDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEV SVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGD AAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAE ISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPG VLKVLRTEKQYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTW</p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		KGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVG DTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPM RLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVAS TVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTT LKFVDTPELSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTV DHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPL IRYAAWTGGLA
66	Гликопротеин E, 524 аминокислоты	MGRITNPVRASVRLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYH SDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDL GDDTGIHVIP TLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGD LNP KPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTE TWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDV DCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTL FDELELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRGS DGTSTYATFLVTWK GDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFH MWNYHSHVFSVGD TFSLAMHLQYKIHEAPFDLLE WLYVPIDPTCQPM RLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGC TFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHME PSFGLILHDGGTT LKFVDTPELSGLYVFVVYFNGHV EAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKP KEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
67	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVGVLMGFGIITG TLRITNPVRASVRLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHS DHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYDGF ENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLG DDTGIHVIP TLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDL NPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVD CAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLF DELELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVIWNMRGSD GTSTYATFLVTWK GDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFH

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		MWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGC TFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHME PSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNGHV EAVAYTVVSTVDHVFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKP KEITPVNPGTSPLLRYYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLIC TAKRMRVKAARVVK
68	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, мутация Y569A	MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVVGVLGMFGIITG TLRITNPVRASVRLRYDDFDHIDEDKLDNTSVYEPYYHS DHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWRNDYDGFL ENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLG DDTGIHVIPITLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDL NPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVD CAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLF DELELDPPEIEPGVLK VLRTEKQYLGVIWNMRGSD GTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFH MWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGC TFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHME PSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNGHV EAVAYTVVSTVDHVFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKP KEITPVNPGTSPLIRYYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICT AKRMRVKAARVVKSPYNQSMYGAGLPVDDDFEDSE STDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует иммуноген VZV, содержащий сигнальную последовательность, например, иммуноген VZV, содержащий сигнальную последовательность, выбранную из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот из последовательности в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой иммуногенный фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или

95% аминокислот из последовательности в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV представляет собой вариант последовательности в таблице 2, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, точечных мутаций, делеций или вставок).

Таблица 2. Иллюстративные иммуногены gE VZV, содержащие сигнальную последовательность

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
34	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A Сигнальная последовательность: SecSP38 (подчеркнуто)	<u>MWWRLWLLLLLLLLWPMVW</u> AMGTVNKPVVGVL LMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYYDDFHIDEDKLDTN SVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIW PRNDYDGFLENAHEHGVYNQGRGIDSGERLMQPT QMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQ YGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQR IYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCF QDVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPW IVVNTSTLFDLELDPPEIEPGVLK VLRTEKQYLGVI WNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQ PRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIEHA PFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLS HMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNC EHADNYTAYC LGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYV FV VYFNHGHVEAVAYTVVSTVDHVFVNAIEERGFPPTAGQ PPATTKPKEITPVNPGTSPLLR YAAWTGGLAAVLL CLVIFLICTAKRMRVKAARVDK
35	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A Сигнальная последовательность	<u>MWWLLLLLLLLWPMVW</u> AMGTVNKPVVGVL IITGTLRITNPVRASVLRYYDDFHIDEDKLDTN SVYEPY YHSDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYD GFLENAHEHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQE DLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQR IYGVRY

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
	ть: SecD4 (подчеркнуто)	TETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVD VDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLK VLRTEKQYLGVIWNMRG SDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEF HMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLL EWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSG CTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISH MEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNG HVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPTAGQPPATT KPKEITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVLLCLVIFL ICTAKRMRVKAARVDK
36	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A Сигнальная последовательность: gLuc (подчеркнуто)	<u>MGVKVLFALICIAVAEAK</u> MGTVNKPVVGVLMGFGII TGTLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLDTNSVYEPY YHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYD GFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQE DLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRY TETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVD VDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLK VLRTEKQYLGVIWNMRG SDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEF HMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLL EWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSG CTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISH MEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVFNG HVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPTAGQPPATT KPKEITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVLLCLVIFL ICTAKRMRVKAARVDK
37	Гликопротеин E, 546 аминокислот Сигнальная последовательность	<u>MASRLTLLTLLLLLAGDRASS</u> MGTVNKPVVGVL MFGIITGTLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLDTNSV YEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPR NDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQ

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
	ть: INHC1 (подчеркнуто)	MSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQY GDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRI YGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQ DVVVDVDC AENTKEDQLAEISYRFQGGKEADQPWI VVNTSTLFD EELDPPEIEPGVLK VLRTEKQYLGVI WNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQ PRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEA PFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLS HMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYC LGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVVFV VYFNGHVEAVAYTVVSTVDHVFVNAIEERGFPPTAGQ PPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
38	Гликопротеин E, 546 аминокислот Сигнальная последовательность: gLuc (подчеркнуто)	<u>MGVKVLFALICIAVAEAKMGTVNKPVVGVL</u> MGFGII TGTLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLD TNSVYEPY YHSDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYD GFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQE DLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRY TETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVD VDC AENTKEDQLAEISYRFQGGKEADQPWIVVNTST LFD EELDPPEIEPGVLK VLRTEKQYLGVIWNMRG SDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEF HMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLL EWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSG CTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISH MEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVVFVYFNG HVEAVAYTVVSTVDHVFVNAIEERGFPPTAGQPPATT KPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
69	Гликопротеин E, 539 аминокислот Сигнальная последовательность	MGVKVLFALICIAVAEAMGTVNKPVVGVLMGFGIIT GTLRITNPVRASVLR YDDFHIDEDKLD TNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIWPRNDYDG FLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQED

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
	ть: gLuc (подчеркнуто)	LGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKG DLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYT ETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTTCFQDVVVD VDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLK VLRTEKQYLGVIWNMRG SDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEF HMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLL EWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSG CTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISH MEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVVFVYFNG HVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATT KPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
70	Гликопротеин E, 524 аминокислоты Сигнальная последовательность: gLuc (подчеркнуто)	<u>MGVKVLFALICIAVAEAKRITNPVRASVLR</u> YDDFHID EDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYD HNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSG ERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIV NVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFT LRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICL KHTTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKK EADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLK VLRTEK QYLGVIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNP TPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHL QYKIHEAPFDLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHP NAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHA DNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESL SGLYVVFVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEER GFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGG LA

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит экспрессионную последовательность, кодирующую иммуноген VZV, необязательно содержащий сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, и необязательно сигнальная последовательность представляют собой последовательность из

таблицы 3. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, представляет собой фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 нуклеотидов последовательности в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, представляет собой фрагмент, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% последовательности в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген VZV, содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из таблицы 3.

Таблица 3. Иллюстративные полирибонуклеотидные последовательности, кодирующие иммуногены gE VZV, необязательно содержащие сигнальную последовательность

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
39	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUAGGUCUCACAUGUUCUACGAGGCCUGAAGG CCGAGCUGGUGUACACCCGGGCUUGGCACGGCU UCCGGCCCCGGGCCAACUGCGUGGUCCUGAGCGA CUACAUCCCCCGGGUGGCCUGCAACAUGGGCACC GUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUGCUGAUGGGC UUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCA ACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGA UUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAA CAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCAC GCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGC AGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACA UCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGA GAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAG GGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUG CAGCCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGGACCUGG GCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCU GAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGG CGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUG AUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		ACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCG UGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAG CCUGACCUGCACC GGCGACGCCGCUCCCGCCAUC CAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCUUGCUIUC AGGACGUGGUUGUGGACGUGGACUGCGCCGAGA ACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCU ACCGGUUC CAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGC CCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCG ACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCC CGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCA GUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGG CAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUG GUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAAC CCCACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCG CCGAAUUC CAUAUGUGGAACUACCACAGCCACG UGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCA UGCACCUGCAGUACAAGA UCCACGAGGCCCCCUU CGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUC GACCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCA CCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCAGUGCCU GAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUAACAG UCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUG UACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCG CCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAG CUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACC CUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGC GGCCUGUACGUGUUCGUGGUCUACUUCAACGGC CACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUGAGC ACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUUCGAGGAG CGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAG CCACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCCGUGAA CCCC GGCACCAGCCCCUGUUGCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUUCUGCUG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		UGCCUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCCAAGC GGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAGU AAAUGAGACCAUA
40	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A, сигнальная последовательность SecSP38	AUAGGUCUCACAUGUGGGUGGCGGCUGUGGUGGC UGCUGCUGUUGCUGCUGCUCCUGUGGCCCAUGG UGUGGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGG UGGGCGUCCUGAUGGGGCUUCGGCAUCAUACCG GCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAG CGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGA GGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCC CUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGG GUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUAC GACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCCGGAACG ACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCA CCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGAC AGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUG AGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACCCGGCA UCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCG GCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUA CGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAA GCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGU GGAGGAAAACCACCCUUCACCCUGCGGGCCCCC AUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAA ACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCG GCGACGCCGCUCCCCGCCAUCCAGCACAUUCGCCU GAAGCACACCACCGCUUCCAGGACGUGGUGGU UGACGUGGACUGCGCCGAGAACCAAGGAGGA CCAGCUGGCCGAGAUACGCUACCGGUUCCAGGGC AAGAAAGAGGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUG AACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGGCGUGCUGAAGG UGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		ACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGG CGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCCGUG ACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUCCAUAUGU GGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCG ACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAA GAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGUUGCUGGAG UGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCACCCUGCCAGC CCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCC CAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGC GGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGC GGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGC ACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAU CAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUG CACGACGGCGGAACCACCUGAAGUUCGUGGAC ACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCG UGGUGUACUUAACGGCCACGUGGAGGCCGUGG CCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGU GAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCU GCUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC GCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUCCUG AUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCC GCCCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
41	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A, сигнальная последовательность SecD4	AUAGGUCUCACAUGUGGUGGCUGCUGCUGUUGC UGCUGCUCCUGUGGCCCAUGGUGUGGGCCAUGG GCACCGUGAACAAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGA UGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGA UCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUA CGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p>GACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGC GAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCC CCUACAUCUGGCCCGGAACGACUACGACGGCUU CCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUAC AACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGG CUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGG ACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCC CACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUG AACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUC AAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCAGGGCCAGC GGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACC CCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUA CGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCU GCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCU GCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCG CCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGA UCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCG ACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCU GUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAU CGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGA GAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAU GCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACC UUCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACC CGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCC GGGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCACA GCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCACGAGGCC CCCUUCGACCUGUUGCUGGAGUGGCUGUACGUG CCCAUCGACCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGU ACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCA GUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUU UACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGC</p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		ACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACU ACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGA GCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGA ACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCC UGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCA ACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGG UCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGA GGAGCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCC CCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCG UGAACCCCGGCACCAGCCCCUGCUCCGGUACGC CGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUG CUGUGCCUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACA AGUAAAUGAGACCAUA
42	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A, сигнальная последовательность гLuc	AUAGGUCUCACAUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCG CUCUGAUUUGUAUUGCCGUGGCCGAGGCCAUGG GCACCGUGAACAAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGA UGGGCUUCGGCAUCAUUAACGGCACCCUGCGGA UCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUA CGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGC GACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGC GAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCC CCUACAUCUGGCCCCCGGAACGACUACGACGGCUU CCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUAC AACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGG CUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGG ACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCC CACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUG AACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUC AAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGC GGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUA CGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCU GCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCU GCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCG CCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGA UCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCG ACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCU GUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAU CGAGCCC GGCUGUGUGAAGGUGCUGCGGACCGA GAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAU GCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACC UUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACC CGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCC GGGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCACA GCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCACGAGGCC CCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGC CCAUCGACCCACCCUGCCAGCCCAUGC GGCUGUA CAGCACCCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCAG UGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUU ACCAGUCCCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCA CCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUA CACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAG CCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAA CCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAGCCU GAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAA CGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUC AGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAG GAGCGGGGCUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCC CAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCGU GAACCCCGGCACCAGCCCCUGUUGCGGUACGCC GCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		UGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACA AGUAAAUGAGACCAUA
43	Гликопротеин E, 623 аминокислоты	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAAGCCCG UGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUA CCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGC CAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGA GCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCC UGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCC UACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGA ACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGA GCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUC GACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCACCCAGA UGAGCGCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCG GCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGA CCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCA GUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCC CAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAG CGUGGAGGAAAACCACCCCUACCCUGCGGGCC CCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCG AAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCAC CGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCG CUGAAGCACACCACCUUCCAGGACGUGGUG GUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAG GACCAGCUGGCCGAGAUACAGCUACCGGUUCCAG GGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCUGGAUCGUG GUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAG CUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGA AGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCG UGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCA CCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCC GUGACCCCCAGCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGG GCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUA CAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCUG GAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCACCUGCC AGCCCAUGC GGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCA CCCCAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAAC AGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCC AGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCG AGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGG CAUCAGCCACAUGGAGCCAGCUUCGGCCUGAUC CUGCACGACGGCGGAACCACCUGAAGUUCGUG GACACCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGU UCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCG UGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUU CGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCC UACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCC AAGGAGAUACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCC CCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACC GGCGGCCU GGCCGCAGUGGUGUCUGUUGUGCCUGGUGAUCUU CCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAA GGCCUACCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCAG AGCAUGUACUACGCCGGCCUGCCCGUGGACGACU UCGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGG AGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAGCCACGGCG GCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCCG GUA A AUGAGACCAUA
44	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, мутация Y569A	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAAGCCCG UGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUA CCGGCACCCUGCGGAUACCAACCCCGUGCGGGC CAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGA GCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCC UGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCC UACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGA ACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGA GCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUC GACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGA UGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCG GCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGA CCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCA GUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCC CAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAG CGUGGAGGAAAACCACCCUUCACCCUGCGGGCC CCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCG AAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCAC CGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGC CUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUG GUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAG GACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAG GGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUG GUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAG CUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGA AGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCG UGUACAUCUGGAACAUGCAGGGGCGAGCGACGGCA CCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAA GGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCC GUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGG GCGACACCUUCAGCCUGGCAUGCACCUGCAGUA CAAGAUCCACGAGGCCCCUUCGACCUGCUCCUG GAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCACCCUGCC AGCCCAUGCAGGCUGUACAGCACCCUGCCUGUACCA CCCCACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAAC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		AGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCC AGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCG AGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGG CAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUC CUGCACGACGGCGGAACCAACCUGAAGUUCGUG GACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGU UCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCG UGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUU CGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCUCC UACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCC AAGGAGAUCAACCCCGUGAACCCCGGCACCAGCC CCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCU GGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUU CCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAA GGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCAG AGCAUGUACUACGCCGGCCUGCCCGUGGACGACU UCGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGG AGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAGCCACGGCG GCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCCG GUAAAUGAGACCAUA
45	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, двойная мутация Y569A/Y582G	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACCAAGCCCG UGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUA CCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGC CAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGA GCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCC UGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCC UACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCCGGA ACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGA GCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUC GACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCACCCAGA UGAGCGCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p>GCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGA CCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCA GUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCC CAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAG CGUGGAGGAAAACCACCCUUCACCCUGCGGGCC CCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCG AAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCAC CGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGC CUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGGUG GUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAG GACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAG GGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCUGGAUCGUG GUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAG CUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGA AGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCG UGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCA CCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAA GGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCC GUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGG GCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUA CAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUG GAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCACCUGCC AGCCCAUGC GG CUGUACAGCACCCUGCCUGUACCA CCCCAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAAC AGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCC AGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCG AGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGG CAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUC CUGCACGACGGCGGAACCACCUGAAGUUCGUG GACACCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGU UCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCG UGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUU</p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCC UACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCC AAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCC CCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACC GGCGGCCU GGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUU CCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAA GGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCAG AGCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGACU UCGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGG AGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAGCCACGGCG GCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCCG GUAAAUGAGACCAUA
46	Гликопротеин E, 546 аминокислот, сигнальная последовательность INHC1	AUAGGUCUCACAUGGCCAGCCGGCUGACCCUGCU CACCCUGCUGUUGCUGCUGCUCGCCGGCGACCGG GCCAGCUCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGG UGGGCGUCCUGAUGGGGCUUCGGCAUCAUUACCG GCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAG CGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGA GGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCC CUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCAGCUGG GUGAACC GGGGAGAGAGUUCUCGGAAGGCCUAC GACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCCGGAACG ACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCA CCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGAC AGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUG AGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCA UCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCG GCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUA CGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAA GCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGU GGAGGAAAACCACCCUUCACCCUGCGGGCCCCC AUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p> ACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCG GCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCU GAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGU UGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGA CCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGC AAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUG AACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGG UGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGU ACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGG CGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCCGUG ACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCUAUGU GGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCG ACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAA GAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUGUUGGAG UGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCACCCUGCCAGC CCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCC CAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGC GGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCAGC GGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGC ACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAU CAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUG CACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGAC ACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCG UGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGG CCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGU GAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCU GAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC UAAAUGAGACCAUA </p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
47	Гликопротеин E, 546 аминокислот, сигнальная последовательность gLuc	AUAGGUCUCACAUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCG CUCUGAUUUGUAUUGCCGUGGCCGAGGCCAUGG GCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGA UGGGCUUCGGCAUCAUUAACGGCACCCUGCGGA UCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUA CGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGC GACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCAGGGGC GAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCC CCUACAUCUGGCCCGGAACGACUACGACGGCUU CCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGUGUAC AACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGG CUGAUGCAGCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGG ACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCC CACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUG AACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUC AAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCAAGGGCCAGC GGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACC CCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUA CGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCU GCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCU GCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCG CCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGA UCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCG ACCAGCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCU GUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAU CGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGA GAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAU GCGGGGCAGCGACGGCACCCAGCACCUACGCCACC UUCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACC CGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCC GGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACCACA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p>GCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCACGAGGCC CCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGC CCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGC GGCUGUA CAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCAG UGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUU ACCAGUCCCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCA CCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUA CACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAG CCCAGCUUCGGCCUGAUCUGCACGACGGCGGAA CCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAGCCU GAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAA CGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUC AGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAG GAGCGGGGCUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCC CAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCCGU GAACCCCGGCACCAGCCCCUGUUGCGGUACGCC GCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGC UGUGCCUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACA AGUAAAUGAGACCAUA</p>
71	<p>Гликопротеин E, 539 аминокислот Сигнальная последовательность: gLuc</p>	<p>AUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGCCUGAUCUGC AUCGCCGUGGCCGAGGCCAUGGGCACCGUGAAC AAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGC AUCAUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCG UGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUC ACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGA GAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCG GAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGG CCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACG CCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCG</p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCC CACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGAC GACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACG GCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACC AGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACC UGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGA GGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCU GCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGG UACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGA CCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCA CAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGAC GUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACC AAGGAGGACCAGCUGGGCCGAGAUCAGCUACCGG UUCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCUGG AUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAG CUGGAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCG UGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACC UGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCG ACGGCACAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGAC CUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACC CCCGCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAU UCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUA GCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCU GCAGUACAAGAUCACGAGGCCCCCUUCGACCUG CUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCA CCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCCUGCCU GUACCACCCCAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCAC AUGAACAGCGGCUGCACCUUUAACAGUCCCCACC UGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGA ACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUG CCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGC CUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGU UCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGA GGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGAC CACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUU CCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUA AGCCCAAGGAGAUACCCCCGUGAACCCCGGCAC CAGCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGC GGCCUGGCC
72	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGGACAGUUAUAUAACCUUGUGGUGGGGGUA UUGAUGGGGUUCGGAAUUAUCACGGGAACGUUG CGUAUAACGAAUCCGGUCAGAGCAUCCGUCUUG CGAUACGAUGAUUUUCACAUCGAUGAAGACAAA CUGGAUACAAACUCCGUUAUGAGCCUACUAC CAUUCAGAUCAUUGCGGAGUCUUAUGGGUAAAU CGGGGAGAGUCUUCGCGAAAAGCGUACGAUCAU AACUCACCUUAUAUAUGGCCACGUAUGAUUAU GAUGGAUUUUUAGAGAACGCACACGAACACCAU GGGGUGUAUAUAUCAGGGCCGUGGUUAUCGAUAGC GGGGAACGGUUAUGCAACCCACACAAAUGUCU GCACAGGAGGAUCUUGGGGACGAUACGGGCAUC CACGUUAUCCCUACGUUAAACGGCGAUGACAGA CAUAAAUAUGUAAAUGUGGACCAACGUCAAUAC GGUGACGUGUUUAAGGAGAUUUAAUCCAAAA CCCCAGGCCAAAGACUCAUUGAGGUGUCAGUG GAAGAAAUCACCCGUUUACUUACGCGCACCG AUUCAGCGGAUUUAUGGAGUCCGGUACACCGAG ACUUGGAGCUUUUUGCCGUCAUUAACCGUACG GGAGACGCAGCGCCCGCAUCCAGCAUUAUGU UUAAAACAUAACAACAUGCUUUAAGACGUGGUG GUGGAUGUGGAUUGCGCGGAAAUAUAAAGAG GAUCAGUUGGCCGAAAUCAGUUACCGUUUCAA GGUAAGAAGGAAGCGGACCAACCGUGGAUUGUU GUAAACACGAGCACACUGUUUGAUGAACUCGAA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		UUAGACCCCCCGAGAUUGAACCGGGUGUCUUG AAAGUACUUCGGACAGAAAAACAUAUCUUGGGU GUGUACAUUUGGAACAUGCGCGGCUCCGAUGGU ACGUCUACCUACGCCACGUUUUUGGUCACCUGG AAAGGGGAUGAAAAACAAGAAACCCUACGCC GCAGUAACUCCUCAACCAAGAGGGGCUGAGUUU CAUAUGUGGAAUUACCACUCGCAUGUAUUUUC GUUGGUGAUACGUUUAGCUUGGCAAUGCAUCU CAGUAUAAGAUACAUGAAGCGCCAUUUGAUUUG CUGUUAGAGUGGUUGUAUGUCCCAUCGAUCCU ACAUGUCAACCAUGCGGUUAUAUUCUACGUGU UUGUAUCAUCCCAACGCACCCCAUGCCUCUCUC AUAUGAAUUCGGUUGUACAUUUACCUCGCCAC AUUUAGCCAGCGUGUUGCAAGCACAGUGUAUC AAAAUUGUGAACAUGCAGUAACUACACCGCAU AUUGUCUGGGAUAUCUCAUAUGGAGCCUAGCU UUGGUCUAAUCUACACGACGGGGGCACCACGU UAAAGUUUGUAGAUACACCCGAGAGUUUGUCGG GAUUAUACGUUUUUGUGGUGUAUUUUAACGGGC AUGUUGAAGCCGUAGCAUACACUGUUGUAUCCA CAGUAGAUCAUUUUGUAAACGCAAUUGAGGAGC GUGGAUUUCCGCCAACGGCCGGUCAGCCACCGGC GACUACUAAACCCAAAGGAAAUACCCCGUAAA CCCCAGAACGUCACCACUUCUACGAUAUGCCGCA UGGACCGGAGGGCUUGCAGCAGUAGUACUUUUA UGUCUCGUAAUAUUUUUAAUCUGUACGGCUAAA CGAAUGAGGGUUAAAGCCGCCAGGGUAGACAAG UGA
73	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGCACCGUGAACAAAGCCCGUGGUGGGCGUC CUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGC GGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCG GUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCAC AGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGG GGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAAC AGCCCUACAUCUGGCCCGGAACGACUACGACG GCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGU GUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUG AUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGA UCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACG UGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCAGGG CCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAA CCACCCCUACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGG AUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGC UUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCG CUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACAC CACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGA CUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCC GAGAUACAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAG GCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA CCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGA GAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGAC CGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAA CAUGCAGGGGAGCGACGGCACCCAGCACCUACGCC ACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAG ACCCGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCCAGC CCCGGGGCGCCGAAUUCUAUGUGGAACUACC ACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCA GCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCACGA GGCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUAC GUGCCAUCGACCCACCCUGCCAGCCAUUGCGGC UGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCC CCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		UUUACCAGUCCCCACCUGGCCCCAGCGGGUGGCCA GCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAA CUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUG GAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCG GAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAG CCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUU CAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUG GUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCG AGGAGCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCC CCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCC GUGAACCCCGGCACCAGCCCCUGUUGCGGUACG CCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCU GCUGUGCCUGGUGAUUCUCCUGAUCUGCACCGCC AAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGAC AAG
74	Гликопротеин E, 524 аминокислоты,	AUGGGCGUGACCGCCCCCGGACCUGAUCCUGC UCCUGAGCGGCGCCUGGCCUGACCGAAACCUG GGCCGGCAGCCGGAUACCAACCCCGUGCGGGCC AGCGUGCUGCGGUACGACGAUUCCACAUCGAC GAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAG CCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCU GGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCU ACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAA CGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAG CACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCG ACAGCGGCAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAU GAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGC AUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACC GGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGU ACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCA AGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCG UGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACC GCGCAGCGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCC UGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGG UUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGG ACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGG GCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGG UGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGC UGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAA GGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGU GUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAG GCGCAGGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCCG UGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUCCAUAU GUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGG CGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUAC AAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGG AGUGGCUGUACGUGCCAUCGACCCACCCUGCCA GCCAUGCAGGCGUGUACAGCACCCUGCCUGUACCAC CCCAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACA GCGGCUGCACCUUUAACAGUCCCCACCUGGCCCA GCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGA GCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGC AUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCC UGCACGACGGCGGAACCACCUGAAGUUCGUGG ACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUU CGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGU GGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUC GUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCUCCU ACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCA AGGAGAUACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCC CCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
75	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGCACCGUGAACAAAGCCCGUGGUGGGCGUC CUGAUGGGCUUCGGCAUCAUACCGGCACCCUGC GGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCG GUACGACGAUUCCACAUCGACGAGGACAAGCU GGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCAC AGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGG GGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAAC AGCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACG GCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGU GUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUG AUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGA UCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACG UGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCAGGG CCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAA CCACCCCUUACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGG AUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGC UUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCG CUCCCGCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACAC CACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGA CUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCC GAGAUACAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAG GCCGACCAGCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA CCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGA GAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGAC CGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAA CAUGC GGGG CAGCGACGGCACCAGCACCUACGCC ACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAG ACCCGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCCAGC CCCGGGGCGCCGAAUUCUAUUGUGGAACUACC ACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCA GCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGA UCCACGA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GGCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUAC GUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGC UGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCAACGCCCC CCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACCUGGCCAGCGGGUGGCCA GCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAA CUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUG GAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCG GAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAG CCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUU CAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUG GUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCG AGGAGCGGGGCUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCC CCCAGCCACCACUAAGCCAAGGAGAUCACCCCC GUGAACCCCGGCACCAGCCCCUGUUGCGGUACG CCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCU GCUGUGCCUGGUGAUUCUCCUGAUCUGCACCGCC AAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGAC AAG
76	Гликопротеин E, 524 аминокислоты Сигнальная последовательность: gLuc (подчеркнуто)	AUGGGCGUGAAGGUGCUGUUCGCCCUGAUCUGC AUCGCCGUGGCCGAGGCCAAGCGGAUCACCAACC CCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUU UCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACA GCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGC CGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAG CCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUC UGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAG AACGCCACGAGACCACGGCGUGUACAACCAGG GCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGC AGCCACCCAGAUGAGCGCCAGGAGGACCUGGG CGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUG AACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p>GACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGC GACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGA UCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCA CCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGC CUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCC AGCACAUUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCA GGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAA CACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUA CCGGUUCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCC UGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGAC GAGCUGGAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCG GCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGU ACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCA GCGACGGCACCCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGU GACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCC CACCCCGCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCC GAAUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUG UUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGC ACCUGCAGUACAAGAUCACGAGGCCCCCUUCGA CCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGAC CCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCU GCCUGUACCACCCCAACGCCCCCAGUGCCUGAG CCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCC CACCUGGCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACC AGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUA CUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUC GGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGA AGUUCGUGGACACCCCGAGAGCCUGAGCGGCCU GUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGU GGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGU GGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGG CUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACC</p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		ACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCCGUGAACCCCG GCACCAGCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGAC CGGCGGCCUGGCC
77	Гликопротеин E, 524 аминокислоты	AUGGGCCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCG UGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGG ACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCU ACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGU GAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGA CCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCCGAACGAC UACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACC ACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACA GCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGA GCGCCAGGAGGACCUGGGGCGACGACACCGGCAU CCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGG CACAAGAU CGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUAC GGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUG GAGGAAAACCACCCUUCACCCUGCGGGCCCCCA UCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAA CCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGG CGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUUCGCCUG AAGCACACCACCUUCUUCAGGACGUGGUGGUU GACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGC AAGAAAGAGGCCGACCAGCCUGGAUCGUGGUG AACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGG UGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGU ACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGG CGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCGCCGUG ACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUCCAUAUGU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCG ACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAA GAUCCACGAGGCCCCUUCGACCUGCUCUGGAG UGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGC CCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCC CAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGC GGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGC GGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGC ACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAU CAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUG CACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGAC ACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCG UGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGG CCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGU GAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCU GAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC
79	Гликопротеин E, 524 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUC CUGAUGGGCUUCGGCAUCAUACCGGCACCCUGC GGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCG GUACGACGAUUCCACAUCGACGAGGACAAGCU GGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCAC AGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGG GGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAAC AGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACG GCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGU GUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUG AUCCCCACCCUGAACGGCGACACCGGCACAAGA UCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACG

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		UGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGG CCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAA CCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGG AUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGC UUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCG CUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACAC CACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGA CUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCC GAGAUACAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAG GCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA CCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGA GAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGAC CGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAA CAUGC GGGGCAGCGACGGCACCCAGCACCUACGCC ACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAG ACCCGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCCAGC CCCGGGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACC ACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCA GCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGA UCCACGA GGCCCCUUCGACCUGCUCUCCUGGAGUGGCUGUAC GUGCCAUCGACCCACCUGCCAGCCAU GCGGC UGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCAACGCCCC CCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCA GCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAA CUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUG GAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCG GAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAG CCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUU CAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUG GUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCG AGGAGCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCC CCCAGCCACCACUAAGCCAAGGAGAUACCCCC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GUGAACCCCGGCACCAGCCCCUGUUGCGGUACG CCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCU GCUGUGCCUGGUGAUCUUCUGAUCUGCACCGCC AAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGAC AAG
80	Гликопротеин E, 623 аминокислоты, двойная мутация Y569A/Y582G	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUC CUGAUGGGCUUCGGCAUCAUACCGGCACCCUGC GGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCG GUACGACGAUUCCACAUCGACGAGGACAAGCU GGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCAC AGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGG GCGGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAAC AGCCCUACAUCUGGCCCGGAACGACUACGACG GCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGU GUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCACCCAGAUGAGCGCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUG AUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGA UCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACG UGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCAGGG CCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAA CCACCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGG AUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGC UUCCUGCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCG CUCCCGCCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACAC CACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGA CUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCC GAGAUACGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAG GCCGACCAGCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA CCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCUGA GAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGAC CGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAA

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CAUGC GGGGCAGCGACGGCACCAGCACC UACGCC ACCUUC CUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAG ACCCGGAACCCACCCCGCCGUGACCCCCAGC CCCGGGGCGCCGAAUCCAUAUGUGGAACUACC ACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCA GCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGA UCCACGA GGCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUAC GUGCCCAUCGACCCACCUGCCAGCCAU GCGGC UGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCC CCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCA GCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAA CUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUG GAGCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCG GAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAG CCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUU CAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUG GUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAU CG AGGAGCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCC CCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUACCCCC GUGAACCCCGGCACCAGCCCCUGAUCCGGUACG CCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCU GUUGUGCCUGGUGAUCUUCUGAUUCUGCACCGC CAAGCGGAUGC GGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGA CAAGAGCCCCUACAACCAGAGCAUGUACGGCGCC GGCCUGCCCGUGGACGACUUCGAGGACAGCGAG AGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCC AUCGGCGGGAGCCACGGCGGCAGCUCUACACCG UGUACAUCGACAAGACCCGG
81	Гликопротеин E, 573 аминокислоты,	AUGGUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAAUC AGCGGCGGAGGAGGGAGUGGCACCGUGAACAAAG CCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
	мутация Y569A	AUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGC GGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACA UCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGU ACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAA GGCCUACGACCACAACAGCCCUACAUCUGGCCC CGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC ACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGG GCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCAC CCAGAUGAGCGCCAGGAGGACCUGGGCGACGA CACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGC GACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAG CGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUG AACCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGG UGAGCGUGGAGGAAAACCACCCUUCACCCUGCG GGCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUAC ACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCU GCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAU CUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUG GUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAG GAGGACCAGCUGGCCGAGAUACGCUACCGGUUC CAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCUGGAUC GUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUG GAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGC UGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGG GCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACG GCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUG GAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCC GCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUC AUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCG UGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCA GUACAAGAUCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUC CUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCACCU

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		<p>GCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUA CCACCCCAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUG AACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGG CCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUG CGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUG GGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGA UCCUGCACGACGGCGGCACCACCCUGAAGUUCGU GGACACCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUG UUCGUGGUGUACUUC AACGGCCACGUGGAGGCC GUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACU UCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCUC CUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCC CAAGGAGAUACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGC CCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGGCGGCC UGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCU UCCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGA AGGCCGCCCGGGUGGACAAG</p>
82	<p>Гликопротеин E, 623 аминокислоты, мутация Y569A</p>	<p>AUGGUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAAUC AGCGGCGGAGGAGGGAGUGGCACCGUGAACAAG CCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUC AUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGC GGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACA UCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGU ACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAA GGCCUACGACCACAACAGCCCUACAUCUGGCCC CGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC ACGAGCACACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGG GCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCAC CCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGA CACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGC GACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAG</p>

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUG AACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGG UGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCG GGCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUAC ACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCU GCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCAGCACAU CUGCCUGAAGCACACCACCUUCCAGGACGUG GUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACAACCAAG GAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUC CAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCUGGAUC GUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUG GAGCUGGACCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGC UGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGG GCGUGUACAUCUGGAACAUGCAGGGGCAGCGACG GCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUG GAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCACCCCC GCCGUGACCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUC AUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCG UGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCA GUACAAGAUCACGAGGCCCCCUUCGACCUUGCUC CUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCACCU GCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUA CCACCCCAACGCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUG AACAGCGGCUGCACCUUUAACAGUCCCACCUGG CCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUG CGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUG GGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGA UCCUGCACGACGGCGGCACCACCUGAAGUUCGU GGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUG UUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCC GUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACU UCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCUC CUACCGCCGGCCAGCCCCAGCCACCACUAAGCC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		CAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGC CCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCC UGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCU UCCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGA AGGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCA GAGCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGAC UUCGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAG GAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGAAGCCACGGC GGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCC GG
83	Гликопротеин E, 573 аминокислоты, мутация Y569A	AUGGGCACCGUGAACAAAGCCCGUGGUGGGCGUC CUGAUGGGCUUCGGCAUCAUACCAGGCACCCUGC GGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCG GUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCU GGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCAC AGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGG GGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAAC AGCCCUACAUCUGGCCCCCGGAACGACUACGACG GCUUCCUGGAGAACGCCACGAGCACCACGGCGU GUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCACCCAGAUGAGCGCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUG AUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGA UCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACG UGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGG CCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAA CCACCCCUACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGG AUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGC UUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCG CUCCCGCAUCCAGCACAUUCUGCCUGAAGCACAC CACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGA CUGCGCCGAGAACAACCAAGGAGGACCAGCUGGCC

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
		GAGAU CAGCU ACCGGU UCCAGGG CAAGAA GAG GCCG ACCAGCCC UGGAUC GUGGUG AACACC AGCA CCCUG UUCGAC GAGCUG GAGCUG GACCCCCC UGA GAUC GAGCCC GGGCUG GCUGA AGGUGC UGCGGAC CGAGA AGCAGU ACCUGGG CGUGU ACAUCUGGAA CAUGC GGGGCAGC GACGGC ACCAGC ACCUACGCC ACCU UCCUGGUG ACCUGGA AGGGCG ACGAGAAG ACCCG GAACCC CACCCCG CCGUG ACCCCC CAGC CCCGG GGGCGCC GAAU UCCAUAUGUGG AACUACC ACAGC CACGUGU UCAGCG UGGGGC GACACCUUCA GCCUG GCCAUGC ACCUGC AGUACA AGAUCCACGA GGCCCC CUUCG ACCUGC UCCUGG AGUGGCUGUAC GUGCC CAUCG ACCCC ACCUGC CAGCCC AUGCGGC UGUAC AGCACC UGCCUGU ACCACCCA ACGCCCC CCAGU GCCUG AGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACC AGUCCCC ACCUGGCC CAGCGGGUGGCCA GCACC GUGUACC AGAACUGCGAGCACGCCGACAA CUAC ACCGCCU ACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUG GAGCC AGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCG GAACC ACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCGAGAG CCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUU CAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUG GUCAGC ACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCG AGGAGCGGGGCUUUCUCCUACCGCCGGCCAGCC CCCAGCCACCACUAAGCCAAGGAGAUCACCCCC GUGAACCCCGGCACCAGCCCCUGUUGCGGUACG CCGCCUGGACCGGCCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCU GCUGUGCCUGGUGAUCUCCUGAUCUGCACCGCC AAGCGGAUGC GGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGAC AAG

В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой секретируемый белок. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой неструктурный белок. В некоторых вариантах

осуществления полипептидный иммуноген VZV представляет собой немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления немедленно-ранний белок VZV представляет собой полипептид IE63. Полипептид IE63 VZV может содержать следующую аминокислотную последовательность:

MFCTSPATRGDSSESSEKPGASVDVNGKMEYGSAPGPLNGRDTSRGPGAFCTPGWEIHPAR
LVEDINRVFLCIAQSSGRVTRDSRRLRRICLDFYLMGRTRQRPTLACWEELLQLQPTQTQ
CLRATLMEVSHRPPRGEDGFIEAPNVPLHRSALECDVSDDGGEDDSDDDGSTPSDVIEFR
DSDAESSDGEDFIVEESEEESTDSCEPDGVPGDCYRDGDGCNTPSPKRPQRAIERYAGAE
TAEYTAAKALTALGEGGVVDWKRRRHEAPRRHDIPPHGV (SEQ ID NO: 84).

В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV может характеризоваться по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 84. Полипептид IE63 VZV может содержать сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV может кодироваться следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

ATGTTCTGCACCAGCCCCGCCACCCGGGGCGACAGCTCCGAGAGCAAGCCCCGGCGC
CAGCGTGGACGTGAACGGCAAGATGGAGTACGGCAGCGCCCCGGCCCCCTGAACG
GCCGGGATACCAGTCGGGGACCCGGAGCCTTCTGCACCCCCGGCTGGGAGATCCAC
CCCGCCCCGGCTGGTGGAGGACATCAACCGGGTGTTCCTGTGCATCGCCCAGAGCAG
CGGCCGGGTGACCCGGGACAGCCGGAGACTGCGGCGGATCTGCCTGGACTTCTACC
TGATGGGCCGGACCCGGCAGCGGCCACCCTGGCCTGCTGGGAGGAACTGCTCCAG
CTGCAGCCCACCCAGACCCAGTGCCTGCGGGCCACCCTGATGGAGGTGAGCCACCG
GCCCCCTCGGGGCGAGGACGGCTTCATCGAGGCCCCCAACGTGCCCTGCACCGGA
GCGCCCTGGAGTGCGACGTGAGCGACGACGGCGGAGAGGACGACAGCGACGACGA
CGGCAGCACCCCCAGCGACGTGATCGAGTTCGGGACAGCGACGCCGAGAGCTCTG
ACGGCGAGGACTTCATCGTCGAGGAAGAGAGCGAGGAGAGCACCGACAGCTGCGA
GCCCCGACGGCGTGCCCGGCGACTGCTACCGGGACGGCGACGGCTGCAACACCCCCA
GCCCCAAGCGGCCCCAGCGGGCCATCGAGCGGTACGCCGGCGCCGAAACAGCCGAG
TACACCGCCGCTAAGGCCCTGACCGCCCTGGGCGAGGGCGGCGTGGACTGGAAGCG
GAGGCGGCACGAGGCCCCCCGGCGGCACGACATTCCTCCTCCACACGGCGTG (SEQ
ID NO: 85).

В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID

NO: 85. В некоторых вариантах осуществления полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV выбран из иммуногена VZV, представленного в WO2000/043527, который включен в данный документ во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV выбран из иммуногена VZV, представленного в WO2006094756, который включен в данный документ во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV выбран из иммуногена VZV, описанного в WO2017070601, который включен в данный документ во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет по меньшей мере 51% (например, по меньшей мере 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% или 60%). В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет не более 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, или 59%, или 60%. В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет от 51% до 60%, от 52% до 60%, от 53% до 60%, от 54% до 60%, от 55% до 60%, от 52% до 58%, от 53% до 58%.

В некоторых вариантах осуществления содержание уридина (для РНК) или содержание тимидина (для ДНК) в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет более 10% (например, более 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% или 25%). В некоторых вариантах осуществления содержание уридина (для РНК) или содержание тимидина (для ДНК) в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет не более 30% (например, не более 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21% или 20%). В некоторых вариантах осуществления содержание уридина (для РНК) или содержание тимидина (для ДНК) в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, составляет от 20% до 28%, от 21% до 26%, от 10% до 24%, от 15% до 24%, от 20% до 24%, от 21% до 24%, от 22% до 24%, от 23% до 24%, от 10% до 23%, от 15% до 23%, от 20% до 23%, от 21% до 23% или от 22% до 23%.

Содержание GC в экспрессионной последовательности, кодирующей иммуноген VZV, относится к содержанию GC в экспрессионной последовательности, которая кодирует исключительно иммуноген VZV без каких-либо других кодирующих областей, которые кодируют пептиды, отличные от иммуногена VZV. Аналогичным образом, содержание

уридина или тимидина в экспрессионной последовательности, кодирующей иммуноген VZV, относится к содержанию уридина в экспрессионной последовательности, которая кодирует исключительно иммуноген VZV без каких-либо других кодирующих областей, которые кодируют пептиды, отличные от иммуногена VZV. В некоторых вариантах осуществления при расчете содержания GC или содержания уридина (или тимидина) в экспрессионной последовательности, кодирующей иммуноген VZV, учитывается только непрерывная последовательность нуклеиновой кислоты, которая начинается в направлении от 5' к 3' от первого нуклеотида старт-кодона открытой рамки считывания, которая кодирует иммуноген VZV, до последнего нуклеотида стоп-кодона той же открытой рамки считывания. В других вариантах осуществления при расчете содержания GC или содержания уридина (или тимидина) в экспрессионной последовательности, кодирующей иммуноген VZV, учитывается только непрерывная последовательность нуклеиновой кислоты, которая начинается в направлении от 5' к 3' от первого нуклеотида кодона, который кодирует N-концевой аминокислотный остаток иммуногена VZV, до последнего нуклеотида кодона, который кодирует C-концевой аминокислотный остаток иммуногена VZV.

Кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению может кодировать один или множество иммуногенов, где по меньшей мере один иммуноген представляет собой иммуноген VZV. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует первый иммуноген VZV и второй иммуноген VZV (например, каждый иммуноген VZV, выбранный из иммуногена VZV, описанного в данном документе). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует первый иммуноген VZV и второй иммуноген (например, второй иммуноген, выбранный из другого вируса).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует от 1 до 100, от 1 до 50, от 1 до 20, от 1 до 10, от 1 до 5, от 2 до 100, от 2 до 50, от 2 до 20, от 2 до 10, от 2 до 5 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует 2 или больше иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует 3 или больше иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует 4 или больше иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит или кодирует 5 или больше иммуногенов.

вариантах осуществления два или больше гликопротеинов VZV представляют собой gE, gI и gM или их фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует два или больше иммуногенов VZV, где каждый иммуноген VZV представляет собой gE VZV или его вариант или фрагмент (например, любой из варианта gE VZV или его вариантов или фрагментов, раскрытых в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый иммуноген получен из вируса герпеса (CMV, EBV или VZV). Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген из каждого из следующих вирусов герпеса: CMV, EBV или VZV. Полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый иммуноген происходит из вируса опоясывающего лишая или вируса лихорадки Западного Нила. Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген каждого из вирусов опоясывающего лишая и вируса лихорадки Западного Нила.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует множество иммуногенов, и множество иммуногенов характеризуются по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности. В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов также характеризуются менее чем 100% идентичностью последовательности. Это может указывать на иммуногены, связанные друг с другом генетическим дрейфом, таким образом, композиция на основе одного кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенная композиция могут быть способны индуцировать иммунный ответ на мишень, которая существует в популяции в различных мутационных состояниях, или может индуцировать иммунный ответ на несколько мишеней, содержащих один и тот же иммуноген, если иммуноген связан с генетическим дрейфом. Например, иммуногены могут быть связаны друг с другом генетическим дрейфом вируса-мишени (например, VZV).

Иммуноген VZV получен, например, из вируса, например, вирусный поверхностный белок, вирусный мембранный белок, вирусный белок оболочки, вирусный капсидный белок, вирусный нуклеокапсидный белок, вирусный шиповидный белок, вирусный белок проникновения, вирусный белок слияния с мембраной, вирусный структурный белок, вирусный неструктурный белок, вирусный регуляторный белок, вирусный вспомогательный белок, секретируемый вирусный белок, белок, представляющий собой вирусную полимеразу, вирусная ДНК-полимераза, вирусная РНК-полимераза, вирусная протеаза, вирусный гликопротеин, вирусный фузоген, вирусный спиральный капсидный

белок, вирусный икосаэдрический капсидный белок, вирусный матриксный белок, вирусная репликаза, вирусный транскрипционный фактор или вирусный фермент.

Иммуноген VZV по настоящему изобретению может предусматривать последовательность дикого типа. При описании иммуногена термин "дикий тип" относится к последовательности (например, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности), которая встречается в природе и кодируется геномом (например, вирусным геномом). Виды (например, виды микроорганизмов) могут иметь одну последовательность дикого типа или две или больше последовательностей дикого типа (например, с одной канонической последовательностью дикого типа, присутствующей в эталонном геноме микроорганизма, и присутствующими дополнительными вариантными последовательностями дикого типа, которые возникли в результате мутаций).

При описании иммуногена VZV термины "производное", "происходящий из" или "вариант" относятся к последовательности (например, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности), которая отличается от последовательности дикого типа одной или несколькими нуклеиновыми кислотами или аминокислотами, например, содержащей одну или несколько вставок, делеций и/или замен нуклеиновой кислоты или аминокислоты относительно последовательности дикого типа.

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

В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV содержит одну или несколько аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, которые влияют на структуру кодируемого белка. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит одну или несколько аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, которые влияют на функцию кодируемого белка. В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит одну или несколько аминокислотных вставок, делеций, замен или их комбинацию, которые влияют на экспрессию или процессинг кодируемого белка.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген содержит одну или несколько вставок, делеций, замен или их комбинацию, которые влияют на структуру кодируемой иммуногенной нуклеиновой кислоты.

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

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

аминокислоты могут включать Glu (E) и Asp (D). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной основной аминокислоты на другую основную аминокислоту. Основные аминокислоты могут включать His (H), Arg (R) и Lys (K). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной полярной аминокислоты на другую полярную аминокислоту. Полярные аминокислоты могут включать Asn (N), Gln (Q), Ser (S) и Thr (T). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной неполярной аминокислоты на другую неполярную аминокислоту. Неполярные аминокислоты могут включать Leu (L), Val(V), Ile (I), Met (M), Gly (G) и Ala (A). Консервативное изменение аминокислоты может представлять собой изменение аминокислоты с одной ароматической аминокислоты на другую ароматическую аминокислоту. Ароматические аминокислоты могут включать Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W). Консервативной заменой аминокислоты может являться замена одной алифатической аминокислоты на другую алифатическую аминокислоту. Алифатические аминокислоты могут включать Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I). В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена представляет собой изменение аминокислоты с одной аминокислоты на другую аминокислоту в пределах одной из следующих групп: группа I: Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; группа II: Cys, Ser, Tyr, Thr; группа III: Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; группа IV: Lys, Arg, His; группа V: Phe, Tyr, Trp, His; и группа VI: Asp, Glu.

В некоторых вариантах осуществления вариант иммуногена по настоящему изобретению содержит не более 1, не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не больше 10, не более 11, не более 12, не более 13, не более 14, не более 15, не более 16, не более 17, не более 18, не более 19, не более 20, не более 25, не более 30, не более 35, не более 40, не более 45 или не более 50 аминокислотных замен относительно раскрытой в данном документе последовательности (например, последовательности дикого типа). В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению содержит 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 10-15, 15-20 или 20-25 аминокислотных замен относительно последовательности, раскрытой в данном документе (например, последовательности дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления вариант иммуногена по настоящему изобретению содержит не более 1, не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более

6, не более 7, не более 8, не более 9, не больше 10, не более 11, не более 12, не более 13, не более 14, не более 15, не более 16, не более 17, не более 18, не более 19, не более 20, не более 25, не более 30, не более 35, не более 40, не более 45 или не более 50 аминокислотных делеций относительно раскрытой в данном документе последовательности (например, последовательности дикого типа). В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению содержит 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 10-15, 15-20 или 20-25 аминокислотных делеций относительно последовательности, раскрытой в данном документе (например, последовательности дикого типа).

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

В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше иммуногенов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает эпитоп. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше эпитопов, раскрытых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген VZV имеет длину менее приблизительно 40000 аминокислот, менее приблизительно 35000 аминокислот, менее приблизительно 30000 аминокислот, менее приблизительно 25000 аминокислот, менее приблизительно 20000 аминокислот, менее приблизительно 15000 аминокислот, менее приблизительно 10000 аминокислот, менее приблизительно 9000 аминокислот, менее приблизительно 8000 аминокислот, менее приблизительно 7000 аминокислот, менее приблизительно 6000 аминокислот, менее приблизительно 5000 аминокислот, менее приблизительно 4000 аминокислот, менее приблизительно 3000 аминокислот, менее приблизительно 2500 аминокислот, менее приблизительно 2000 аминокислот, менее приблизительно 1500 аминокислот, менее приблизительно 1000 аминокислот, менее приблизительно 900 аминокислот, менее приблизительно 800 аминокислот, менее приблизительно 700 аминокислот, менее приблизительно 600 аминокислот, менее

приблизительно 500 аминокислот, менее приблизительно 400 аминокислот, менее приблизительно 300 аминокислот, менее приблизительно 250 аминокислот, менее приблизительно 200 аминокислот, менее приблизительно 150 аминокислот, менее приблизительно 140 аминокислот, менее приблизительно 130 аминокислот, менее приблизительно 120 аминокислот, менее приблизительно 110 аминокислот, менее приблизительно 100 аминокислот, менее приблизительно 90 аминокислот, менее приблизительно 80 аминокислот, менее приблизительно 70 аминокислот, менее приблизительно 60 аминокислот, менее приблизительно 50 аминокислот, менее приблизительно 40 аминокислот, менее приблизительно 30 аминокислот, менее приблизительно 25 аминокислот, менее приблизительно 20 аминокислот кислот, менее приблизительно 15 аминокислот, менее приблизительно 10 аминокислот, менее приблизительно 5 аминокислот, при этом длина, предусматривающая любое количество аминокислот, находящееся между указанными значениями или являющееся меньшим, может являться пригодной.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько иммуногенных последовательностей VZV и характеризуется конфигурацией, обеспечивающей постоянную экспрессию в клетке субъекта *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет такую конфигурацию, что уровень экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей в клетке в более поздний момент времени равен уровню экспрессии в более ранний момент времени или превышает его. В таких вариантах осуществления экспрессия одной или нескольких иммуногенных последовательностей может поддерживаться на относительно стабильном уровне либо может повышаться с течением времени. Экспрессия иммуногенных последовательностей может быть относительно стабильной в течение продолжительного периода времени. Экспрессия иммуногенных последовательностей может быть относительно стабильной кратковременно или только в течение ограниченного периода времени, например в течение не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней.

В некоторых вариантах осуществления с кольцевого полирибонуклеотида экспрессируется один или несколько иммуногенов у субъекта, например, временно или в течение длительного периода времени. В определенных вариантах осуществления экспрессия иммуногенов сохраняется в течение промежутка времени, составляющего от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней, или в течение по меньшей мере приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14

дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 60 дней или дольше или любого периода времени в промежутке между этими значениями. В определенных вариантах осуществления экспрессия иммуногенов сохраняется в течение промежутка времени, составляющего от не более чем приблизительно 30 минут до приблизительно 7 дней, или не более чем приблизительно 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 часа, 22 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 60 дней или любого периода времени в промежутке между этими значениями.

Экспрессия иммуногена предусматривает трансляцию по меньшей мере одной области кольцевого полирибонуклеотида, представленного в данном документе. Например, кольцевой полирибонуклеотид может быть транслирован у субъекта с образованием полипептидов, которые предусматривают один или несколько иммуногенов по настоящему изобретению, тем самым стимулируя выработку адаптивного иммунного ответа (например, ответа с образованием антител и/или Т-клеточного ответа) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению транслируется с образованием одного или нескольких иммуногенов у субъекта, представляющего собой человека или животное, тем самым стимулируя выработку адаптивного иммунного ответа (например, ответа с образованием антител и/или Т-клеточного ответа) у субъекта, представляющего собой человека или животное.

В некоторых вариантах осуществления способы обеспечения экспрессии иммуногена включают модификацию, сворачивание или другую посттрансляционную модификацию продукта трансляции. В некоторых вариантах осуществления способы обеспечения экспрессии иммуногена включают посттрансляционную модификацию *in vivo*, например, посредством клеточного механизма.

Кольцевые полирибонуклеотиды

Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут содержать любой один или несколько элементов, описанных в данном документе, и экспрессионную последовательность, кодирующую иммуноген VZV. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает любой признак или любую комбинацию признаков, описанных в международной публикации заявки на

патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

В некоторых вариантах осуществления длина кольцевого полирибонуклеотида составляет от 500 нуклеотидов до 20000 нуклеотидов, от 1000 до 20000 нуклеотидов, от 2000 до 20000 нуклеотидов или от 5000 до 20000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина кольцевого полирибонуклеотида составляет от 500 нуклеотидов до 10000 нуклеотидов, от 1000 до 10000 нуклеотидов, от 2000 до 10000 нуклеотидов или от 5000 до 10000 нуклеотидов.

Сайты внутренней посадки рибосомы

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит один или несколько элементов сайта внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES функционально связан с одной или несколькими экспрессионными последовательностями (например, каждый IRES функционально связан с одной или несколькими экспрессионными последовательностями, где каждая экспрессионная последовательность необязательно кодирует иммуноген, такой как иммуноген VZV). В вариантах осуществления IRES расположен между гетерологичным промотором и 5'-концом кодирующей

последовательности (например, кодирующей последовательности, кодирующей иммуноген VZV).

Элемент IRES, подходящий для включения в полирибонуклеотид, содержит последовательность РНК, способную рекрутировать эукариотическую рибосому. В некоторых вариантах осуществления длина элемента IRES составляет по меньшей мере приблизительно 5 нт, по меньшей мере приблизительно 8 нт, по меньшей мере приблизительно 9 нт, по меньшей мере приблизительно 10 нт, по меньшей мере приблизительно 15 нт, по меньшей мере приблизительно 20 нт, по меньшей мере приблизительно 25 нт, по меньшей мере приблизительно 30 нт, по меньшей мере приблизительно 40 нт, по меньшей мере приблизительно 50 нт, по меньшей мере приблизительно 100 нт, по меньшей мере приблизительно 200 нт, по меньшей мере приблизительно 250 нт, по меньшей мере приблизительно 350 нт или по меньшей мере приблизительно 500 нт.

В некоторых вариантах осуществления элемент IRES получен из ДНК организма, включающего без ограничения вирус, млекопитающее и дрозофилу. Такая вирусная ДНК может быть получена без ограничения из комплементарной ДНК (сDNA) пикорнавируса, сDNA вируса энцефаломиокардита (EMCV) и сDNA полиовируса. В одном варианте осуществления ДНК дрозофилы, из которой получен элемент IRES, включает без ограничения ген *Antennapedia* из *Drosophila melanogaster*.

В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES представляет собой последовательность IRES вируса синдрома Таура, вируса триатомовых, вируса энцефаломиелита Тейлера, вируса обезьян 40, вируса 1 *Solenopsis invicta*, вируса *Rhopalosiphum padi*, вируса ретикулоэндотелиоза, вируса 1 полиомиелита человека, кишечного вируса *Plautia stali*, кашмирского вируса пчел, риновируса человека 2 (HRV-2), вируса 1 *Homalodisca coagulata*, вируса иммунодефицита человека типа 1, вируса 1 *Homalodisca coagulata*, вируса Р Himetobi, вируса гепатита С, вируса гепатита А, вируса гепатита GB, вируса ящура, энтеровируса 71 человека, вируса ринита лошадей, пикорнаподобного вируса *Ectropis obliqua*, вируса энцефаломиокардита (EMCV), вируса С дрозофилы, тобамовируса крестоцветных, вируса паралича сверчка, вируса 1 вирусной диареи крупного рогатого скота, вируса черного маточника, вируса летального паралича тли, вируса энцефаломиелита птиц (AEV), вируса острого паралича пчел, вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, вируса классической чумы свиней, FGF2 человека, SFTPА1 человека, AML1/RUNX1 человека, вируса антеннопедии дрозофил, AQP4 человека, AT1R человека, BAG-1 человека, BCL2 человека, BiP человека, с-IAP1 человека, с-тус человека, eIF4G человека, NDST4L мышей, LEF1 человека, HIF1-

В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES представляет собой IRES энтеровируса 71 (EV17). В некоторых вариантах осуществления концевой остаток гуанозина последовательности IRES EV17 модифицирован с получением остатка цитозина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный IRES EV71 может содержать следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT
 TTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTT
 CTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT
 GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTG
 TAGCGACCSTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGC
 CAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGT
 TGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAA
 GGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTC
 GGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAA
 CCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATA (SEQ ID NO: 114).

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один IRES, фланкирующий по меньшей мере одну экспрессионную последовательность (например, 2, 3, 4, 5 или больше). В некоторых вариантах осуществления IRES фланкирует по меньшей мере одну экспрессионную последовательность (например, 2, 3, 4, 5 или больше) с обеих сторон. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит одну или несколько последовательностей IRES с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению образующегося(-ихся) в результате пептида(-ов) и или полипептида(-ов). Например, полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может содержать первый IRES, функционально связанный с первой экспрессионной последовательностью (например, кодирующей первый иммуноген, такой как первый иммуноген VZV), и второй IRES, функционально связанный со второй экспрессионной последовательностью (например, кодирующей второй иммуноген, такой как второй иммуноген VZV).

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит IRES (например, IRES, функционально связанный с кодирующей областью). Например, полирибонуклеотид может содержать любой IRES, как описано в Chen et al. *Mol. Cell* 81(20):4300-4318, 2021; Jopling et al. *Oncogene* 20:2664-2670, 2001; Baranick et al. *PNAS* 105(12):4733-4738, 2008; Lang et al. *Molecular Biology of the Cell* 13(5):1792-1801, 2002; Dorokhov et al. *PNAS* 99(8):5301-5306, 2002; Wang et al. *Nucleic Acids Research* 33(7):2248-2258, 2005; и Petz et al. *Nucleic Acids Research* 35(8):2473-2482,

2007, и Chen et al. SCIENCE 268:415-417, 1995; Fan et al. NATURE COMMUNICATION 13(1): 3751-3765, 2022 и международной публикации № WO2021/263124, каждая из которых настоящим включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Сигнальные последовательности

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные иммуногены, которые могут экспрессироваться с кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, включают секретируемый белок, например, белок (например, иммуноген), который в естественных условиях содержит сигнальную последовательность, или белок, который обычно не кодирует сигнальную последовательность, но модифицирован таким образом, что содержит одну сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления иммуноген(-ы), кодируемый(-е) кольцевым полирибонуклеотидом, содержит(-ат) сигнал секреции. Например, сигнал секреции может представлять собой кодируемый в естественных условиях сигнал секреции для секретируемого белка. В другом примере, сигнал секреции может представлять собой модифицированный сигнал секреции для секретируемого белка. В других вариантах осуществления иммуноген(-ы), кодируемый(-е) кольцевым полирибонуклеотидом, не содержит(-ат) сигнал секреции.

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность выбрана из SecSP38 (MWRLWWLLLLLLLLLWPMVWA; SEQ ID NO: 1); SecD4 (MWWLLLLLLLLLWPMVWA; SEQ ID NO: 2), gLuc (MGVKVLFALICIAVAEAK; SEQ ID NO: 3); INHC1 (MASRLTLLTLLLLLAGDRASS; SEQ ID NO: 4); Epo (MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG; SEQ ID NO: 5); и IL-2 (MYRMQLLSICIALSLALVTNS; SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует несколько копий одного и того же иммуногена (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна копия иммуногена содержит сигнальную последовательность, и по меньшей мере одна копия иммуногена не содержит сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует множество иммуногенов (например, множество отличающихся иммуногенов или множество иммуногенов, характеризующихся менее чем 100% идентичностью последовательностей), где по меньшей мере один из множества иммуногенов содержит сигнальную последовательность, и по меньшей мере одна копия из множества иммуногенов не содержит сигнальную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность дикого типа, которая присутствует на N-конце

соответствующего иммуногена дикого типа, например, при эндогенной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность является гетерологичной иммуногену, например, отсутствует, если иммуноген дикого типа экспрессируется эндогенно. Полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген, может быть модифицирована для обеспечения удаления нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность дикого типа, и/или добавления последовательности, кодирующей гетерологичную сигнальную последовательность.

Кольцевой полирибонуклеотид может дополнительно предусматривать один или несколько адъювантов, каждый с сигнальной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует по меньшей мере один адъювант и по меньшей мере один иммуноген. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген не предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант не предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления ни кодируемый адъювант, ни кодируемый иммуноген не предусматривают сигнальную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность дикого типа, которая присутствует на N-конце соответствующего адъюванта дикого типа, например, при эндогенной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность является гетерологичной адъюванту, например, отсутствует, если адъювант дикого типа экспрессируется эндогенно. Полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая адъювант, может быть модифицирована для обеспечения удаления нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность дикого типа, и/или добавления последовательности, кодирующей гетерологичную сигнальную последовательность.

Полипептид, кодируемый полирибонуклеотидом (например, иммуноген или адъювант, кодируемый полирибонуклеотидом), может содержать сигнальную последовательность, которая направляет иммуноген или адъювант по секреторному пути. В некоторых

вариантах осуществления сигнальная последовательность может направлять иммуноген или адъювант для постоянного расположения в определенные органеллы (например, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи или эндосомы). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность направляет иммуноген или адъювант на секрецию из клетки. Для секретируемых белков сигнальная последовательность может быть расщеплена после секреции, в результате чего образуется зрелый белок. В других вариантах осуществления сигнальная последовательность может быть встроена в мембрану клетки или определенных органелл, создавая трансмембранный сегмент, который закрепляет белок в мембране клетки, эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи. В определенных вариантах осуществления сигнальная последовательность трансмембранного белка представляет собой короткую последовательность на N-конце полипептида. В других вариантах осуществления первый трансмембранный домен действует как первая сигнальная последовательность, которая направляет белок к мембране.

В некоторых вариантах осуществления адъювант, кодируемый полирибонуклеотидом, содержит сигнальную последовательность секреции. В некоторых вариантах осуществления иммуноген, кодируемый полирибонуклеотидом, содержит либо сигнальную последовательность секреции, либо сигнальную последовательность вставки в трансмембранном пространстве, либо не содержит сигнальную последовательность.

Регуляторные элементы

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько регуляторных элементов, например, одну или несколько последовательностей, которые модифицируют экспрессию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде.

Регуляторный элемент может предусматривать последовательность, которая расположена рядом с экспрессионной последовательностью, кодирующей продукт экспрессии. Регуляторный элемент может быть функционально связан с расположенной рядом последовательностью. Регуляторный элемент может обеспечивать повышение количества экспрессируемого продукта по сравнению с количеством экспрессируемого продукта в отсутствие регуляторного элемента. Регуляторный элемент может применяться для повышения экспрессии одного или нескольких иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым полирибонуклеотидом. Аналогичным образом, регуляторный элемент может применяться для снижения экспрессии одного или нескольких иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может применяться для

повышения экспрессии иммуногена и/или адъюванта, и другой регуляторный элемент может применяться для снижения экспрессии другого иммуногена и/или адъюванта в одном и том же кольцевом полирибонуклеотиде. Кроме того, один регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества продукта (например, иммуногена или адъювантов), экспрессируемых с нескольких экспрессионных последовательностей, соединенных в тандем. Таким образом, один регуляторный элемент может обеспечивать усиление экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей (например, иммуногенов или адъювантов). Также может применяться несколько регуляторных элементов, например, для дифференциальной регуляции экспрессии отличающихся экспрессионных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент, представленный в данном документе, может предусматривать последовательность для избирательной трансляции. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательной трансляции" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая избирательно инициирует или активирует трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде, например, к определенным аптазимам рибопереключателю. Регуляторный элемент также может предусматривать последовательность для избирательного разрушения. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательного разрушения" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая инициирует разрушение кольцевого полирибонуклеотида или продукта экспрессии кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент является модулятором трансляции. Модулятор трансляции может модулировать трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. Модулятор трансляции может являться энхансером или супрессором трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции может функционировать в качестве регуляторного элемента.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид обеспечивает продуцирование продуктов экспрессии в стехиометрических соотношениях. Трансляция по типу "катящегося кольца" приводит к непрерывному продуцированию продуктов экспрессии в по сути эквивалентных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции, так что продукты экспрессии продуцируются в по сути эквивалентных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции

нескольких продуктов экспрессии, например, продуктов с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид обеспечивает продуцирование в значительной степени отличающихся соотношений продуктов экспрессии. Например, эффективность трансляции продуктов множественной экспрессии может характеризоваться соотношением 1:10000; 1:7000, 1:5000, 1:1000, 1:700, 1:500, 1:100, 1:50, 1:10, 1:5, 1:4, 1:3 или 1:2. В некоторых вариантах осуществления соотношение нескольких продуктов экспрессии может быть изменено с применением регуляторного элемента.

Дополнительные примеры регулирующих элементов описаны в параграфах [0154] – [0161] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Домены расщепления

Кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению может содержать домен расщепления (например, сдвигающий элемент или последовательность расщепления).

Используемый в данном документе термин "сдвигающий элемент" относится к компоненту, такому как нуклеотидная последовательность, которая индуцирует рибосомальную паузу в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент представляет собой неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность -D(V/I)ExNPGP, где x = любая аминокислота (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент может предусматривать химический компонент, такой как глицерин, линкерный компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, химическую модификацию, модифицированную нуклеиновую кислоту или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сдвигающий элемент рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент рядом с каждой экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии, например, иммуногена(-ов) и/или адьюванта(-ов). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент является частью одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей (например, иммуногена(-ов) и/или адьюванта(-ов)), и каждая из одной или нескольких

экспрессионных последовательностей отделена от следующей экспрессионной последовательности (например, иммуногена(-ов) и/или адьюванта(-ов)) посредством сдвигающего элемента в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент предупреждает образование одного полипептида (a) после двух циклов трансляции одной экспрессионной последовательности или (b) после одного или нескольких циклов трансляции двух или больше экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент представляет собой последовательность, отдельную от одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент содержит часть экспрессионной последовательности из одной или нескольких экспрессионных последовательностей.

Примеры сдвигающих элементов описаны в параграфах [0172] – [0175] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адьювантов, кодируемых кольцевым рибонуклеотидом, могут быть отделены с помощью IRES между каждым иммуногеном (например, каждый иммуноген функционально связан с отдельным IRES). Например, кольцевой полирибонуклеотид может содержать первый IRES, функционально связанный с первой экспрессионной последовательностью, и второй IRES, функционально связанный со второй экспрессионной последовательностью. IRES может быть одним и тем же IRES для всех иммуногенов. IRES может отличаться для отличающихся иммуногенов.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адьювантов может быть отделено посредством саморасщепляющегося пептида 2A. Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый иммуноген, 2A и второй иммуноген.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адьювантов может быть отделено сайтом расщепления протеазой (например, сайтом расщепления фурином). Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый иммуноген, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином) и второй иммуноген.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адьювантов может быть отделено саморасщепляющимся пептидом 2A и сайтом расщепления протеазой (например, сайтом расщепления фурином). Например, кольцевой

полирибонуклеотид может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый иммуноген, 2A, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином) и второй иммуноген. Кольцевой полирибонуклеотид может также кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый иммуноген, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином), 2A и второй иммуноген. Тандем 2A и сайт расщепления фурином может называться фурином-2A (который включает фурином-2A или 2A-фурином, расположенный в любой ориентации).

Более того, множество иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым полирибонуклеотидом, могут быть отделены как последовательностями IRES, так и последовательностями 2A. Например, IRES может находиться между одним иммуногеном и/или адъювантом и вторым иммуногеном и/или адъювантом, тогда как пептид 2A может находиться между вторым иммуногеном и/или адъювантом и третьим иммуногеном и/или адъювантом. Выбор конкретного IRES или саморасщепляющегося пептида 2A можно применять для контроля уровня экспрессии иммуногена и/или адъюванта под контролем последовательности IRES или последовательности 2A. Например, в зависимости от выбранного IRES и/или пептида 2A уровень экспрессии полипептида может быть выше или ниже.

Во избежание продуцирования непрерывного продукта экспрессии, например, иммуногена и/или адъюванта, при сохранении трансляции по типу "катящегося кольца" можно включить сдвигающий элемент для индуцирования рибосомальной паузы в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент расположен на 3'-конце по меньшей мере одной из одной или нескольких экспрессионных последовательностей. Сдвигающий элемент может иметь конфигурацию, позволяющую ему задерживать рибосому в ходе трансляции по типу "катящегося кольца" кольцевого полирибонуклеотида. Сдвигающий элемент может включать без ограничения 2A-подобную последовательность или последовательность CHYSEL (SEQ ID NO: 8) (элемент, представляющий собой цис-действующую гидролазу). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент кодирует последовательность с С-концевой консенсусной последовательностью, которая представляет собой $X_1X_2X_3EX_5NPGP$, где X_1 отсутствует или представляет собой G или H, X_2 отсутствует или представляет собой D или G, X_3 представляет собой D, или V, или I, или S, или M, и X_5 представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления данная последовательность содержит неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена

консенсусная последовательность -D(V/I)E_xNP_{GP}, где x = любая аминокислота (SEQ ID NO: 7). Некоторые неограничивающие примеры сдвигающих элементов включают GDVESNP_{GP} (SEQ ID NO: 10), GDIEENP_{GP} (SEQ ID NO: 11), VEPNP_{GP} (SEQ ID NO: 12), IETNP_{GP} (SEQ ID NO: 13), GDIESNP_{GP} (SEQ ID NO: 14), GDVELNP_{GP} (SEQ ID NO: 15), GDIETNP_{GP} (SEQ ID NO: 16), GDVENP_{GP} (SEQ ID NO: 17), GDVEENP_{GP} (SEQ ID NO: 18), GDVEQNP_{GP} (SEQ ID NO: 19), IESNP_{GP} (SEQ ID NO: 20), GDIELNP_{GP} (SEQ ID NO: 21), HDIETNP_{GP} (SEQ ID NO: 22), HDVETNP_{GP} (SEQ ID NO: 23), HDVEMNP_{GP} (SEQ ID NO: 24), GDMESNP_{GP} (SEQ ID NO: 25), GDVETNP_{GP} (SEQ ID NO: 26), GDIEQNP_{GP} (SEQ ID NO: 27) и DSEFN_{GP} (SEQ ID NO: 28).

В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент, описанный в данном документе, расщепляет продукт экспрессии, как, например, между G и P в консенсусной последовательности, описанной в данном документе. В качестве одного неограничивающего примера, кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сдвигающий элемент для расщепления продукта экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент рядом с по меньшей мере одной экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент после каждой экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент, присутствующий с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к трансляции отдельных пептида(-ов) и/или полипептида(-ов) с каждой экспрессионной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов или неприродных нуклеотидов, которые индуцируют рибосомальную паузу в ходе трансляции. Неприродные нуклеотиды могут включать пептидо-нуклеиновую кислоту (PNA), морфолиновую и запертую нуклеиновую кислоту (LNA), а также гликоль-нуклеиновую кислоту (GNA) и треозо-нуклеиновую кислоту (TNA). Примеры, подобные этим, отличаются от встречающихся в природе ДНК или РНК ввиду изменений в остове молекулы. Иллюстративные модификации могут включать любую модификацию сахарного фрагмента, нуклеинового основания, межнуклеозидной связи (например, фосфатного остатка, образующего связь/фосфодиэфирной связи/фосфодиэфирного остова) и любую их комбинацию, которая может индуцировать рибосомальную паузу в ходе трансляции. Некоторые из иллюстративных модификаций, представленных в данном документе, описаны в другом месте в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент присутствует в кольцевом полирибонуклеотиде в других формах. Например, в некоторых иллюстративных кольцевых полирибонуклеотидах сдвигающий элемент содержит терминирующий элемент первой экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде и нуклеотидную спейсерную последовательность, которая отделяет терминирующий элемент от первой последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, следующей за первой экспрессионной последовательностью. В некоторых примерах первый сдвигающий элемент первой экспрессионной последовательности расположен выше (в 5'-направлении от нее) первой последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, следующей за первой экспрессионной последовательностью в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых случаях первая экспрессионная последовательность и экспрессионная последовательность, следующая за первой экспрессионной последовательностью, представляют собой две отдельные экспрессионные последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. Расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции может обеспечивать возможность непрерывной трансляции первой экспрессионной последовательности и следующей за ней экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления первый сдвигающий элемент содержит терминирующий элемент и отделяет продукт экспрессии первой экспрессионной последовательности от продукта экспрессии следующих за ней экспрессионных последовательностей, за счет чего обеспечивается образование дискретных продуктов экспрессии. В некоторых случаях кольцевой полирибонуклеотид, содержащий первый сдвигающий элемент выше первой последовательности инициации трансляции следующей последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде, транслируется непрерывно, тогда как соответствующий кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сдвигающий элемент второй экспрессионной последовательности, который расположен выше второй последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, следующей за второй экспрессионной последовательностью, не транслируется непрерывно. В некоторых случаях в кольцевом полирибонуклеотиде имеется только одна экспрессионная последовательность, и первая экспрессионная последовательность и следующая за ней экспрессионная последовательность являются одной и той же экспрессионной последовательностью. В некоторых иллюстративных кольцевых полирибонуклеотидах сдвигающий элемент содержит первый терминирующий элемент первой экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде и

нуклеотидную спейсерную последовательность, которая отделяет терминирующий элемент от нижерасположенной последовательности инициации трансляции. В некоторых таких примерах первый сдвигающий элемент расположен выше (в 5'-направлении от нее) первой последовательности инициации трансляции первой экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых случаях расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции обеспечивает возможность непрерывной трансляции первой экспрессионной последовательности и любых следующих экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления первый сдвигающий элемент отделяет продукт одного цикла экспрессии первой экспрессионной последовательности от продукта следующего цикла экспрессии первой экспрессионной последовательности, за счет чего обеспечивается образование дискретных продуктов экспрессии. В некоторых случаях кольцевой полирибонуклеотид, содержащий первый сдвигающий элемент выше первой последовательности инициации трансляции первой экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде, транслируется непрерывно, тогда как соответствующий кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сдвигающий элемент выше второй последовательности инициации трансляции второй экспрессионной последовательности в соответствующем кольцевом полирибонуклеотиде, не транслируется непрерывно. В некоторых случаях расстояние между вторым сдвигающим элементом и второй последовательностью инициации трансляции в соответствующем кольцевом полирибонуклеотиде в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз превышает расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых случаях расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции составляет по меньшей мере 2 нт, 3 нт, 4 нт, 5 нт, 6 нт, 7 нт, 8 нт, 9 нт, 10 нт, 11 нт, 12 нт, 13 нт, 14 нт, 15 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт, 25 нт, 30 нт, 35 нт, 40 нт, 45 нт, 50 нт, 55 нт, 60 нт, 65 нт, 70 нт, 75 нт или больше. В некоторых вариантах осуществления расстояние между вторым сдвигающим элементом и второй последовательностью инициации трансляции на по меньшей мере 2 нт, 3 нт, 4 нт, 5 нт, 6 нт, 7 нт, 8 нт, 9 нт, 10 нт, 11 нт, 12 нт, 13 нт, 14 нт, 15 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт, 25 нт, 30 нт, 35 нт, 40 нт, 45 нт, 50 нт, 55 нт, 60 нт, 65 нт, 70 нт, 75 нт или больше превышает расстояние между первым сдвигающим элементом и первой последовательностью инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит более одной экспрессионной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления расположена рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления расположена между двумя экспрессионными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления включена в экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 2 до 10 последовательностей расщепления. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 2 до 5 последовательностей расщепления. В некоторых вариантах осуществления несколько последовательностей расщепления расположены между несколькими экспрессионными последовательностями; например, кольцевой полирибонуклеотид может содержать три экспрессионные последовательности и две последовательности расщепления таким образом, что между каждой экспрессионной последовательностью расположена последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность расщепления, подобную той, какая содержится в разлагающейся *circRNA*, или расщепляемой *circRNA*, или саморасщепляющейся *circRNA*. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит две или более последовательностей расщепления, что приводит к разделению кольцевого полирибонуклеотида на несколько продуктов, например, *miRNA*, линейные РНК, кольцевой полирибонуклеотид меньшего размера и т. п.

В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления содержит последовательность РНК-рибозима. Рибозим (от "ферментативной рибонуклеиновой кислоты", также называемой РНК-ферментом или каталитической РНК) представляет собой молекулу РНК, которая катализирует химическую реакцию. Многие природные рибозимы катализируют гидролиз одной из своих собственных фосфодиэфирных связей либо гидролиз связей в других РНК, но также было обнаружено, что они катализируют aminotransferазную активность рибосомы. Каталитическая РНК может "эволюционировать" посредством способов *in vitro*. Подобно обсуждаемой выше активности рибопереключателей, рибозимы и продукты их реакций могут регулировать экспрессию генов. В некоторых вариантах осуществления каталитическая РНК или рибозим могут быть помещены в большую некодирующую РНК таким образом, чтобы рибозим присутствовал во многих копиях в клетке для целей химического превращения

молекулы из общего объема. В некоторых вариантах осуществления как аптамеры, так и рибозимы могут кодироваться в одной и той же некодирующей РНК.

В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления кодирует расщепляемый полипептидный линкер. Например, полирибонуклеотид может кодировать два или больше иммуногенов, например, при этом два или больше иммуногенов кодируются одной открытой рамкой считывания (ORF). Например, два или больше иммуногенов могут кодироваться одной открытой рамкой считывания, экспрессия с которой контролируется с помощью IRES. В некоторых вариантах осуществления ORF дополнительно кодирует полипептидный линкер, например, таким образом, что продукт экспрессии ORF кодирует два или больше иммуногенов, каждый из которых отделен последовательностью, кодирующей полипептидный линкер (например, линкер, составляющий от 5 до 200, от 5 до 100, от 5 до 50, от 5 до 20, от 50 до 100 или от 50 до 200 аминокислот). Полипептидный линкер может содержать сайт расщепления, например, сайт расщепления, распознаваемый и расщепляемый протеазой (например, эндогенной протеазой у субъекта после введения полирибонуклеотида данному субъекту). В таких вариантах осуществления один продукт экспрессии, содержащий аминокислотную последовательность двух или больше иммуногенов, расщепляется при экспрессии, так что два или больше иммуногенов являются разделенными после экспрессии. Иллюстративные сайты расщепления протеазами известны специалистам в данной области техники, например, аминокислотные последовательности, которые действуют как сайты расщепления протеазами, распознаваемые металлопротеиназой (например, матриксной металлопротеиназой (MMP), такой как любая одна или несколько из MMP 1-28), дезинтегрином и металлопротеиназой (ADAM, такой как любая одна или несколько из ADAM 2, 7-12, 15, 17-23, 28-30 и 33), сериновой протеазой (например, фурином), активатором плазминогена урокиназного типа, матриптазой, цистеиновой протеазой, аспарагиновой протеазой или катепсиновой протеазой. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой MMP9 или MMP2. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой матриптазу.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, представляет собой разлагающийся кольцевой полирибонуклеотид, расщепляемый кольцевой полирибонуклеотид или саморасщепляющийся кольцевой полирибонуклеотид. Кольцевой полирибонуклеотид может осуществлять доставку клеточных компонентов, включая, например, РНК, lncRNA, lincRNA, miRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, ncRNA, siRNA или shRNA. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит miRNA, отделенную (i) саморасщепляющимися

элементами; (ii) сайтами рекрутирования факторов расщепления; (iii) разрушаемыми линкерами; (iv) химическими линкерами и/или (v) спейсерными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления circRNA содержит siRNA, отделенную (i) саморасщепляющимися элементами; (ii) сайтами рекрутирования факторов расщепления (например, ADAR); (iii) разрушаемыми линкерами (например, глицериновыми); (iv) химическими линкерами и/или (v) спейсерными последовательностями.

Неограничивающие примеры саморасщепляющихся элементов включают рибозимы типа "головки молотка", сплайсинговые элементы, рибозимы, содержащие шпильку, рибозимы вируса гепатита дельта (HDV), сателлита Варкуд (VS) и *glmS*.

Последовательности инициации трансляции

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует иммуноген и содержит последовательность инициации трансляции, например, старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции предусматривает последовательность Козак или Шайна-Дальгарно. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции предусматривает последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, прилегающую к экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции представляет собой некодирующий старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность инициации трансляции, прилегающую к экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции обеспечивает конформационную гибкость кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции расположена в пределах по сути односторонней области кольцевого полирибонуклеотида. Дополнительные примеры последовательностей инициации трансляции описаны в параграфах [0163] – [0165] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать более 1 старт-кодона, например, без ограничения по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по

меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60 или более 60 старт-кодона. Трансляция может инициироваться в первом старт-кодоне или может инициироваться ниже первого старт-кодона.

В некоторых вариантах осуществления трансляция кольцевого полирибонуклеотида может инициироваться в кодоне, который не является первым стартовым кодоном, например, AUG. Трансляция кольцевого полирибонуклеотида может инициироваться альтернативной последовательностью инициации трансляции, такой как описанная в [0164] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления трансляция инициируется путем обработки эукариотического фактора инициации трансляции 4A (eIF4A) с помощью рокаглатов (трансляция подавляется путем блокирования сканирования 43S, что приводит к преждевременной инициации трансляции в вышерасположенном месте и снижению экспрессии белка с транскриптов, несущих последовательность-мишень RocA–eIF4A, см., например, www.nature.com/articles/nature17978).

Нетранслируемые области

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

Иллюстративные нетранслируемые области описаны в параграфах [0197] – [201] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность поли(A). Иллюстративные последовательности поли(A) описаны в параграфах [0202] – [0205] международной публикации заявки на патент

№ WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(A).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит UTR с одним или несколькими отрезками из аденозиновых и уридиновых остатков, встроенными в нее. Эти AU-богатые сигнатуры могут повышать скорость метаболизма продукта экспрессии.

Введение, удаление или модификация AU-богатых элементов UTR (ARE) могут быть полезными для модулирования стабильности или иммуногенности (например, уровня одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа) кольцевого полирибонуклеотида. При конструировании определенных кольцевых полирибонуклеотидов в кольцевой полирибонуклеотид могут быть введены одна или несколько копий ARE, и копии ARE могут модулировать трансляцию и/или выработку продукта экспрессии. Аналогично, ARE могут быть идентифицированы и удалены или встроены в кольцевой полирибонуклеотид для модулирования внутриклеточной стабильности и, таким образом, влияния на трансляцию и выработку получаемого в результате белка.

Следует понимать, что любая UTR из любого гена может быть включена в состав соответствующих фланкирующих областей кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 5'-UTR, и он является компетентным в отношении экспрессии белка с одной или несколькими его экспрессионными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 3'-UTR, и он является компетентным в отношении экспрессии белка с одной или несколькими его экспрессионными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(A), и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует терминирующий элемент, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует участок внутренней посадки рибосомы, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует кэп, и он является компетентным в

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

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

Терминирующие элементы

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит по меньшей мере один терминирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит терминирующий элемент, функционально связанный с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления в полинуклеотиде отсутствует терминирующий элемент.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и каждая экспрессионная последовательность может содержать или не содержать терминирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и в экспрессионных последовательностях отсутствует терминирующий элемент, так что полирибонуклеотид транслируется непрерывно. Исключение терминирующего элемента может привести к трансляции по типу "катящегося кольца" или непрерывной экспрессии продукта экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и каждая экспрессионная последовательность может содержать или не содержать терминирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и в экспрессионных последовательностях отсутствует терминирующий элемент, так что кольцевой полирибонуклеотид транслируется непрерывно. Исключение терминирующего элемента может приводить к трансляции по типу "катящегося кольца" или к непрерывной экспрессии продукта экспрессии, например, пептидов или полипептидов, ввиду отсутствия задержки или отделения рибосомы. В таком варианте осуществления в результате трансляции по типу "катящегося кольца" экспрессируется непрерывный продукт экспрессии при участии каждой экспрессионной последовательности. В некоторых других вариантах осуществления терминирующий элемент экспрессионной последовательности может быть частью сдвигающего элемента. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей в кольцевом полирибонуклеотиде содержат терминирующий элемент. Однако, осуществляется трансляция по типу "катящегося кольца" или экспрессия следующей (например, второй, третьей, четвертой, пятой и т. д.) экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде. В таких случаях продукт экспрессии может отделяться от рибосомы, когда рибосома встречается с терминирующим элементом, например, стоп-кодоном, и трансляция терминируется. В некоторых вариантах осуществления трансляция

терминируется, а рибосома, например, по меньшей мере одна субъединица рибосомы, остается в контакте с кольцевым полирибонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит терминирующий элемент на конце одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей содержат два или более последовательно расположенных терминирующих элемента. В таких вариантах осуществления трансляция терминируется, и трансляция по типу "катыщегося кольца" терминируется. В некоторых вариантах осуществления рибосома полностью отсоединяется от кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых таких вариантах осуществления для получения продукта со следующей (например, второй, третьей, четвертой, пятой и т. д.) экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде может потребоваться повторное соединение рибосомы с кольцевым полирибонуклеотидом до инициации трансляции. Как правило, терминирующие элементы предусматривают находящийся внутри рамки нуклеотидный триплет, который сигнализирует о терминации трансляции (например, UAA, UGA, UAG). В некоторых вариантах осуществления один или несколько терминирующих элементов в кольцевом

полирибонуклеотиде представляют собой терминирующие элементы в сдвинутых рамках считывания, например без ограничения терминирующие элементы, находящиеся вне рамки или в сдвинутых на -1 и +1 рамках считывания (например, скрытые стоп-кодоны), которые могут терминировать трансляцию. Терминирующие элементы в сдвинутых рамках считывания включают нуклеотидные триплеты TAA, TAG и TGA, которые появляются во второй и третьей рамках считывания экспрессионной последовательности. Терминирующие элементы в сдвинутых рамках считывания могут быть важны для предотвращения неверного считывания mRNA, что часто является пагубным для клетки. В некоторых вариантах осуществления терминирующий элемент представляет собой стоп-кодон.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность содержит последовательность поли(A) (например, на 3'-конце экспрессионной последовательности, например, в направлении 3' по отношению к терминирующему элементу). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(A) составляет более 10 нуклеотидов. В одном варианте осуществления длина последовательности поли(A) составляет более 15 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более чем приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500,

1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500 и 3000 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(А) сконструирована в соответствии с описаниями последовательности поли(А) в [0202] – [0204] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность не содержит последовательность поли(А) (например, на 3'-конце экспрессионной последовательности).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит поли(А), не содержит поли(А) или имеет модифицированную поли(А) для модулирования одной или нескольких характеристик кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, в котором отсутствует поли(А) или который содержит модифицированную поли(А), имеет одну или несколько улучшенных функциональных характеристик, например, иммуногенность (например, уровень одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа), период полужизни и/или эффективность экспрессии.

Дополнительные примеры терминирующих элементов описаны в параграфах [0169] – [0170] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Спейсерные последовательности

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит одну или несколько спейсерных последовательностей. Спейсер относится к любой непрерывной нуклеотидной последовательности (например, из одного или нескольких нуклеотидов), которая обеспечивает наличие расстояния или эластичности между двумя расположенными рядом полинуклеотидными областями. Спейсеры могут находиться между любыми из элементов нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе. Спейсер также может присутствовать в элементе нуклеиновой кислоты, описанном в данном документе.

Длина спейсера может составлять, например, по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20) рибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина каждой спейсерной области составляет по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20) рибонуклеотидов. Длина каждой спейсерной области может составлять, например, от 5 до 500 (например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450

или 500) рибонуклеотидов. Первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область могут содержать последовательность поли(А). Первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область могут содержать последовательность поли(А-С). В некоторых вариантах осуществления первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область содержат последовательность поли(А-Г). В некоторых вариантах осуществления первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область содержат последовательность поли(А-Т). В некоторых вариантах осуществления первая спейсерная область, вторая спейсерная область или первая спейсерная область и вторая спейсерная область содержат случайную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности может составлять, например, по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 15 нуклеотидов или по меньшей мере 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности составляет не более 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности составляет от 20 до 50 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина спейсерной последовательности составляет 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов.

Спейсерные последовательности могут представлять собой последовательности поли(А), последовательности поли(А-С), последовательности поли(С) или последовательности поли(U).

В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности могут представлять собой последовательность поли(А-Т), поли(А-С), поли(А-Г) или случайную последовательность.

Иллюстративные спейсерные последовательности описаны в параграфах [0293] – [0302] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Модификации

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько замен, вставок и/или добавлений, делеций и ковалентных модификаций относительно эталонных

последовательностей, в частности, исходного полирибонуклеотида, которые включены в объем настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько посттранскрипционных модификаций (например, кэпирование, расщепление, полиаденилирование, сплайсинг, последовательность поли(А), метилирование, ацилирование, фосфорилирование, метилирование остатков лизина и аргинина, ацетилирование и нитрозилирование тиольных групп и остатков тирозина и т. п.). Одна или несколько посттранскрипционных модификаций могут представлять собой любую посттранскрипционную модификацию, такую как любая из более чем ста отличающихся модификаций нуклеозидов, которые были идентифицированы в РНК (Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999, с обновлениями. Nucl Acids Res 27: 196-197). В некоторых вариантах осуществления первая выделенная нуклеиновая кислота предусматривает матричную РНК (mRNA). В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеозид, выбранный из группы нуклеозидов, такой как нуклеозиды, описанные в [0311] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать любую полезную модификацию, такую как модификация сахарного фрагмента, нуклеинового основания или межнуклеозидной связи (например, фосфатного остатка, образующего связь/фосфодиэфирной связи/фосфодиэфирного остова). Один или несколько атомов пиримидинового нуклеинового основания могут быть заменены или замещены необязательно замещенным амином, необязательно замещенным тиолом, необязательно замещенным алкилом (например, метилом или этилом) или галогеном (например, хлором или фтором). В определенных вариантах осуществления модификации (например, одна или несколько модификаций) присутствуют в каждом сахарном фрагменте и каждой межнуклеозидной связи. Модификации могут представлять собой модификации по типу замены рибонуклеиновых кислот (РНК) на дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), треозо-нуклеиновые кислоты (ТНА), гликоль-нуклеиновые кислоты (GNA), пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA), запертые нуклеиновые кислоты (LNA) или их гибридные формы. Дополнительные модификации описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну N(6)-метиладенозиновую модификацию (m6A) для повышения эффективности трансляции. В некоторых вариантах осуществления модификация m6A может обеспечивать снижение иммуногенности (например, снижение уровня одного или

нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа) кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления модификация может включать модификацию, индуцированную химическим путем или в клетке. Например, некоторые неограничивающие примеры модификаций внутриклеточной РНК описаны Lewis и Pan в "RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions" в *Nat Reviews Mol Cell Biol*, 2017, 18:202-210.

В некоторых вариантах осуществления химические модификации рибонуклеотидов кольцевого полирибонуклеотида могут приводить к усилению ускользания от иммунологического надзора. Кольцевой полирибонуклеотид может быть синтезирован и/или модифицирован с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, таких как описанные в работе "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование (моно-, ди- и три-), конъюгирование, инвертированные связи и т. п.), 3'-концевые модификации (конъюгирование, ДНК-нуклеотиды, инвертированные связи и т. п.), модификации оснований (например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары оснований с расширенным спектром партнеров), удаление оснований (нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями) или конъюгированные основания. Модифицированные рибонуклеотидные основания также могут включать 5-метилцитидин и псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модификации оснований могут приводить к модулированию экспрессии, иммунного ответа, стабильности, субклеточной локализации в числе прочих функциональных эффектов в отношении кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления модификация включает биортогональный нуклеотид, например, неприродное основание. См., например, работу Kimoto et al, *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53:12309, DOI: 10.1039/c7cc06661a, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления модификации сахарного фрагмента (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замена сахарного фрагмента одним или несколькими рибонуклеотидами кольцевого полирибонуклеотида могут, так же как и модификации остова, включать модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры кольцевого полирибонуклеотида включают без ограничения кольцевой полирибонуклеотид, содержащий модифицированные остовы или не

содержащий природных межнуклеозидных связей, как, например, имеющий модификации межнуклеозидных связей, в том числе модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Кольцевые полирибонуклеотиды, имеющие модифицированные остовы, включают, среди прочих, те, которые не имеют атома фосфора в остове. Для целей настоящей заявки и, как иногда упоминается в уровне техники, модифицированные РНК, которые не имеют атома фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут рассматриваться как олигонуклеозиды. В конкретных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид будет содержать рибонуклеотиды с атомом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы кольцевых полирибонуклеотидов могут включать, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, как, например, 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, такие как 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их аналоги, содержащие 2'-5'-связи, а также те, которые характеризуются инвертированной полярностью, где расположенные рядом пары нуклеозидных звеньев связаны в направлении от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть отрицательно или положительно заряжен.

Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в состав кольцевого полирибонуклеотида, могут иметь модификацию межнуклеозидной связи (например, фосфатного остова). В данном документе применительно к полинуклеотидному остову фразы "фосфат" и "фосфодиэфир" используются взаимозаменяемо. Фосфатные группы остова могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких атомов кислорода отличающимся заместителем. Кроме того, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут содержать полную замену немодифицированного фосфатного компонента другой межнуклеозидной связью, как описано в данном документе. Примеры модифицированных фосфатных групп включают без ограничения фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные сложные эфиры, гидрофосфонаты, фосфорамидаты, фосфородиамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. В фосфодитиоатах оба атома кислорода, не участвующих в образовании связи, замещены атомами серы. Фосфатный линкер также может быть модифицирован путем замены атома кислорода, участвующего в образовании связи, атомом азота (мостиковые

фосфорамидаты), серы (мостиковые фосфоротиоаты) и углерода (мостиковые метиленфосфонаты).

α-тиозамещенный фосфатный компонент предусмотрен для придания стабильности РНК- и ДНК-полимерам посредством неприродных связей фосфоротиоатного остова. Фосфоротиоатная ДНК и РНК характеризуются повышенной устойчивостью к действию нуклеаз и, как следствие, более длительным периодом полужизни в клеточной среде. Фосфоротиоат, соединенный с кольцевым полирибонуклеотидом, как ожидается, будет приводить к ослаблению врожденного иммунного ответа благодаря более слабому связыванию/активации молекул врожденного клеточного иммунитета.

В конкретных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид включает альфа-тионуклеозид (например, 5'-0-(1-тиофосфат)-аденозин, 5'-0-(1-тиофосфат)-цитидин (α-тиоцитидин), 5'-0-(1-тиофосфат)-гуанозин, 5'-0-(1-тиофосфат)-уридин или 5'-0-(1-тиофосфат)-псевдоуридин).

Другие межнуклеозидные связи, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, в том числе межнуклеозидные связи, которые не содержат атом фосфора, описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать один или несколько цитотоксических нуклеозидов. Например, цитотоксические нуклеозиды могут быть включены в состав кольцевого полирибонуклеотида, например, в качестве бифункциональной модификации. Цитотоксический нуклеозид может включать без ограничения аденозинарабинозид, 5-азациитидин, 4'-тиоарацитидин, циклопентенилцитозин, кладрибин, клофарабин, цитарабин, цитозинарабинозид, 1-(2-С-циано-2-дезоксид-β-D-арабинопентофуранозил)-цитозин, децитабин, 5-фторурацил, флударабин, флоксуридин, гемцитабин, комбинацию тегафура и урацила, тегафур ((RS)-5-фтор-1-(тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H-дион)), троксацитабин, тезацитабин, 2'-дезоксид-2'-метиленцитидин (DMDC) и 6-меркаптопурин. Дополнительные примеры включают фосфат флударабина, N4-бегеноил-1-β-D-арабинофуранозилцитозин, N4-октадецил-1-β-D-арабинофуранозилцитозин, N4-пальмитоил-1-(2-С-циано-2-дезоксид-β-D-арабинопентофуранозил) цитозин и P-4055 (сложный эфир цитарабина и 5'-элаидиновой кислоты).

Кольцевой полирибонуклеотид может быть или не быть однородно модифицированным по всей длине молекулы. Например, один или несколько или все типы нуклеотидов (например, встречающиеся в природе нуклеотиды, пуриновые или пиримидиновые или любые один или несколько или все из A, G, U, C, I, pU) могут быть или не быть однородно модифицированными в кольцевом полирибонуклеотиде или в

заданной предварительно определенной области его последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит инозин, который может способствовать определению иммунной системой кольцевого полирибонуклеотида как эндогенного по сравнению с вирусными РНК. Включение инозина также может опосредовать улучшение стабильности/снижение уровня разрушения РНК. См., например, работу Yu, Z. et al. (2015) RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as "self". Cell Res. 25, 1283–1284, включенную посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в кольцевом полирибонуклеотиде (или в указанной области его последовательности) являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления модификация может включать m6A, который может усиливать экспрессию; инозин, который может ослаблять иммунный ответ; псевдоуридин, который может повышать стабильность РНК или обеспечивать сквозное прочтение при трансляции (сдвигающий элемент), m5C, который может обеспечивать повышение стабильности; а также 2,2,7-триметилгуанозин, который способствует субклеточной транслокации (например, ядерной локализации).

Отличающиеся модификации сахарного фрагмента, модификации нуклеотидов и/или межнуклеозидных связей (например, структур остова) могут существовать в различных положениях в кольцевом полирибонуклеотиде. Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что аналоги нуклеотидов или другие модификации могут быть расположены в любом(любом) положении(положениях) кольцевого полирибонуклеотида, так чтобы функция кольцевого полирибонуклеотида по сути не снижалась. Модификация также может представлять собой модификацию некодирующей области. Кольцевой полирибонуклеотид может содержать от приблизительно 1% до приблизительно 100% модифицированных нуклеотидов (по отношению к общему содержанию нуклеотидов либо по отношению к одному или нескольким типам нуклеотидов, т. е. любому одному или нескольким из А, G, U или C) или любую процентную долю в этом промежутке (например, от 1% до > 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от % до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%, от

80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 100% и от 95% до 100%).

Мультимеризация

В определенных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может кодировать домен мультимеризации. Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать первый полипептид, который представляет собой иммуноген (например, иммуноген VZV), и второй полипептид, который представляет собой домен мультимеризации. Например, домен мультимеризации может кодироваться в той же открытой рамке считывания, что и иммуноген (например, иммуноген VZV), и экспрессироваться в виде белка, слитого с иммуногеном. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может кодировать два или более иммуногенов, и каждый иммуноген необязательно может быть слит с доменом мультимеризации. Домен мультимеризации может способствовать образованию иммуногенных комплексов (например, комплекса, содержащего множество иммуногенов).

Мультимеризация кодируемого иммуногена может быть полезной для индукции иммунного ответа. Слияние иммуногена с одним или несколькими элементами мультимеризации (например, элементами димеризации, элементами тримеризации, элементами тетрамеризации и элементами олигомеризации) может приводить к образованию мультимерного иммуногенного комплекса (например, образованию мультимерного иммуногенного комплекса после экспрессии у иммунизированного субъекта). В некоторых вариантах осуществления образование мультимерного иммуногенного комплекса обеспечивает повышение иммуногенности иммуногена. Например, образование мультимерного иммуногенного комплекса может обеспечивать повышение иммуногенности иммуногена посредством имитации инфекции экзогенным патогеном (например, вирусом), где множество потенциальных иммуногенов обычно расположено на оболочке патогена (например, иммуноген гемагглютинина (НА) вируса гриппа). В некоторых вариантах осуществления комплекс мультимеризации содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный комплекс содержит от 2 до 10, от 2 до 50, от 2 до 100, от 5 до 10, от 5 до 15, от 5 до 20, от 5 до 50, от 5 до 100, от 10 до 20, от 10 до 30, от 10 до 40, от 10 до 50, от 10 до 60, от 10 до 100, от 20 до 50 или от 20 до 100 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный комплекс содержит 6 копий иммуногена (например, кольцевой полирибонуклеотид кодирует слитый белок иммуноген-домен сборки-иммуноген). В некоторых вариантах осуществления иммуногенный комплекс содержит 24 копии иммуногена (например,

кольцевой полирибонуклеотид кодирует слитый белок иммуноген-ферритин). В некоторых вариантах осуществления иммуногенный комплекс содержит 60 копий иммуногена (например, кольцевой полирибонуклеотид кодирует слитый белок иммуноген-AaLS или кодирует иммуноген- β -кольцеобразный пептид).

При использовании в комбинации с представляющим интерес полипептидным иммуногеном в контексте настоящего изобретения такие элементы мультимеризации могут быть расположены в направлении N-конца или C-конца относительно представляющего интерес полипептида. На уровне нуклеиновой кислоты кодирующая последовательность для такого элемента мультимеризации обычно располагается в той же рамке считывания в направлении 5'- или 3'-конца относительно кодирующей последовательности для представляющего интерес полипептида или белка.

Домен мультимеризации может содержать от 10 до 500 аминокислотных остатков (например, от 10 до 450, от 10 до 400, от 10 до 350, от 10 до 300, от 10 до 250, от 10 до 200, от 10 до 150, от 10 до 100, от 10 до 50, от 50 до 500, от 100 до 500, от 150 до 500, от 200 до 500, от 250 до 500, от 300 до 500, от 350 до 500, от 400 до 500 и от 450 до 500 остатков). В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации может содержать от 20 до 2500 аминокислотных остатков (например, от 20 до 250, от 20 до 225, от 20 до 200, от 20 до 175, от 20 до 150, от 20 до 150, от 20 до 125, от 20 до 100, от 20 до 75, от 20 до 50, от 50 до 250, от 75 до 250, от 100 до 250, от 125 до 250, от 150 до 250, от 175 до 250, от 200 до 250 и от 225 до 250 остатков).

В некоторых вариантах осуществления иммуноген, слитый с доменом мультимеризации, является в по меньшей мере 2 раза, 5 раз или 10 раз более иммуногенным, чем иммуноген (например, у субъекта-человека). В некоторых вариантах осуществления иммуноген, слитый с доменом мультимеризации, является на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% или 500% более иммуногенным (например, у субъекта-человека), чем иммуноген, не слитый с доменом мультимеризации.

Конкретные элементы мультимеризации представляют собой элементы олигомеризации, элементы тетрамеризации, элементы тримеризации или элементы димеризации. Элементы димеризации могут быть выбраны, например, из элементов/доменов димеризации белков теплового шока, Fc-доменов иммуноглобулинов и лейциновых застежек (доменов димеризации класса транскрипционных факторов с лейциновой застежкой и основной областью). Элементы тримеризации и тетрамеризации могут быть выбраны, например, из сконструированных лейциновых застежек (сконструированного пептида, представляющего собой суперспираль на основе α -спирали,

который принимает состояние параллельно расположенных тримеров), домена сборки фибритина из фага T4 энтеробактерий, GCN4pII, CCN4-pLI и p53. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит домен сборки T4. В конкретных вариантах осуществления домен сборки T4 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 48). В некоторых вариантах осуществления домен сборки T4 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой β -кольцеобразный пептид (см. Matsuura et al. (2010), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49: 9662-9665). В некоторых вариантах осуществления β -кольцеобразный пептид имеет аминокислотную последовательность INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS (SEQ ID NO: 49), где C-концевой остаток серина необязательно присутствует или отсутствует, или имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает пептид AaLS. В конкретных вариантах осуществления пептид AaLS имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична TDILGKYVINYLNKLKKKEDIFKEFLKW (SEQ ID NO: 50). В некоторых вариантах осуществления пептид AaLS имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50.

Элементы олигомеризации могут быть выбраны, например, из ферритина, поверхностно-активного вещества D, доменов олигомеризации из фосфопротеинов парамиксовирусов, доменов олигомеризации ингибитора системы комплемента, представляющего собой C4-связывающий белок (C4bp), домена олигомеризации фактора вирусной инфекционности (Vif), домена стерильного альфа-мотива (SAM) и домена типа D фактора фон Виллебранда.

Ферритин образует олигомеры и является высококонсервативным белком, встречающимся у всех животных, бактерий и растений. Ферритин представляет собой белок, который спонтанно образует наночастицы из 24 идентичных субъединиц. Слитые конструкции ферритин-иммуноген потенциально образуют олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает домен ферритина. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает домен ферритина, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

DIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYENAKKLIVFLNE
 NNVPVQLTSSAPENKFESLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKGKDHATFNFLQWYV
 SEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS (SEQ ID NO: 51).

Белок "поверхностно-активное вещество D" (SPD) представляет собой гидрофильный гликопротеин, который осуществляет спонтанную самосборку с образованием олигомеров. Слитая конструкция SPD-иммуноген может образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ.

Фосфопротеин парамиксовирусов (вирусов со смысловой РНК отрицательной полярности) функционирует как транскрипционный трансактиватор вирусной полимеразы. Олигомеризация фосфопротеина важна для репликации вирусного генома. Слитые конструкции фосфопротеин-иммуноген могут образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ.

Ингибитор системы комплемента, представляющий собой С4-связывающий белок (С4bp), также может использоваться в качестве партнера по слиянию для получения агрегатов олигомерных иммуногенов. С-концевой домен С4bp (57 аминокислотных остатков у людей и 54 аминокислотных остатка у мышей) является необходимым и достаточным для олигомеризации С4bp или других полипептидов, слитых с ним. Слитые конструкции С4bp-иммуноген могут образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ. Было показано, что домен мультимеризации фактора вирусной инфекционности (Vif) образует олигомеры как *in vitro*, так и *in vivo*. Олигомеризация Vif предусматривает картирование последовательности между остатками от 1 51 до 1 64 в С-концевом домене, 1 61 мотива 64 PPLP1 (SEQ ID NO: 150) (для HIV-1 человека: TPKKIKPPLP (SEQ ID NO: 52)). Слитые конструкции Vif-иммуноген могут образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ.

Домен стерильного альфа-мотива (SAM) представляет собой модуль белкового взаимодействия, присутствующий в широком спектре белков, участвующих во многих биологических процессах. Домен SAM, занимающий около 70 остатков, встречается в различных эукариотических организмах. Было показано, что домены SAM гомо- и гетероолигомеризуются, образуя множественные самоассоциирующиеся олигомерные архитектуры. Слитая конструкция SAM-иммуноген может образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ. Фактор фон Виллебранда (vWF) содержит несколько доменов типа D: D1 и D2 присутствуют в N-концевом пропептиде, в то время как оставшиеся D-домены требуются для олигомеризации. Домен vWF содержится в различных белках плазмы крови: факторах

комплемента В, С2, С 3 и CR4; интегрингах (I-доменах); коллагенах типов VI, VII, XII и XIV, а также других внеклеточных белках. Слитые конструкции vWF-иммуноген могут образовывать олигомерные агрегаты или "кластеры" иммуногенов, которые могут усиливать иммунный ответ.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой домен люмазинсинтазы. Люмазинсинтаза может собираться в комплекс, содержащий 60 копий домена люмазинсинтазы, где каждый домен люмазинсинтазы может быть слит с одним или несколькими иммуногенами. В некоторых вариантах осуществления домен люмазинсинтазы содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 53-63 и 142 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 53-63 и 142.

SEQ ID NO: 53

MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 54

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGCIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKCWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 55

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 56

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 142

MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWE
IPVAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADT
LEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

Домены люмазинсинтазы содержат одну или несколько цистеиновых замен для введения ненативной(-ых) дисульфидной(-ых) связи(-ей), которая(-ые) стабилизирует(-ют) комплекс люмазинсинтазы, образованный из полученных в результате самосборки

субъединиц. В некоторых вариантах осуществления ненативную(-ые) дисульфидную(-ые) связь(-и) вводят с помощью замен L121C-K131C, L121CG-K131C, L121GC-K131C, K7C-R40C, I3C-L50C, I82C-K131CG, E5C-R52C или E95C-A101C или их комбинации (такой как I3C-L50C и I82C-K131CG; E5C-R52C и I82C-K131CG или E95C-A101C и I82C-K131CG). Нумерация остатков приведена со ссылкой на субъединицу люмазинсинтазы, представленную под SEQ ID NO: 53. Неограничивающие примеры включают следующее:

SEQ ID NO: 57 (L121C-K131C)

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCE
QAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 58 (L121CG-K131C)

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCC
FEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 59 (L121GC-K131C)

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCF
CEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 60 (K7C-R40C)

QIYEGCLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVCHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLE
QAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 61 (I3C-L50C, I82C-K131CG)

QCYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITCVRVPGSWEI
PVAAGELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADT
LEQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 62 (E5C-R52C, I82C-K131CG)

QIYCGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVCVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTL
EQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

SEQ ID NO: 63 (E95C-A101C, I82C-K131CG)

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
VAAGELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASCVSKGLCDLSLELRKPITFGVITADTL
EQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANLFKSLR

Различные способы мультимеризации полипептидов описаны в международной публикации № WO2020/061564, страница 25, строка 1 - страница 26, строка 20, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой домен рибофлавинсинтазы. Например, домен рибофлавинсинтазы может иметь аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с TDILGKYVINYLNKLKKEIDIFKEFLKW (SEQ ID NO: 143). В некоторых вариантах осуществления домен рибофлавинсинтазы может иметь аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 143.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать один или несколько доменов мультимеризации. Например, кольцевой полирибонуклеотид может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит два домена мультимеризации. Два или более доменов мультимеризации могут быть расположены рядом друг с другом. В качестве альтернативы два или более доменов мультимеризации могут быть отделены одним или несколькими другими элементами. Например, два домена мультимеризации могут быть отделены иммуногеном. В конкретных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать домен ферритина и домен сборки T4. Домен ферритина и домен сборки T4 могут быть связаны, например, посредством линкера Gly-Ser. В некоторых вариантах осуществления домен ферритина, связанный с доменом сборки T4, имеет следующую аминокислотную последовательность:

PGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLSGRSGGDIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSM
SSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVQVQLTSISAPENKFESLTQIF
QKAYENEQHISESINNIVDHAIKGKDHATFNFLQWYVSEQHEEEVLFKDILDKIELIGNE
NHGLYLADQYVKGIAKSRSKS (SEQ ID NO: 64).

Подходящие домены мультимеризации могут быть выбраны, например, из перечня аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1116-1167 из международной заявки на патент WO2017/081082 или фрагментов или вариантов этих последовательностей.

Способы получения

В настоящем изобретении представлены способы получения кольцевых полирибонуклеотидов, включая, например, рекомбинантную технологию или химический синтез. Например, молекула ДНК, используемая для получения кольцевой РНК, может содержать последовательность ДНК из встречающейся в природе последовательности

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

Кольцевые полирибонуклеотиды могут быть получены в соответствии с любой доступной методикой, в том числе без ограничения посредством химического синтеза и ферментативного синтеза. В некоторых вариантах осуществления линейную первичную конструкцию или линейную РНК можно подвергнуть циклизации или конкатемеризации с созданием circRNA, описанной в данном документе. Механизм циклизации или конкатемеризации можно осуществлять посредством таких способов, как, например, химические, ферментативные способы, способы лигирования с помощью шунта или рибозимного катализа. Новообразовавшаяся 5'-3'-связь может представлять собой внутримолекулярную связь или межмолекулярную связь. Например, для лигирования с помощью шунта может использоваться лигаза для шунта, такая как лигаза SplintR®. В соответствии с этим способом одонитевой полинуклеотид (шунт), такой как одонитевая ДНК или РНК, можно сконструировать для гибридизации с обоими концами линейного полирибонуклеотида, так что эти два конца могут быть расположены рядом друг с другом при гибридизации с одонитевым шунтом. Таким образом, лигаза для шунта может катализировать лигирование двух концов линейного полирибонуклеотида, расположенных рядом друг с другом, с образованием circRNA. В некоторых вариантах осуществления при синтезе кольцевых полинуклеотидов можно использовать ДНК- или РНК-лигазу. В качестве неограничивающего примера, лигаза может представлять собой CircLigase или лигазу для циркуляризации.

В другом примере 5'- либо 3'-конец линейного полирибонуклеотида может кодировать последовательность рибозима с лигазной активностью, так что в ходе транскрипции *in vitro* получаемая в результате линейная circRNA содержит последовательность активного рибозима, способную обеспечивать лигирование 5'-конца линейного полирибонуклеотида

с 3'-концом линейного полирибонуклеотида. Рибозим с лигазной активностью может быть получен из интрона группы I, вируса гепатита дельта, рибозима, содержащего шпильку, или может быть выбран с помощью SELEX (систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением).

В другом примере линейный полирибонуклеотид может быть подвергнут циклизации или конкатемеризации с использованием по меньшей мере одного компонента, отличного от нуклеиновой кислоты. Например, по меньшей мере один компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может вступать в реакцию с областями или элементами вблизи 5'-конца или вблизи 3'-конца линейного полирибонуклеотида для циклизации или конкатемеризации линейного полирибонуклеотида. В другом примере по меньшей мере один компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может быть расположен на 5'-конце или 3'-конце линейного полирибонуклеотида, или быть связан с ним, или находиться вблизи него. Компоненты, отличные от нуклеиновой кислоты, могут быть гомологичными или гетерологичными. В качестве неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой связь, такую как гидрофобная связь, ионная связь, биоразрушаемая связь или расщепляемая связь. В качестве другого неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, представляет собой лигирующий компонент. В качестве еще одного неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой олигонуклеотидный или пептидный компонент, такой как аптамер или линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, описанный в данном документе.

В другом примере линейные полирибонуклеотиды могут быть подвергнуты циклизации или конкатемеризации посредством самосплайсинга. В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды могут содержать последовательность петли E для самолигирования. В другом варианте осуществления линейные полирибонуклеотиды могут содержать самоциркуляризирующийся интрон, например, 5'- и 3'-границы сплайсинга, или самоциркуляризирующийся каталитический интрон, такой как интроны группы I, группы II или группы III. Неограничивающие примеры последовательностей самосплайсирующихся интронов группы I могут включать самосплайсирующиеся последовательности с циклическими перестановками интронов и экзонов, полученные из гена *td* бактериофага T4, и вставочную последовательность (IVS) rRNA *Tetrahymena*, ген пре-tRNA-Leu цианобактерии рода *Anabaena* или пре-rRNA *Tetrahymena*.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид может содержать фрагменты каталитического интрона, такие как фрагмент, представляющий собой 3'-

половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I. Первая и вторая области отжига могут быть размещены в пределах фрагментов каталитического интрона. Каталитические интроны группы I представляют собой самосплайсирующиеся рибозимы, которые катализируют их собственное вырезание из предшественников mRNA, tRNA и rRNA посредством механизма переноса фосфорила ионами двух металлов. Важно отметить, что РНК как таковая осуществляет самокатализ удаления интронов без необходимости применения экзогенного фермента, такого как лигаза.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, получены из гена пре-tRNA-Leu цианобактерии рода *Anabaena* или пре-rRNA *Tetrahymena*.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, получены из гена пре-tRNA-Leu цианобактерии рода *Anabaena*, и 3'-фрагмент экзона содержит первую область отжига, и 5'-фрагмент экзона содержит вторую область отжига. Первая область отжига может содержать, например, от 5 до 50, например, от 10 до 15 (например, 10, 11, 12, 13, 14 или 15) рибонуклеотидов, и вторая область отжига может содержать, например, от 5 до 50, например, от 10 до 15 (например, 10, 11, 12, 13, 14 или 15) рибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, получены из пре-rRNA *Tetrahymena*, и фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит первую область отжига, и 5'-фрагмент экзона содержит вторую область отжига. В некоторых вариантах осуществления 3'-эксон содержит первую область отжига, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит вторую область отжига. Первая область отжига может содержать, например, от 6 до 50, например, от 10 до 16 (например, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16) рибонуклеотидов, и вторая область отжига может содержать, например, от 6 до 50, например, от 10 до 16 (например, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16) рибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, получены из гена пре-tRNA-Leu цианобактерии рода *Anabaena*, пре-rRNA *Tetrahymena* или гена td фага T4.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, и 5'-фрагмент каталитического интрона группы I получены из гена td фага T4. 3'-фрагмент экзона может содержать первую область отжига, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, может содержать вторую область отжига. Первая область отжига может содержать, например, от 2 до 16, например, 10-16 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16) рибонуклеотидов, и вторая область отжига может содержать, например, от 2 до 16, например, 10-16 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16) рибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, представляет собой 5'-конец линейного полинуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, представляет собой 3'-конец линейного полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AACAACAGATAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGAGCTACCCCT
AACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGTCCAATTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAA
GCTGCGGGAATG-3' (SEQ ID NO: 151).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGA
AACSTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAG
TAAGTT-3' (SEQ ID NO: 152).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 151, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 152.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по

меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

СТТСТГТТГАТАТГГАТГСАГТТСАСАГАСТАААТГТССГТССГГГААГАТГАТТСТТСТСАТААГАТАТАГТССГАСТТСТСТТААТГГГАГСТАГАССГАТГААГТГАТГСАААСТГГАГСССГТГГГААСТААТТТГТАТГССГААГАТАТАТГАТТАГТТТТГГАГТАСТССГ-3' (SEQ ID NO: 153).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

АААТАГСААТАТТТАССТТТГГАГГГААААГТТАТСАГССАТГСАССТГГАТГАСТАГТСТТТАААССААТАГАТТГСАТССГТТТААААГГСААГАССГТСАААТТГССГГАААГГГТСААСАГССГТТСАГАТССААГТТТСАГГГГАААСТТТГАГАТГГССТТГСАААГГГТАТГГТААТААГТГСАССАТГГТССТААССАССАГССААГТССТААГТСААСАГАТ-3' (SEQ ID NO: 154).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 153, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 154.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ГГТТСТАСАТАААТГССТААССАСТАТСССТТТГГГГАГАТГАГГТСААГТГАСТССГАААССАТАГАСААСТТГСТТТААСААГТТГГАГАТАТАГТСТГСТТГСАТГГТГСАТГСАГСТГГАТАТААТТССГГГГААГАТТААССАСТАТТАТСТГААСАТААТГ-3' (SEQ ID NO: 155).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ТААТТГАГСССТГАГАТАААГТГАСТТАТАСТТГТААТСТАТСТАААССГГГГААССТСТСТАГАТАСААТСССГТГСТАААТТГТААГГАСТ-3' (SEQ ID NO: 129).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 155, и

фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 129.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

TAAACAAC TAACAGCTTTAG AAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGA
TTCAGCCGAGGGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGC
GAAAGTTGCAGAGAGAATGAAAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGT
CCCTCCGCCCCCA-3' (SEQ ID NO: 130).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ACGGTAGACGCAGCGGACTTAGAAAAC TGGGCCTCGATCGCGAAAGGGATCGAGTG
GCAGCTCTCAAAC TCAAGGAAACCTAAAAC TTTAAACATTMAAGTCATGGCAATCC
TGAGCCAAGCTAAAGC-3' (SEQ ID NO: 131).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 130, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

TTAAACTCAA AATTTAAAATCCCAAATTC AAAATTC CGGGAAGGTGCAGAGACTCG
ACGGGAGCTACCCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGC
CTGAAGTTGCTGAAGCAACAAGGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCG
TTGACTGTAAA AAGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCACC CCCC-3' (SEQ ID NO: 132).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAAC TGGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTG

GAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGC
CAAGCCCAGAAAATTTAGACTTGAGATTTGATTTTGGAG-3' (SEQ ID NO: 133).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 132, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACG
GGAGCTACCCTAACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTTAAAGCCTG
AAGTTGTGCAAGCAACAAGGCAACAGTGAAAGCTGTGGAAGAATGAAAATCCGTTG
ACCTTAAACGGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCACCACC-3' (SEQ ID NO: 134).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACCTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTG
GAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGC
CAAGCCCGGAAATTTAGAAATCAAGATTTTATTTT-3' (SEQ ID NO: 135).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 134, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAG
GGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAG
ATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTA
AAAAACAATAA-3' (SEQ ID NO: 136).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по

меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAG
GGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAG
ATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTA
AAAAACAATAA-3' (SEQ ID NO: 137).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 136, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

ACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA
GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG
GCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGG
GTTCAAGTCCCTCCACCCCA-3' (SEQ ID NO: 138).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCT
CTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC
GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAGTAAGTT-3' (SEQ ID NO: 139).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 138, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AACAACAGATAACTTACTAGTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT
ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA

GTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTT
CAAGTCCCTCCACCCCA-3' (SEQ ID NO: 140).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, характеризуется по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью 5'-

AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCT
CTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC
GAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3' (SEQ ID NO: 141).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой 3'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 140, и фрагмент, представляющий собой 5'-половину каталитического интрона группы I, содержит последовательность под SEQ ID NO: 141.

В другом примере линейный полирибонуклеотид может быть подвергнут циклизации или конкатемеризации благодаря компоненту, отличному от нуклеиновой кислоты, который вызывает притяжение между атомами, молекулярными поверхностями, расположенными на 5'- и 3'-концах линейного полирибонуклеотида, находящимися вблизи них или связанными с ними. Один или несколько линейных полирибонуклеотидов могут быть подвергнуты циклизации или конкатемеризации благодаря межмолекулярным силам или внутримолекулярным силам. Неограничивающие примеры межмолекулярных сил включают силы взаимодействия диполь-диполь, силы взаимодействия диполь-индуцированный диполь, силы взаимодействия индуцированный диполь-индуцированный диполь, ван-дер-ваальсовы силы и лондоновские дисперсионные силы.

Неограничивающие примеры внутримолекулярных сил включают ковалентные связи, металлические связи, ионные связи, резонансные связи, агостические связи, дипольные связи, конъюгацию, гиперконъюгацию и антисвязывание.

В другом примере линейный полирибонуклеотид может содержать последовательность РНК-рибозима вблизи 5'-конца и вблизи 3'-конца. Последовательность РНК-рибозима может образовывать ковалентную связь с пептидом, когда его последовательность подвергается воздействию остальной части рибозима. Пептиды, ковалентно связанные с последовательностью РНК-рибозима вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут ассоциировать друг с другом, за счет чего обеспечивается циклизация или конкатемеризация линейного полирибонуклеотида. В другом примере пептиды, ковалентно связанные с РНК-рибозимом вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут обеспечивать циклизацию или конкатемеризацию линейной первичной конструкции или линейной mRNA после их

лигирования с использованием различных способов, известных из уровня техники, таких как без ограничения лигирование белков. Неограничивающие примеры рибозимов для использования в линейных первичных конструкциях или линейных полирибонуклеотидах по настоящему изобретению или неисчерпывающий перечень способов включения или ковалентного связывания пептидов описаны в заявке на патент США № US20030082768, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

В другом примере кольцевой полирибонуклеотид может быть получен с использованием дезоксирибонуклеотидной матрицы, транскрибируемой в бесклеточной системе (например, посредством транскрипции *in vitro*) с получением линейной РНК. Из линейного полирибонуклеотида получают способный к сплайсингу полирибонуклеотид, который может быть подвергнут самосплайсингу с получением кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения кольцевого полирибонуклеотида (например, в бесклеточной системе) путем получения линейного полирибонуклеотида и обеспечения самосплайсинга линейного полирибонуклеотида в условиях, подходящих для сплайсинга 3'- и 5'-сайтов сплайсинга линейного полирибонуклеотида, с получением таким образом кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения кольцевого полирибонуклеотида путем получения дезоксирибонуклеотида, кодирующего линейный полирибонуклеотид, обеспечения транскрипции дезоксирибонуклеотида в бесклеточной системе с получением линейного полирибонуклеотида; необязательно очистки способного к сплайсингу линейного полирибонуклеотида и обеспечения самосплайсинга линейного полирибонуклеотида в условиях, подходящих для сплайсинга 3'- и 5'-сайтов сплайсинга линейного полирибонуклеотида, с получением таким образом кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения кольцевого полирибонуклеотида путем получения дезоксирибонуклеотида,

кодирующего линейный полирибонуклеотид, обеспечения транскрипции дезоксирибонуклеотида в бесклеточной системе с получением линейного полирибонуклеотида, где транскрипция осуществляется в растворе в условиях, подходящих для сплайсинга 3'- и 5'-сайтов сплайсинга линейного полирибонуклеотида, с получением таким образом кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит 5'-расщепленный интрон и 3'-расщепленный интрон (например, самосплайсирующуюся конструкцию для получения кольцевого полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит 5'-область отжига и 3'-область отжига.

Подходящие условия для процессов транскрипции *in vitro* и или самосплайсинга могут включать любые условия (например, раствор или буфер, такой как водный буфер или раствор), которые имитируют физиологические условия в одном или нескольких отношениях. В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают 0,1-100 мМ ионов Mg^{2+} или их соли (например, 1-100 мМ, 1-50 мМ, 1-20 мМ, 5-50 мМ, 5-20 мМ или 5-15 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают 1-1000 мМ ионов K^{+} или их соли, такой как KCl (например, 1-1000 мМ, 1-500 мМ, 1-200 мМ, 50-500 мМ, 100-500 мМ или 100-300 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают 1-1000 мМ ионов Cl^{-} или их соли, такой как KCl (например, 1-1000 мМ, 1-500 мМ, 1-200 мМ, 50-500 мМ, 100-500 мМ или 100-300 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают 0,1-100 мМ ионов Mn^{2+} или их соли, такой как $MnCl_2$ (например, 0,1-100 мМ, 0,1-50 мМ, 0,1-20 мМ, 0,1-10 мМ, 0,1-5 мМ, 0,1-2 мМ, 0,5-50 мМ, 0,5-20 мМ, 0,5-15 мМ, 0,5-5 мМ, 0,5-2 мМ или 0,1-10 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают дитиотреитол (DTT) (например, 1-1000 мкМ, 1-500 мкМ, 1-200 мкМ, 50-500 мкМ, 100-500 мкМ, 100-300 мкМ, 0,1-100 мМ, 0,1-50 мМ, 0,1-20 мМ, 0,1-10 мМ, 0,1-5 мМ, 0,1-2 мМ, 0,5-50 мМ, 0,5-20 мМ, 0,5-15 мМ, 0,5-5 мМ, 0,5-2 мМ или 0,1-10 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают от 0,1 мМ до 100 мМ рибонуклеозидтрифосфата (NTP) (например, 0,1-100 мМ, 0,1-50 мМ, 0,1-10 мМ, 1-100 мМ, 1-50 мМ или 1-10 мМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают значение pH, составляющее 4-10 (например, значение pH, составляющее 5-9, значение pH, составляющее 6-9, или значение pH, составляющее 6,5-8,5). В некоторых вариантах осуществления подходящие условия включают температуру от 4°C до 50°C (например, от 10°C до 40°C, от 15°C до 40°C, от 20°C до 40°C или от 30°C до 40°C).

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид получают из дезоксирибонуклеиновой кислоты, например, дезоксирибонуклеиновой кислоты,

описанной в данном документе, такой как ДНК-вектор, линейризованный ДНК-вектор или cDNA. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается транскрипция линейного полирибонуклеотида с дезоксирибонуклеиновой кислоты путем транскрипции в бесклеточной системе (например, транскрипции *in vitro*).

В другом примере кольцевой полирибонуклеотид может быть получен в клетке, например, прокариотической клетке или эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления экзогенный полирибонуклеотид доставляют в клетку (например, линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, или молекулу ДНК, кодирующую транскрипцию линейного полирибонуклеотида, описанного в данном документе). Линейные полирибонуклеотиды могут быть транскрибированы в клетке из экзогенной молекулы ДНК, доставленной в клетку. Линейный полирибонуклеотид может быть транскрибирован в клетке с экзогенной рекомбинантной молекулы ДНК, транзитно доставленной в клетку. В некоторых вариантах осуществления экзогенная молекула ДНК не интегрируется в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид транскрибируется в клетке с рекомбинантной молекулы ДНК, которая включена в геном клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления прокариотическая клетка, содержащая полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, может представлять собой бактериальную клетку или архейную клетку. Например, прокариотическая клетка, содержащая полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, может представлять собой клетку *E coli*, галофильных архей (например, *Haloferax volcani*), *Sphingomonas*, цианобактерий (например, *Synechococcus elongatus*, *Spirulina (Arthrospira) spp.*, и *Synechocystis spp.*), *Streptomyces*, актиномицетов (например, *Nonomuraea*, *Kitasatospora* или *Thermobifida*), *Bacillus spp.* (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*), бетапротеобактерий (например, *Burkholderia*), альфапротеобактериальную клетку (например, *Agrobacterium*), клетку *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas putida*) и энтеробактерий. Прокариотические клетки могут быть выращены в среде для культивирования. Прокариотические клетки могут содержаться в биореакторе.

Клетка может представлять собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой одноклеточную эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой клетку одноклеточного гриба, такую как клетка дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae* и других представителей *Saccharomyces spp.*, *Brettanomyces spp.*, *Schizosaccharomyces spp.*, *Torulasporea spp.* и *Pichia*

spp.). В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой одноклеточную животную клетку. Одноклеточная животная клетка может представлять собой клетку, выделенную из многоклеточного животного и выращенную в культуре, или ее дочерние клетки. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная животная клетка может быть дедифференцированной. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой одноклеточную растительную клетку. Одноклеточная растительная клетка может представлять собой клетку, выделенную из многоклеточного растения и выращенную в культуре, или ее дочерние клетки. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная растительная клетка может быть дедифференцированной. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная растительная клетка получена из каллуса растения. В вариантах осуществления одноклеточная клетка представляет собой протопласт растительной клетки. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой клетку одноклеточной эукариотической водоросли, такой как одноклеточная зеленая водоросль, представитель диатомовых, эвгленовых или динофлагеллятов. Неограничивающие примеры одноклеточных эукариотических водорослей, представляющих интерес, включают *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Neochloris oleoabundans* и других представителей *Neochloris spp.*, *Protosiphon botryoides*, *Botryococcus braunii*, *Cryptococcus spp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* и других представителей *Chlamydomonas spp.* В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой клетку протиста. В некоторых вариантах осуществления одноклеточная эукариотическая клетка представляет собой клетку простейших.

В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку многоклеточного эукариота. Например, многоклеточный эукариот может быть выбран из группы, состоящей из позвоночного животного, беспозвоночного животного, многоклеточного гриба, многоклеточной водоросли и многоклеточного растения. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой позвоночное животное, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой многоклеточный гриб. В некоторых вариантах осуществления эукариотический организм представляет собой многоклеточное растение. В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку человека или клетку отличного от

человека млекопитающего, такого как отличный от человека примат (например, нечеловекообразные обезьяны, человекообразные обезьяны), копытное животное (например, полорогие, включая крупный рогатый скот, буйвола, бизона, овцу, козу и мускусного быка; свинья; представитель верблюдовых, включая верблюда, ламу и альпаку; олень, антилопа и представитель лошадиных, включая лошадь и осла), хищное млекопитающее (например, собака, кошка), грызун (например, крыса, мышь, морская свинка, хомяк, белка) или зайцеобразное (например, кролик, заяц). В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку птицы, такой как представитель таких таксонов птиц, как *Galliformes* (например, куры, индейки, фазаны, перепела), *Anseriformes* (например, утки, гуси), *Paleaognathae* (например, страусы, эму), *Columbiformes* (например, голуби, горлицы) или *Psittaciformes* (например, попугаи). В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку членистоногого (например, насекомых, арахнидов, ракообразных), нематоды, аннелиды, гельминта или моллюска. В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку многоклеточного растения, такого как покрытосеменное растение (которое может быть двудольным или однодольным) или голосеменное растение (например, хвойное, саговник, гнетовидное, гинкго), папоротник, хвощ, плаун или бриофит. В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку эукариотической многоклеточной водоросли.

Эукариотические клетки могут быть выращены в среде для культивирования.

Эукариотические клетки могут содержаться в биореакторе.

Примеры биореакторов включают без ограничения биореакторы с механическим перемешиванием (например, с полным перемешиванием) и трубчатые (например, с пульсирующим потоком) биореакторы, эрлифтные биореакторы, мембранные смесительные баки, смесительные баки с центробежным фильтром, вибросмесители, реакторы с псевдоожиженным слоем и мембранные биореакторы. Режим работы биореактора может представлять собой периодический или непрерывный процесс. Биореактор является биореактором с непрерывным режимом работы, когда потоки реагента и продукта непрерывно подаются в систему и удаляются из нее. Биореактор с периодическим режимом работы может характеризоваться непрерывным потоком рециркуляции, но не иметь непрерывной подачи реагентов или сбора продукта. Некоторые способы по настоящему изобретению направлены на крупномасштабное получение кольцевых полирибонуклеотидов. Для способов крупномасштабного получения способ может быть выполнен в объеме от 1 литра (л) до 50 л или больше (например, 5 л, 10 л, 15 л, 20 л, 25 л, 30 л, 35 л, 40 л, 45 л, 50 л или больше). В некоторых

вариантах осуществления способ может быть выполнен в объеме от 5 л до 10 л, от 5 л до 15 л, от 5 л до 20 л, от 5 л до 25 л, от 5 л до 30 л, от 5 л до 35 л, от 5 л до 40 л, от 5 л до 45 л, от 10 л до 15 л, от 10 л до 20 л, от 10 л до 25 л, от 20 л до 30 л, от 10 л до 35 л, от 10 л до 40 л, от 10 л до 45 л, от 10 л до 50 л, от 15 л до 20 л, от 15 л до 25 л, от 15 л до 30 л, от 15 л до 35 л, от 15 л до 40 л, от 15 л до 45 л или от 15 до 50 л. В некоторых вариантах осуществления биореактор может обеспечивать получение 1 г кольцевой РНК. В некоторых вариантах осуществления биореактор может обеспечивать получение 1-200 г кольцевой РНК (например, 1-10 г, 1-20 г, 1-50 г, 10-50 г, 10-100 г, 50-100 г из 50-200 г кольцевой РНК). В некоторых вариантах осуществления получаемое количество измеряют в расчете на литр (например, 1-200 г на литр), на партию или реакцию (например, 1-200 г на партию или реакцию) или на единицу времени (например, 1-200 г в час или в день). В некоторых вариантах осуществления более одного биореактора могут применяться последовательно для увеличения производственной мощности (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять биореакторов могут применяться последовательно).

Способы получения кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, описаны, например, в Khudyakov & Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications*, CRC Press (2002); в Zhao, **SYNTHETIC BIOLOGY: TOOLS AND APPLICATIONS**, (первое издание), Academic Press (2013); и Egli & Herdewijn, **CHEMISTRY AND BIOLOGY OF ARTIFICIAL NUCLEIC ACIDS**, (первое издание), Wiley-VCH (2012).

Различные способы синтеза кольцевых полирибонуклеотидов также описаны в других источниках (см., например, патент США № US6210931, патент США № US5773244, патент США № US5766903, патент США № US5712128, патент США № US5426180, публикацию заявки на патент США № US20100137407, международную публикацию № WO1992001813, международную публикацию № WO2010084371 и Petkovic et al., *Nucleic Acids Res.* 43:2454-65 (2015); полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид подвергают очистке, например, удаляют свободные рибонуклеиновые кислоты, линейную РНК или РНК с односторонним разрывом, ДНК, белки и т. п. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут быть очищены посредством любого известного способа, обычно используемого в данной области техники. Неограничивающие примеры способов очистки включают колоночную хроматографию, вырезание из геля, исключение по размеру и т. д.

Иммунизация

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают иммунизацию субъекта иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуноген экспрессируется из кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует у субъекта иммунный ответ в отношении иммуногена, экспрессируемого с кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует иммунный ответ у субъекта (например, индуцирует продуцирование антител, которые связываются с иммуногеном, экспрессируемым с кольцевого полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления иммунизация проводится с целью лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта (например, субъекта-человека). В некоторых вариантах осуществления иммунизация проводится с целью продуцирования антител у субъекта (например, продуцирования антител для очистки, например, у отличного от человека млекопитающего). В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию в одной композиции. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют вторым адъювантом. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют второй иммуногенной композицией.

Субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими любое количество кольцевых полирибонуклеотидов. Субъекта иммунизируют, например, одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 1 кольцевой полирибонуклеотид. Субъекта иммунизируют, например, одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов или большее количество отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими не более 1 кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 1 кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления

субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-15, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 4-4, 4-3, 5-20, 5-15, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 5-10, 10-15 или 15-20 отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов. Отличающиеся кольцевые полирибонуклеотиды содержат последовательности, отличающиеся друг от друга. Например, они могут включать или кодировать отличающиеся иммуногены, перекрывающиеся иммуногены, сходные иммуногены или одни и те же иммуногены (например, с одинаковыми или отличающимися регуляторными элементами, последовательностями инициации, промоторами, терминирующими элементами или другими элементами по настоящему изобретению). В случаях, когда субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов, при этом два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов могут находиться в одной и той же или отличающихся иммуногенных композициях и иммунизацию ими осуществляют в одно и то же или в разное время. Иммуногенные композиции, содержащие два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов, могут вводиться в одно и то же анатомическое место или в отличающиеся анатомические места.

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

В определенных вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят второй адъювант. Адъювант обеспечивает усиление врожденного иммунного ответа, который в свою очередь обеспечивает усиление адаптивного иммунного ответа у субъекта. Адъювант может представлять собой любой адъювант, описанный ниже. В определенных вариантах осуществления адъювант составляют с кольцевым полирибонуклеотидом в качестве части иммуногенной композиции. В определенных вариантах осуществления адъювант не является частью иммуногенной композиции, содержащей кольцевой

полирибонуклеотид. В определенных вариантах осуществления адъювант вводят отдельно от иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В данном аспекте адъювант вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличающийся от момента времени введения иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Например, адъювант вводят через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов после иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или за любое промежуточное число минут или часов до иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Например, адъювант вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней после иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней до иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Адъювант вводят в ту же анатомическую локализацию или в отличающуюся анатомическую локализацию по сравнению с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют вторым средством, например, вакциной (описанной ниже), которая не представляет собой кольцевой полирибонуклеотид. Вакцину вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличающийся от момента времени введения иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Например, вакцину вводят через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов после иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления вакцину вводят за 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3

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

Субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией любое подходящее число раз для достижения требуемого ответа. Например, для индукции системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек можно использовать стратегию иммунизации "прайм-буст". Субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению, например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 раз или больше.

В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не более 10, не более 15, не более 20 раз или меньше.

В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 раз.

В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению один раз. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению два раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их

комбинацией по настоящему изобретению три раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адьювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению четыре раза. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адьювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению пять раз. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адьювантом, вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией по настоящему изобретению семь раз.

Для разделения двух или больше иммунизаций можно выбирать подходящие промежутки времени. Промежутки времени могут относиться к многократным иммунизациям с помощью одной и той же иммуногенной композиции, адьюванта или вакцины (например, белковой субъединичной вакцины) или их комбинации, например, ту же иммуногенную композицию, адьювант или вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию можно вводить в том же количестве или в отличающихся количествах посредством того же пути иммунизации или посредством отличающихся путей иммунизации. Промежутки времени могут относиться к многократным иммунизациям с помощью отличающейся иммуногенной композиции, адьюванта или вакцины (например, белковой субъединичной вакцины) или их комбинации, например, отличающуюся иммуногенную композицию, адьювант или вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию можно вводить в том же количестве или в отличающихся количествах посредством того же пути иммунизации или посредством отличающихся путей иммунизации. Промежутки времени могут относиться к иммунизациям с помощью разных средств, например первой иммуногенной композиции, содержащей первый кольцевой полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей второй кольцевой полирибонуклеотид. Промежутки времени могут относиться к иммунизациям с помощью отличающихся средств, например, первой иммуногенной композиции, содержащей первый кольцевой полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей белковый иммуноген (например, белковую субъединицу). В некоторых примерах между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 48 или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 28 или 30 дней. В некоторых вариантах осуществления между

двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель. В некоторых примерах между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 месяцев.

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

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26 по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30 дней или больше. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не более 10, не более 15, не более 20, не более 21, не более 22, не более 23, не более 24, не более 25, не более 26, не более 27, не более 28, не более 29, не более 30, не более 32, не более 34 или не более 36 дней или меньше.

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

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или по меньшей мере 8 месяцев или больше. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8 месяцев, не более 9 месяцев, не более 10 месяцев, не более 11 месяцев или не более 12 месяцев или меньше.

В некоторых вариантах осуществления способ включает предварительное введение субъекту средства для улучшения иммуногенных ответов на кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой иммуноген, раскрытый в данном документе (например, белковый иммуноген). Например, способ включает введение белкового иммуногена за 1-7 дней до введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый иммуноген. В некоторых вариантах осуществления белковый иммуноген вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый иммуноген. Белковый иммуноген может быть введен в виде препарата на основе белка, закодирован в плазмиде (pDNA), представлен в вирусоподобной частице (VLP), составлен в липидной наночастице (LNP) или т. п.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту средства для улучшения иммуногенных ответов на кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген, после того, как субъекту ввели кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой иммуноген, раскрытый в данном документе (например, белковый иммуноген). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую белковый иммуноген. Например, способ включает введение субъекту белкового иммуногена в течение 1 года (например, в течение 11 месяцев, 10 месяцев, 9 месяцев, 8 месяцев, 7 месяцев, 6 месяцев, 5 месяцев, 4 месяцев, 3 месяцев, 2 месяцев и 1 месяца) с момента введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую иммуноген. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту любого из кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, или любой из иммуногенных композиций, описанных в данном документе, и белковой субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления белковый иммуноген имеет ту же аминокислотную последовательность, что и иммуноген, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом. Например, полипептидный иммуноген может соответствовать (например, характеризуется 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности) полипептидному иммуногену, кодируемому последовательностью кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления белковый иммуноген имеет аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности иммуногена, кодируемого

кольцевым полирибонуклеотидом. Например, полипептидный иммуноген может характеризоваться менее чем 90% (например, 80%, 70%, 30%, 20% или 10%) идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидным иммуногеном, кодируемым последовательностью кольцевого полирибонуклеотида.

Субъекта можно иммунизировать иммуногенной композицией, адъювантом или вакциной (например, белковой субъединичной вакциной) или их комбинацией в любом подходящем количестве анатомических участков. Одну и ту же иммуногенную композицию, адъювант, вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию можно вводить в несколько анатомических участков, отличающиеся иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или отличающиеся кольцевые полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию можно вводить в отличающиеся анатомические участки, отличающиеся иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или отличающиеся кольцевые полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, белковые субъединичные вакцины) или их комбинацию можно вводить в один и тот же анатомический участок или любую их комбинацию. Например, иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, можно вводить в два отличающихся анатомических участка, и/или иммуногенную композицию, содержащую кольцевой полирибонуклеотид, можно вводить в один анатомический участок, а адъювант можно вводить в отличающийся анатомический участок.

Иммунизацию с использованием двух или больше анатомических путей можно осуществлять посредством одного и того же пути иммунизации (например, внутримышечного) или посредством двух или больше путей иммунизации. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, адъювант или вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию по настоящему изобретению, проводят в по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 анатомических участках субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, адъювант или вакцину (например, белковую субъединичную вакцину) или их комбинацию по настоящему изобретению, проводят в не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9 или не более 10 анатомических участках или в меньшем количестве анатомических участков субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию иммуногенной композицией,

содержащей кольцевой полирибонуклеотид или адъювант по настоящему изобретению, проводят в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 анатомических участках субъекта.

Иммунизацию можно осуществлять любым подходящим путем. Неограничивающие примеры путей иммунизации включают внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интратекальный, интракапсулярный, внутриглазничный, внутрисердечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, транстрахеальный, подкожный, субкутикулярный, внутрисуставный, субкапсулярный, субарахноидальный, интраспинальный, эпидуральный, внутригрудинный, интрацеребральный, внутриглазной, внутриочаговый, интрацеребровентрикулярный, интрацистернальный или интрапаренхиматозный путь, например, инъекцию и инфузию. В некоторых случаях иммунизацию можно осуществлять путем ингаляции. Две или больше иммунизаций можно осуществлять одним и тем же путем или отличающимися путями.

Любое подходящее количество кольцевого полирибонуклеотида может быть введено субъекту по настоящему изобретению. Например, субъекта можно иммунизировать с помощью по меньшей мере приблизительно 1 нг, по меньшей мере приблизительно 10 нг, по меньшей мере приблизительно 100 нг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг, по меньшей мере приблизительно 100 мкг, по меньшей мере приблизительно 1 мг, по меньшей мере приблизительно 10 мг, по меньшей мере приблизительно 100 мг или по меньшей мере приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью не более чем приблизительно 1 нг, не более чем приблизительно 10 нг, не более чем приблизительно 100 нг, не более чем приблизительно 1 мкг, не более чем приблизительно 10 мкг, не более чем приблизительно 100 мкг, не более чем приблизительно 1 мг, не более чем приблизительно 10 мг, не более чем приблизительно 100 мг или не более чем приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта можно иммунизировать с помощью приблизительно 1 нг, приблизительно 10 нг, приблизительно 100 нг, приблизительно 1 мкг, приблизительно 10 мкг, приблизительно 100 мкг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 100 мг или приблизительно 1 г кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает оценку у субъекта ответа с образованием антител на введение иммуногена. В некоторых вариантах осуществления оценка проводится до и/или после введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую иммуноген.

Получение и очистка антител

Иммунизация субъекта полирибонуклеотидом, описанным в данном документе (например, полирибонуклеотидом, кодирующим иммуноген VZV), может индуцировать продуцирование антител у субъекта, которые связываются с иммуногеном, экспрессируемым с кольцевого полирибонуклеотида (например, обеспечивать продуцирование антител к VZV). В некоторых вариантах осуществления иммунизация предназначена для получения антител у субъекта (например, человека или отличного от человека животного), которые количественно определяют или очищают у субъекта (например, для диагностического или терапевтического применения). Таким образом, кольцевые полирибонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть использованы в способах получения поликлональных или моноклональных антител (например, поликлональных или моноклональных антител к VZV).

Например, в настоящем изобретении представлено введение кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе (например, кодирующего иммуноген VZV), отличному от человека животному (например, отличному от человека млекопитающему, такому как коза, свинья, кролик, крыса, мышь, лама, верблюд, лошадь, осел или крупный рогатый скот (корова)). Кольцевой полирибонуклеотид может быть введен в соответствии с любой композицией, составом, путем или введением, количеством или режимом введения доз, описанными в данном документе (например, необязательно с адьювантом, вводимым в той же композиции или как часть режима введения доз). В некоторых вариантах осуществления отличное от человека животное характеризуется наличием гуманизированной иммунной системы (например, крупный рогатый скот, характеризующийся наличием гуманизированной иммунной системы).

Плазму крови, содержащую поликлональные антитела, полученные с использованием иммуногенных композиций, содержащих кольцевые полирибонуклеотиды, раскрытые в данном документе, можно собирать у субъекта, которого иммунизировали с помощью кольцевого полирибонуклеотида. Эти поликлональные антитела можно количественно оценить (например, для диагностических целей у субъекта-человека) или очистить (например, для применения в способе лечения или для разработки моноклональных антител). Плазму крови можно собирать посредством способов, известных специалистам в данной области техники, например, посредством плазмафереза. Плазму крови можно собирать у одного и того же субъекта один раз или несколько раз, например, несколько раз, каждый раз через заданный промежуток времени после иммунизации, несколько раз после иммунизации, несколько раз между иммунизациями или при любой их комбинации.

Антитела или их фрагменты (например, поликлональные антитела, такие как человеческие или гуманизированные поликлональные антитела), которые специфически связываются с иммуногеном VZV (например, иммуногеном VZV, описанным в данном документе), могут быть получены посредством способов, описанных в данном документе. Антитела или их фрагменты могут быть очищены из крови (например, из плазмы крови или сыворотки крови) посредством способов, известных специалистам в данной области техники.

Поликлональные антитела можно подвергать очистке от плазмы крови с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, значение pH плазмы крови доводят до 4,8 (например, посредством добавления по каплям 20% уксусной кислоты), плазму крови фракционируют с помощью каприловой кислоты при соотношении каприловая кислота/общий белок, составляющем 1,0, и затем осветляют посредством центрифугирования (например, при 10000 g в течение 20 мин при комнатной температуре). Супернатант, содержащий поликлональные антитела (например, поликлональные антитела IgG), нейтрализуют до pH 7,5 с помощью 1 М Tris, фильтруют через поры диаметром 0,22 мкм и очищают посредством аффинной хроматографии с помощью колонки со специфичностью в отношении иммуноглобулина человека (например, колонки со специфичностью в отношении легкой цепи IgG человека). Поликлональные антитела дополнительно очищают посредством пропускания через колонку для аффинной хроматографии, которая специфически связывает примеси, например, отличные от человеческих антитела от животного, отличного от человека. Поликлональные антитела хранят в подходящем буфере, например, в стерилизованном фильтрацией буфере, содержащем 10 мМ мононатриевой соли глутаминовой кислоты, 262 мМ D-сорбита и Tween (0,05 мг/мл) (pH 5,5). Определяют количество и концентрацию очищенных поликлональных антител. Проводят эксклюзионную хроматографию HPLC для определения наличия агрегатов или мультимеров. В некоторых вариантах осуществления человеческие поликлональные антитела очищают от компонентов животного, отличного от человека, характеризующегося наличием гуманизированной иммунной системы, в соответствии с Beigel, JH et al. (*Lancet Infect. Dis.*, 18:410-418 (2018), включая дополнительное приложение), содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В настоящем изобретении также представлены способы получения антител у субъекта человека, например, для терапевтического лечения и/или диагностики. Например, в настоящем изобретении представлен способ количественной оценки уровня антител к VZV у субъекта после введения кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной

композиции, описанных в данном документе. Количественная оценка может быть выполнена посредством способов, известных из уровня техники (например, определение титра антитела), например, посредством получения образца крови от субъекта и количественной оценки уровня антител к VZV с использованием стандартных методик, таких как иммуноферментный анализ (ELISA). Антитела также могут быть очищены посредством способов, известных специалистам в данной области техники.

Адьюванты

Адьювант обеспечивает усиление иммунных ответов (гуморального и/или клеточного), вызываемых у субъекта, который получает адьювант и/или иммуногенную композицию, содержащую адьювант. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят адьювант, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в способах, описанных в данном документе, применяется адьювант для получения иммунного ответа, как описано в данном документе. В конкретном варианте осуществления адьювант применяют для содействия иммунному ответу у субъекта на иммуноген, экспрессируемый кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления адьювант и полирибонуклеотид вводят совместно в виде отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления адьювант смешивают или составляют с полирибонуклеотидом в одной композиции и вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления адьювант и кольцевой полирибонуклеотид вводят совместно в отдельных композициях. В некоторых вариантах осуществления адьювант смешивают или составляют с кольцевым полирибонуклеотидом в виде одной композиции с получением иммуногенной композиции, которую вводят субъекту.

Адьювант может представлять собой компонент кольцевого полирибонуклеотида (например, полирибонуклеотидной последовательности), может представлять собой полипептидный адьювант, кодируемый экспрессионной последовательностью полирибонуклеотида, может представлять собой молекулу (например, малую молекулу, полипептид или молекулу нуклеиновой кислоты), которая не кодируется полирибонуклеотидом. Адьювант может быть составлен с полирибонуклеотидом в одной и той же фармацевтической композиции. Адьювант может вводиться отдельно (например, в виде отдельной фармацевтической композиции) в комбинации с полирибонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления адьювант кодируется кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует более одного адьюванта. Например, кольцевой полирибонуклеотид кодирует от 2 до 100 адьювантов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует от 2 до 10 адьювантов. В

некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует 2 адьюванта. Один или несколько адьювантов, кодируемых кольцевым полирибонуклеотидом, могут содержать N-концевую сигнальную последовательность, например, такую, которая направляет экспрессируемый полипептидный адьювант по секреторному пути. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 3 адьюванта. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 4 адьюванта. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 5 адьювантов. В некоторых вариантах осуществления адьювант кодируется тем же полирибонуклеотидом, который кодирует один или несколько иммуногенов. Адьювант(-ы) и иммуноген(-ы) могут быть совместно доставлены на одном и том же полирибонуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления адьювант, кодируемый полирибонуклеотидом, представляет собой последовательность (например, полирибонуклеотидную последовательность), которая является стимулятором врожденной иммунной системы. Последовательность стимулятора врожденной иммунной системы может содержать по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100 или по меньшей мере 500 рибонуклеотидов. Последовательность стимулятора врожденной иммунной системы может содержать от 5 до 1000, от 10 до 500, от 20 до 500, от 10 до 100, от 20 до 100, от 20 до 50, от 100 до 500, от 500 до 1000 или от 10 и 1000 рибонуклеотидов. Например, последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы, может быть выбрана из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

Адьюванты могут представлять собой адьювант TH1 и/или адьювант TH2.

Дополнительные адьюванты, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают без ограничения одно или несколько из следующего.

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

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

Малые молекулы. Малые молекулы, пригодные для применения в качестве адъювантов, включают имиквимод или 847, резиквимод или R848 и гардиквимод.

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

Сапонин (т. е. гликозид, полициклические агликоны, присоединенные к одной или нескольким сахарным боковым цепям). Составы на основе сапонины, подходящие для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включают очищенные составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOM и матрица ISCOM. QS21 представлен на рынке как STIMULON (TM). Составы на основе сапонины могут также предусматривать стерин, такой как холестерин. Комбинации сапонинов и холестерин могут применяться для образования уникальных частиц, называемых иммуностимулирующими комплексами (ISCOM). ISCOM, как правило, также содержат фосфолипид, такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. Любой известный сапонин можно применять в ISCOM. Предпочтительно ISCOM предусматривает один или несколько из QuilA, QHA и QHC. Необязательно ISCOM могут быть лишены дополнительного детергента.

Липополисахариды. Адъюванты, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают нетоксичные производные энтеробактериального липополисахарида (LPS). Такие производные включают монофосфорил-липид А (MPLA), глюкопиранозил-липид А (GLA) и 3-О-деацелированный MPL (3dMPL). 3dMPL представляет собой смесь 3-О-деацелированного монофосфорил-липид А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. Другие нетоксичные производные LPS включают миметики монофосфорил-липид А, такие как производные аминоалкилглюкозаминидфосфата (например, RC-529).

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

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

Липопептиды (т. е. соединения, содержащие один или несколько остатков жирных кислот и два или больше аминокислотных остатков). Липопептид, подходящий для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении, включает Pam2 (Pam2CSK4) и Pam3 (Pam3CSK4).

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

Пептиды и пептидогликаны (синтетические или очищенные), полученные из грамотрицательных или грамположительных бактерий, такие как MDP (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин), являются подходящими для применения в качестве адъюванта в настоящем изобретении.

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

Адъюванты на основе РНК. Адъюванты на основе РНК, подходящие для применения в настоящем изобретении, представляют собой поли(IC), поли(IC:LC), шпилечные РНК с 5'-трифосфатом или без него, вирусные последовательности, поли(U)-содержащую последовательность, природные или синтетические РНК-последовательности dsRNA (например, поли(I:C)) и аналоги нуклеиновой кислоты (например, циклический GMP-AMP или другие циклические динуклеотиды, например, циклический ди-GMP, иммуностимулирующие аналоги оснований, например, C8-замещенные и N7,C8-дизамещенные по гуанину рибонуклеотиды). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой аналог кольцевого полирибонуклеотида, представляющий собой линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе.

Адъюванты на основе ДНК. Адъюванты на основе ДНК, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают CpG (например, CpG1018), dsDNA и природные или синтетические иммуностимулирующие последовательности ДНК.

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

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

Адьювант для применения в настоящем изобретении может быть получен из бактерий, например, флагеллин, LPS или бактериальный токсин (например, энтеротоксины (белок), например, термоллабильный токсин или холерный токсин). Адьювант для применения в настоящем изобретении может представлять собой гибридную молекулу, такую как CpG, конъюгированную с имиквимодом. Адьювант для применения в настоящем изобретении может представлять собой ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, такой как хитин или бета-глюкан. В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет собой неорганическую наночастицу, такую как золотые наностержни или наночастицы на основе диоксида кремния (например, наночастицы на основе мезопористого диоксида кремния (MSN)). В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет собой многокомпонентный адьювант или систему на основе адьюванта, такие как AS01 (AS01B), AS03, AS04 (MLP5 + квасцы), квасцы (смесь гидроксида алюминия и гидроксида магния), гидроксид алюминия, гидроксид магния, CFA (полный адьювант Фрейнда: IFA + пептидогликан + димиколят трегалозы), CAF01 (двухкомпонентная система, состоящая из среды-носителя на основе катионной липосомы (диметилдиоктадециламмония (DDA)), стабилизированной с помощью гликолипидного иммуномодулятора (6,6-дибегената трегалозы (TDB), который может представлять собой синтетический вариант фактора жгутообразования, расположенного в клеточной стенке микобактерий).

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

Хемокины. Адьювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие хемокин, такой как MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes или TCA-3.

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

Адьювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие стимулятор врожденной иммунной системы (частичный, полноразмерный или мутированный), такой как TLR4, TLR3, TLR3, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 или MDA-5/IFIH1, или

конститутивно активный (са) стимулятор врожденного иммунитета, такой как саTLR4, саTLR3, саTLR3, саTLR9, саTLR7, саTLR8, саTLR7, саRIG-I/DDX58 или саMDA-5/IFIH1.

Адьювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие адапторную или сигнальную молекулу, такую как STING (например, саSTING), TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, ИКК-альфа, комплекс ИКК, TBK1, бета-катенин и каспаза 1.

Адьювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие активатор транскрипции, такой как активатор транскрипции, который обладает способностью усиливать иммунный ответ (например, AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 или IRF5). Адьювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую рецептор цитокина, такой как IL-2-бета, IFN-гамма или IL-6.

Адьювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие бактериальный компонент, такой как флагеллин или MBL.

Адьювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид или mRNA), кодирующие любой компонент врожденной иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий один или несколько иммуногенов, в комбинации с адьювантом (например, адьювантом, который представляет собой молекулярную единицу, отдельную от кольцевого полирибонуклеотида, или адьювантом, который кодируется отдельным полирибонуклеотидом). Термин "в комбинации с", используемый в данном описании, предусматривает любые две композиции, вводимые в качестве части терапевтического режима. Это может предусматривать, например, полирибонуклеотид и адьювант, составленные в виде одной фармацевтической композиции. Это также предусматривает, например, полирибонуклеотид и адьювант, вводимые субъекту в виде отдельных композиций в соответствии с определенным терапевтическим режимом или режимом введения доз. Адьювант можно вводить субъекту до, по сути одновременно или после введения полирибонуклеотида. Адьювант можно вводить в пределах 1 дня, 2 дней, 5 дней, 10 дней, 20 дней, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев до или после введения полирибонуклеотида. Адьювант можно вводить тем же путем введения (например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутривенно, внутривенно, внутривенно, местно или перорально), что и полирибонуклеотид, или отличающимся путем.

Доставка

Кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может быть включен в фармацевтические композиции с носителем или без носителя.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены, например, таким образом, чтобы они содержали носитель, такой как фармацевтический носитель и/или полимерный носитель, например, липосому, и доставляться посредством известных способов нуждающемуся в этом субъекту (например, человеку или отличному от человека сельскохозяйственному или домашнему животному, например, крупному рогатому скоту, собаке, кошке, лошади, домашней птице). Такие способы включают без ограничения трансфекцию (например, опосредованную липидами, катионными полимерами, фосфатом кальция, дендримерами); электропорацию или другие способы разрушения мембран (например, нуклеофекцию), вирусную доставку (например, с помощью лентивируса, ретровируса, аденовируса, AAV), микроинъекцию, бомбардировку микрочастицами ("генную пушку"), использование *fugene*, прямую ультразвуковую нагрузку, сдавливание клеток, оптическую трансфекцию, слияние протопластов, импалефекцию, магнитофекцию, перенос, опосредованный экзосомами, перенос, опосредованный липидными наночастицами, и любую их комбинацию. Способы доставки также описаны, например, в Gori et al., *Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. Human Gene Therapy. July 2015, 26(7): 443-451. doi:10.1089/hum.2015.074*; и Zuris et al. *Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. Nat Biotechnol. 2014 Oct 30;33(1):73-80.*

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут быть доставлены в составе для доставки в "голом" виде. Состав для доставки в "голом" виде обеспечивает доставку кольцевого полирибонуклеотида в клетку без помощи носителя и без ковалентной модификации кольцевого полирибонуклеотида или частичной или полной инкапсуляции кольцевого полирибонуклеотида.

Состав для доставки в "голом" виде представляет собой состав, который не содержит носителя, и в котором кольцевой полирибонуклеотид не имеет ковалентной модификации, которая связывает компонент, способствующий доставке в клетку, и при этом кольцевой полирибонуклеотид не является частично или полностью инкапсулированным. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид не является ковалентно связанным с компонентом, таким как белок, малая молекула, частица, полимер или биополимер, который способствует доставке в клетку. В некоторых

вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут доставляться в составе для доставки с протамином или солью протамин (например, сульфатом протамин).

Полирибонуклеотид без ковалентной модификации, который связывается с компонентом, способствующим доставке в клетку, может не содержать модифицированную фосфатную группу. Например, полирибонуклеотид без ковалентной модификации, который связывается с компонентом, способствующим доставке в клетку, может не содержать тиофосфатов, фосфороселенатов, боранофосфатов, сложных эфиров боранофосфатов, гидрофосфонатов, фосфорамидатов, фосфородиамидатов, алкил- или арилфосфонатов или фосфотриэфиров.

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде может не содержать некоторых или всех реагентов из следующих: реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. Например, состав для доставки в "голом" виде может не содержать фитогликогена октенилсукцината, фитогликогена бета-декстрина, модифицированного ангидридом фитогликогена бета-декстрина, липофектамина, полиэтиленimina, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимина, аминогликозид-полиамина, дидезоксиамино-b-циклодекстрина, спермина, спермидина, поли(2-диметиламино)этилметакрилата, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированного желатина, дендримеров, хитозана, 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), хлорида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорида 1-[2-(олеилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолия (DOTIM), трифторацетата 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорида 3β-[N-(N,N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HC1), дигептадециламидогилицилспермидина (DOGS), бромида N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромида N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопротеина низкой плотности (LDL), липопротеина высокой плотности (HDL) или глобулина.

Состав для доставки в "голом" виде может содержать вспомогательное вещество, отличное от носителя. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество, отличное от носителя, может содержать неактивный ингредиент, который не проявляет активного эффекта способствования проникновению в клетку. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество, отличное от носителя, может содержать буфер, например PBS. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество,

отличное от носителя, может представлять собой растворитель, неводный растворитель, разбавитель, суспендирующее средство, поверхностно-активное средство, изотоническое средство, загуститель, эмульгатор, консервант, полимер, пептид, белок, клетку, гиалуронидазу, диспергирующее средство, гранулирующее средство, средство для улучшения распадаемости, связывающее средство, буферное средство, смазывающее средство или масло.

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

В некоторых вариантах осуществления состав содержит средство, способствующее проникновению в клетку. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой состав для местного применения и содержит средство, способствующее проникновению в клетку. Средство, способствующее проникновению в клетку, может включать органические соединения, такие как спирты, содержащие одну или несколько функциональных гидроксильных групп. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, включает спирт, такой как без ограничения одноатомные спирты, многоатомные спирты, ненасыщенные алифатические спирты и алициклические спирты. Средство, способствующее проникновению в клетку, может включать один или несколько из метанола, этанола, изопропанола, феноксиэтанола, триэтанолamina, фенилэтилового спирта, бутанола, пентанола, цетилового спирта, этиленгликоля, пропиленгликоля, денатурированного спирта, бензилового спирта, специально денатурированного спирта, гликоля, стеарилового спирта, цетеарилового спирта, ментола,

полиэтиленгликоля (PEG)-400, этоксилированных жирных кислот или гидроксиэтилцеллюлозы. В определенных вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, содержит этанол. Средства, способствующие проникновению в клетку, могут включать любое средство, способствующее проникновению в клетку, в любом количестве или в любом составе, как описано в WO 2020/180751 или WO 2020/180752, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат, раскрытый в данном документе, фармацевтическая композиция, раскрытая в данном документе, фармацевтическое лекарственное вещество, раскрытое в данном документе, или фармацевтический лекарственный продукт, раскрытый в данном документе, находятся в системе парентеральной доставки нуклеиновой кислоты. Система парентеральной доставки нуклеиновой кислоты может содержать фармацевтический препарат, раскрытый в данном документе, фармацевтическую композицию, раскрытую в данном документе, фармацевтическое лекарственное вещество, раскрытое в данном документе, или фармацевтический лекарственный продукт, раскрытый в данном документе, и разбавитель, приемлемый для парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат, раскрытый в данном документе, фармацевтическая композиция, раскрытая в данном документе, фармацевтическое лекарственное вещество, раскрытое в данном документе, или фармацевтический лекарственный продукт, раскрытый в данном документе, в системе парентеральной доставки нуклеиновой кислоты не содержат какого-либо носителя.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на хозяина или клетку-хозяина, содержащих кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления хозяин или клетка-хозяин являются позвоночным, млекопитающим (например, человеком) или другим организмом или клеткой.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид вызывает сниженный нежелательный ответ иммунной системы хозяина или неспособен его вызывать по сравнению с ответом, запускаемым эталонным соединением, например, линейным полинуклеотидом, соответствующим описанному кольцевому полирибонуклеотиду. В вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является неиммуногенным в организме хозяина. Некоторые иммунные ответы включают без ограничения гуморальные иммунные ответы (например, продуцирование иммуногенспецифических антител) и клеточноопосредованные иммунные ответы (например, пролиферацию лимфоцитов).

В некоторых вариантах осуществления хозяина или клетку-хозяина приводят в контакт с кольцевым полирибонуклеотидом (например, им его доставляют или вводят). В некоторых вариантах осуществления хозяин является млекопитающим, таким как человек. Количество кольцевого или линейного полирибонуклеотида, продукта экспрессии или их обоих у хозяина может быть измерено в любое время после введения. В определенных вариантах осуществления определяют динамику роста хозяина в культуре. Если темпы роста повышаются или снижаются в присутствии кольцевого полирибонуклеотида или линейного, то кольцевой полирибонуклеотид, или продукт экспрессии, или они оба идентифицируются как эффективные в отношении повышения или снижения темпов роста хозяина.

Способ доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанный в данном документе, в клетку, ткань или субъекту включает введение фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, описанных в данном документе, в клетку, ткань или субъекту.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку копытного. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой соединительную ткань, мышечную ткань, нервную ткань или эпителиальную ткань. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой орган (например, печень, легкое, селезенку, почку и т. п.).

В некоторых вариантах осуществления способ доставки представляет собой способ *in vivo*. Например, способ доставки кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, включает парентеральное введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В качестве другого примера способ доставки кольцевого полирибонуклеотида в клетку или ткань субъекта включает парентеральное введение в клетку или ткань фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид присутствует в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать биологический ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид

присутствует в количестве, эффективном для оказания биологического эффекта на клетку или ткань субъекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, содержат носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, содержат разбавитель и не содержат какого-либо носителя.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят внутривенно, внутриартериально, внутривентриально, внутримышечно, внутримышечно, внутримышечно, внутримышечно, внутримышечно, интратекально, интралимфатически, подкожно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение осуществляется внутривенно, внутримышечно, офтальмологически, подкожно, внутримышечно или местно.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, вводят местно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят интратрахеально.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят с помощью инъекции. Введение может являться системным введением или местным введением. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе способов доставки осуществляется с использованием носителя. В некоторых вариантах осуществления любые описанные в данном документе способы доставки осуществляются без использования носителя или средства, способствующего проникновению в клетку.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид или продукт, полученный в результате трансляции из кольцевого полирибонуклеотида, выявляют в клетке, ткани или в организме субъекта через по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня или по меньшей мере 5 дней после стадии введения. В некоторых вариантах осуществления присутствие кольцевого полирибонуклеотида или продукта, полученного в результате трансляции из кольцевого полирибонуклеотида, оценивают в клетке, ткани или в организме субъекта перед стадией введения. В некоторых вариантах осуществления присутствие кольцевого полирибонуклеотида или продукта, полученного в результате трансляции из кольцевого полирибонуклеотида, оценивают в клетке, ткани или в организме субъекта после стадии введения.

Составы

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид) или препарат на его основе, полученный посредством способов, описанных в данном документе, может быть составлен в виде композиции, например, композиции для доставки в клетку, растение, беспозвоночное животное, позвоночное животное, отличное от человека, или субъекта-человека, например, композиции для применения в сельском хозяйстве, ветеринарной или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид составлен в виде фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, адъювант или их комбинацию. В конкретном варианте осуществления композиция содержит полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и носитель или разбавитель, не содержащий какого-либо носителя. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая полирибонуклеотид с разбавителем, не содержащим какого-либо носителя, применяется для доставки в "голом" виде полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида) субъекту.

Фармацевтические композиции могут необязательно содержать одно или несколько дополнительных активных веществ, например, терапевтически и/или профилактически активных веществ. Фармацевтические композиции могут необязательно содержать неактивное вещество, которое служит средой-носителем или средой для композиций, описанных в данном документе (например, композиций, содержащих кольцевые полирибонуклеотиды, такие как любой из неактивных ингредиентов, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и приведенных в базе данных неактивных ингредиентов). Фармацевтические

композиции по настоящему изобретению могут быть стерильными и/или апирогенными. Общие соображения относительно составления и/или изготовления фармацевтических средств можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (включенной в данный документ посредством ссылки). Неограничивающие примеры неактивного вещества включают растворители, водные растворители, неводные растворители, дисперсионные среды, разбавители, дисперсии, суспендирующие средства, поверхностно-активные средства, изотонические средства, загустители, эмульгаторы, консерванты, полимеры, пептиды, белки, клетки, гиалуронидазы, диспергирующие средства, гранулирующие средства, средства для улучшения распадаемости, связывающие средства, буферные средства (например, фосфатно-солевой буфер (PBS)), смазывающие средства, масла и их смеси.

Хотя описания фармацевтических композиций, представленных в данном документе, главным образом направлены на фармацевтические композиции, которые являются подходящими для введения людям, специалисту в данной области будет понятно, что такие композиции в целом являются подходящими для введения любому другому животному, например, отличным от человека животным, например, отличным от человека млекопитающим. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения людям, для того, чтобы сделать композиции подходящими для введения различным животным, является широко распространенной, и средний специалист в области ветеринарной фармакологии может разработать и/или осуществить такую модификацию путем проведения лишь обычных экспериментов в случае необходимости в таковых. Субъекты, для которых рассматривается введение фармацевтических композиций, включают без ограничения людей и/или других приматов; млекопитающих, в том числе коммерчески значимых млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, мыши и/или крысы; и/или птиц, в том числе коммерчески значимых птиц, таких как домашняя птица, куры, утки, гуси и/или индейки.

Составы на основе фармацевтических композиций, описанных в данном документе, могут быть получены посредством любого способа, известного или разработанного в будущем в области фармакологии. Как правило, такие способы получения включают стадию объединения активного ингредиента со вспомогательным веществом и/или одним или несколькими другими вспомогательными ингредиентами и затем, при необходимости и/или при желании, разделения, придания формы и/или упаковки продукта.

В некоторых вариантах осуществления эталонным критерием количества молекул линейных полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, является наличие не более 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50

нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 г/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл, 600 мкг/мл, 700 мкг/мл, 800 мкг/мл, 900 мкг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл или 2 мг/мл молекул линейных полирибонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества молекул кольцевых полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, составляет по меньшей мере 30% (вес/вес), 40% (вес/вес), 50% (вес/вес), 60% (вес/вес), 70% (вес/вес), 80% (вес/вес), 85% (вес/вес), 90% (вес/вес), 91% (вес/вес), 92% (вес/вес), 93% (вес/вес), 94% (вес/вес), 95% (вес/вес), 96% (вес/вес), 97% (вес/вес), 98% (вес/вес), 99% (вес/вес), 99,1% (вес/вес), 99,2% (вес/вес), 99,3% (вес/вес), 99,4% (вес/вес), 99,5% (вес/вес), 99,6% (вес/вес), 99,7% (вес/вес), 99,8% (вес/вес), 99,9% (вес/вес) или 100% (вес/вес) от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества линейных молекул полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, составляет не более 0,5% (вес/вес), 1% (вес/вес), 2% (вес/вес), 5% (вес/вес), 10% (вес/вес), 15% (вес/вес), 20% (вес/вес), 25% (вес/вес), 30% (вес/вес), 40% (вес/вес), 50% (вес/вес) молекул линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом, присутствующих в препарате, составляет не более 0,5% (вес/вес), 1% (вес/вес), 2% (вес/вес), 5% (вес/вес), 10% (вес/вес) или 15% (вес/вес) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества совокупных молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом и линейных полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, составляет не более 0,5% (вес/вес), 1% (вес/вес), 2% (вес/вес), 5% (вес/вес), 10% (вес/вес), 15% (вес/вес), 20% (вес/вес), 25% (вес/вес), 30% (вес/вес), 40% (вес/вес), 50% (вес/вес) совокупных молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом и линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат представляет собой промежуточный фармацевтический препарат конечного лекарственного продукта на основе кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат представляет собой лекарственное вещество или активный фармацевтический ингредиент (API). В некоторых вариантах осуществления

фармацевтический препарат представляет собой лекарственный продукт для введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевых полирибонуклеотидов дополнительно обрабатывают (до, во время или после восстановления линейной РНК) для удаления значительного количества ДНК, контаминации белками (например, клеточным белком, таким как белок клетки-хозяина или технологические белковые примеси), эндотоксином, молекулами моонуклеотидов и/или производственной примесью.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, может содержать: (i) соединение (например, кольцевой полирибонуклеотид), раскрытое в данном документе; (ii) буфер; (iii) неионогенный детергент; (iv) средство, регулирующее тоничность; и/или (v) стабилизатор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, представляет собой стабильный жидкий фармацевтический состав. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав, раскрытый в данном документе, содержит протамин или соль протамина (например, сульфат протамина).

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

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению применяются для повышения иммунного ответа у субъекта. Иммунный ответ предпочтительно является защитным и предпочтительно включает ответ с образованием антител (обычно включая IgG) и/или клеточноопосредованный иммунный ответ. Например, субъекта иммунизируют иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению, для индуцирования иммунного ответа. В качестве другого примера субъекта иммунизируют иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, содержащий иммуноген, для стимуляции выработки антител, которые связываются с иммуногеном. Повышая иммунный ответ у субъекта посредством этих вариантов

применения и способов, можно обеспечить защиту субъекта от различных заболеваний и/или инфекций, например, от бактериальных и/или вирусных заболеваний, обсуждаемых выше. В определенных вариантах осуществления иммуногенные композиции представляют собой вакцинные композиции. Вакцины согласно настоящему изобретению могут быть либо профилактическими (т. е. для предупреждения инфекции), либо терапевтическими (т. е. для лечения инфекции), но, как правило, являются профилактическими. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, например, человека. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека. В других вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, например, выбранное из коровы (например, молочного и мясного скота), овцы, козы, свиньи, лошади, собаки или кошки. В других вариантах осуществления субъект представляет собой птицу, например, курицу или петуха, индейку, попугая. В некоторых вариантах осуществления животное не представляет собой мышь, кролика или корову. В конкретном варианте осуществления, где иммуногенная композиция предназначена для профилактического применения, человек представляет собой ребенка (например, ребенка ясельного возраста или ребенка грудного возраста) или подростка. В другом варианте осуществления, где иммуногенная композиция предназначена для терапевтического применения, человек представляет собой подростка или взрослого. Иммуногенная композиция, предназначенная для детей, может также вводиться взрослым, например, для оценки безопасности, дозировки, иммуногенности и т. п.

Иммуногенная композиция, полученная согласно настоящему изобретению, может применяться для лечения как детей, так и взрослых. Возраст субъекта-человека может составлять менее 1 года, менее 5 лет, от 1 до 5 лет, от 5 до 15 лет, от 15 до 55 лет или по меньшей мере 55 лет. В конкретном варианте осуществления субъекты-люди, для которых предусмотрено получение иммуногенных композиций, представляют собой пожилых людей (например, ≥ 50 лет, ≥ 60 лет и ≥ 65 лет), молодых людей (например, ≤ 5 лет), госпитализированных пациентов, медицинских работников, военнослужащих и военный персонал, беременных женщин, больных с хроническими заболеваниями или пациентов с иммунодефицитом. Однако иммуногенные композиции подходят не только для данных групп и могут применяться более широко в популяции.

В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют с использованием адъюванта. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют вакциной.

Консерванты

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может содержать материал для однократного введения или может содержать материал для многократного введения (например, "многодозовый" набор). Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме. Композиция или фармацевтическая композиция может содержать один или несколько консервантов, таких как тиомерсал или 2-феноксизтанол. Консерванты могут применяться для предупреждения микробного загрязнения во время применения. Подходящие консерванты включают: хлорид бензалкония, тимеросал, хлорбутанол, метилпарабен, пропилпарабен, фенилэтиловый спирт, динатрия эдетат, сорбиновую кислоту, Onamer M или другие средства, известные специалистам в данной области техники. В офтальмологических продуктах, например, такие консерванты могут применяться на уровне от 0,004% до 0,02%. В композициях, описываемых в данном документе, консервант, например, хлорид бензалкония, может применяться в количестве от 0,001% до менее чем 0,01%, например, от 0,001% до 0,008%, предпочтительно приблизительно 0,005% по весу.

Полирибонуклеотиды могут быть восприимчивы к РНКазе, которая может находиться в избытке в окружающей среде. Композиции, представленные в данном документе, могут включать реагенты, которые ингибируют активность РНКазы, тем самым предохраняя полирибонуклеотид от разрушения. В некоторых случаях композиция или фармацевтическая композиция содержит любой ингибитор РНКазы, известный специалисту в данной области техники. В качестве альтернативы или дополнительно, полирибонуклеотид и средство, способствующее проникновению в клетку, и/или фармацевтически приемлемые разбавители или носители, среды-носители, вспомогательные вещества или другие реагенты в композиции, представленной в данном документе, могут быть получены в среде, не содержащей РНКазы. Композиция может быть составлена в среде, не содержащей РНКазы.

В некоторых случаях композиция, представленная в данном документе, может являться стерильной. Композиция может быть составлена в виде стерильного раствора или суспензии в подходящих средах-носителях, известных из уровня техники. Композицию можно подвергать стерилизации посредством обычных известных методик стерилизации, например, композицию можно подвергать стерилизующей фильтрации.

Соли

В некоторых случаях композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит одну или несколько солей. Для контроля тоничности в композицию, представленную в данном документе, может быть включена

физиологическая соль, такая как натриевая соль. Другие соли могут включать хлорид калия, дигидрофосфат калия, динатрийфосфат и/или хлорид магния и т. п. В некоторых случаях композиция составлена с одной или несколькими фармацевтически приемлемыми солями. Одна или несколько фармацевтически приемлемых солей могут включать соли неорганических ионов, таких как, например, ионы натрия, калия, кальция, магния и т. п. Такие соли могут включать соли с неорганическими или органическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, азотная кислота, серная кислота, метансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, уксусная кислота, фумаровая кислота, янтарная кислота, молочная кислота, миндальная кислота, яблочная кислота, лимонная кислота, винная кислота или малеиновая кислота. Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

Буферы/pH

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может содержать один или несколько буферов, таких как Tris-буфер; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер (например, с адьювантом, представляющим собой гидроксид алюминия) или цитратный буфер. Буферы в некоторых случаях содержатся в диапазоне 5-20 мМ.

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может иметь значение pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,5, от приблизительно 6,0 до приблизительно 8,0, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5 или от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,8. Композиция или фармацевтическая композиция может иметь значение pH приблизительно 7. Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

Детергенты/поверхностно-активные вещества

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может содержать один или несколько детергентов и/или поверхностно-активных веществ, в зависимости от предполагаемого пути введения, например, поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемые "Tween"), например, полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), продаваемые под торговой маркой DOWFAX™, такие как линейные блок-сополимеры EO/PO; октоксинолы, которые могут различаться по числу повторяющихся этокси(окси-1,2-этандиильных) групп, например, октоксинол-9 (Triton X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (лецитин); этоксилаты нонилфенола, такие как серия Tergitol™ NP;

эфиры полиоксиэтилена и жирных кислот, полученные из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известные как поверхностно-активные вещества Brij), такие как монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30), и сложные эфиры сорбитана (широко известные как "SPAN"), такие как сорбитантриолеат (Span 85) и сорбитанмонолаурат, октоксинол (такой как октоксинол-9 (Triton X-100) или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол), бромид цетилтриметиламмония ("СТАВ") или дезоксихолат натрия. Один или несколько детергентов и/или поверхностно-активных веществ могут присутствовать только в следовых количествах. В некоторых случаях композиция может содержать менее 1 мг/мл каждого из октоксинола-10 и полисорбата 80. В данном документе могут применяться неионогенные поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества можно классифицировать по их "HLB" (гидрофильно-липофильный баланс). В некоторых случаях поверхностно-активные вещества обладают HLB по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 и/или по меньшей мере 16.

Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

Разбавители

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

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

Вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой любой из неактивных ингредиентов, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством продуктов и лекарственных средств (FDA) Соединенных Штатов Америки и перечисленных в Базе данных неактивных ингредиентов, который не демонстрирует эффекта способствования проникновению в клетку. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой любой неактивный ингредиент, подходящий для введения животному, отличному от человека, например, подходящий для ветеринарного

применения. Модификация композиций, подходящих для введения людям, для того, чтобы сделать композиции подходящими для введения различным животным, является широко распространенной, и специалист средней квалификации в области ветеринарной фармакологии может разработать и/или осуществить такую модификацию путем проведения лишь обычных экспериментов в случае необходимости таковых.

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

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

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде не содержит каких-либо или всех из реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде не содержит фитогликогена октенилсукцината, фитогликогена бета-декстрина, модифицированного ангидридом фитогликогена бета-декстрина, липофектамина, полиэтиленimina, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленimina, аминокликозид-полиамина, дидезоксиамино- β -циклодекстрина, спермина, спермидина, поли(2-

диметиламино)этилметакрилата, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированного желатина, дендримеров, хитозана, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), хлорида N-[1-(2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорида 1-[2-(олеоилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолия (DOTIM), трифторацетата 2,3-диолеоилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорида 3β-[N—(N,N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HC1), дигептадециламидоглицилспермидина (DOGS), бромиды N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромиды N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопroteина низкой плотности (LDL), липопroteина высокой плотности (HDL) или глобулина.

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

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

Gly-Gly, бичин или фосфат. Примеры изотонического средства включают глицерин, маннит, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, трегалозу или сахарозу.

Носители

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

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

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в клетке, везикуле или другом носителе на основе мембран, или такой кольцевой полирибонуклеотид обеспечивается с их помощью. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в липосомах или других сходных везикулах. Липосомы представляют собой сферические везикулярные структуры, состоящие из одно- или многослойного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и относительно непроницаемого внешнего липофильного фосфолипидного бислоя. Липосомы могут быть анионными, нейтральными или катионными. Липосомы являются биосовместимыми, нетоксичными, могут доставлять как гидрофильные, так и липофильные молекулы лекарственных средств, защищать свой "груз" от разрушения под действием ферментов плазмы крови и транспортировать свою нагрузку через биологические мембраны и гематоэнцефалический барьер (BBB) (обзор см., например, в Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, vol. 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679).

Везикулы можно получать из нескольких отличающихся типов липидов; однако для образования липосом в качестве носителей лекарственных средств чаще всего используются фосфолипиды. Способы получения многослойных липидных везикул известны из уровня техники (см., например, патент США № 6693086, идеи которого, относящиеся к получению многослойных липидных везикул, включены в данный документ посредством ссылки). Хотя образование везикул может быть спонтанным при смешивании липидной пленки с водным раствором, его также можно ускорить путем применения силы в форме встряхивания с применением гомогенизатора, соникатора или экструзионного аппарата (обзор см., например, в Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, vol. 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679). Экструдированные липиды можно получать посредством экструзии через фильтры с уменьшающимся размером пор, как описано в работе Templeton et al., *Nature Biotech*,

15:647-652, 1997, идеи которой, относящиеся к получению экструдированных липидов, включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит кольцевой полирибонуклеотид и липидные наночастицы, например липидные наночастицы, описанные в данном документе. Липидные наночастицы представляют собой другой пример носителя, который обеспечивает биосовместимую и биоразлагаемую систему доставки для молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Наноструктурированные липидные носители (NLC) представляют собой модифицированные твердые липидные наночастицы (SLN), которые сохраняют характеристики SLN, улучшают стабильность и емкость загрузки лекарственного средства и предупреждают утечку лекарственного средства. Полимерные наночастицы (PNP) являются важным компонентом для доставки лекарственных средств. Эти наночастицы могут эффективно направлять доставку лекарственного средства к конкретным мишеням и улучшать стабильность лекарственного средства и контролируемое высвобождение лекарственного средства. Также можно использовать липидно-полимерные наночастицы (PLN), новый тип носителя, который является комбинацией липосом и полимеров. Эти наночастицы обладают взаимодополняющими преимуществами PNP и липосом. PLN состоит из структуры сердцевина-оболочка; полимерная сердцевина обеспечивает стабильную структуру, а фосфолипидная оболочка обеспечивает хорошую биосовместимость. Таким образом, эти два компонента обеспечивают повышение показателя эффективности инкапсуляции лекарственного средства, способствуют модификации поверхности и предупреждают утечку водорастворимых лекарственных средств. Обзор см., например, в Li et al. 2017, *Nanomaterials* 7, 122; doi:10.3390/nano7060122.

Дополнительные неограничивающие примеры носителей включают углеводные носители (например, ангидрид-модифицированный фитогликоген или материал типа гликогена), белковые носители (например, белок, ковалентно связанный с кольцевым полирибонуклеотидом), или катионные носители (например, катионный липополимер или реагент для трансфекции). Неограничивающие примеры углеводных носителей включают фитогликоген октенилсукцинат, фитогликоген бета-декстрин, модифицированный ангидридом фитогликоген бета-декстрин. Неограничивающие примеры катионных носителей включают липофектамин, полиэтиленимин, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимин, аминокликозид-полиамин, дидезоксиамино-*b*-циклодекстрин, спермин, спермидин, поли(2-диметиламино)этилметакрилат, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин),

катионизированный желатин, дендримеры, хитозан, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP), хлорид N-[1-(2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорид 1-[2-(олеоилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолия (DOTIM), трифторацетат 2,3-диолеоилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорид 3β-[N—(N\N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HC1), дигептадециламидоглицилспермидин (DOGS), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромид N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE) и хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC). Неограничивающие примеры белковых носителей включают человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин.

Экзосомы также могут применяться в качестве сред-носителей для доставки лекарственных средств для композиции или препарата на основе кольцевой РНК, описанных в данном документе. Обзор см. в работе Na et al. за июль 2016 года, *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, том 6, выпуск 4, страницы 287-296; <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>.

Дифференцированные *ex vivo* эритроциты также можно применять в качестве носителя для композиции или препарата на основе кольцевой РНК, описанных в данном документе. См., например, международные публикации заявок на патент № WO2015/073587; WO2017/123646; WO2017/123644; WO2018/102740; WO2016/183482; WO2015/153102; WO2018/151829; WO2018/009838; Shi et al. 2014. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(28): 10131–10136; патент США № 9644180; Huang et al. 2017. *Nature Communications* 8: 423; Shi et al. 2014. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(28): 10131-10136.

Композиции на основе фузосом, например, описанные в международной публикации заявки на патент № WO2018/208728, также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе.

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

Нановезикулы растений и пакеты-мессенджеры растений (PMP), например, описанные в международных публикациях заявок на патент № WO2011/097480, WO2013/070324, WO2017/004526 или WO2020/041784, также могут применяться в качестве носителей для доставки композиции или препарата на основе кольцевой РНК, описанных в данном документе.

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

Носитель, содержащий описанные в данном документе кольцевые полирибонуклеотиды, может содержать множество частиц. Частицы могут характеризоваться средним размером от 30 до 700 нанометров (например, от 30 до 50, от 50 до 100, от 100 до 200, от 200 до 300, от 300 до 400, от 400 до 500, от 500 до 600, от 600 до 700, от 100 до 500, от 50 до 500 или от 200 до 700 нанометров). Размер частицы может быть оптимизирован для способствования отложению нагрузки, включая кольцевой полирибонуклеотид, в клетке. Отложению кольцевого полирибонуклеотида в определенных типах клеток могут способствовать отличающиеся размеры частиц. Например, размер частиц может быть оптимизирован для отложения кольцевого полирибонуклеотида в антигенпрезентирующих клетках. Размер частиц может быть оптимизирован для отложения кольцевого полирибонуклеотида в дендритных клетках. Кроме того, размер частиц может быть оптимизирован для отложений кольцевого полирибонуклеотида в клетках дренирующих лимфатических узлов.

Липидные наночастицы

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

Липиды, которые могут быть использованы для образования наночастиц (например, липидных наночастиц), включают, например, липиды, описанные в таблице 4 документа WO2019217941, который включен посредством ссылки, например, липидосодержащая наночастица может содержать один или несколько липидов из таблицы 4 документа

WO2019217941. Липидные наночастицы могут включать дополнительные элементы, такие как полимеры, такие как полимеры, описанные в таблице 5 документа WO2019217941, включенного посредством ссылки.

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

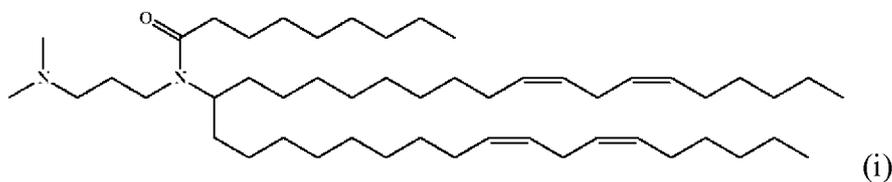
В некоторых вариантах осуществления стерина, которые могут быть включены в липидные наночастицы, включают одно или несколько из холестерина или производных холестерина, например, таких, как в документах W02009/127060 или US2010/0130588, которые включены посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные стерина включают фитостерина, в том числе описанные в работе Eurgeris et al. (2020), [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386), включенной в данный документ посредством ссылки.

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

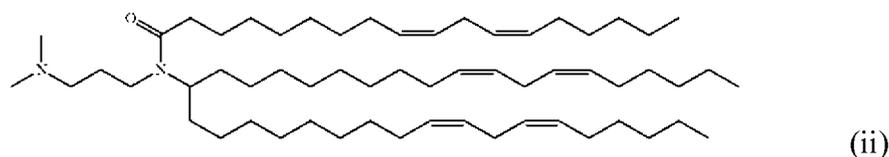
изменять. Например, отношение общего количества липидов к нуклеиновой кислоте (по массе или весу) может составлять от приблизительно 10: 1 до приблизительно 30: 1.

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

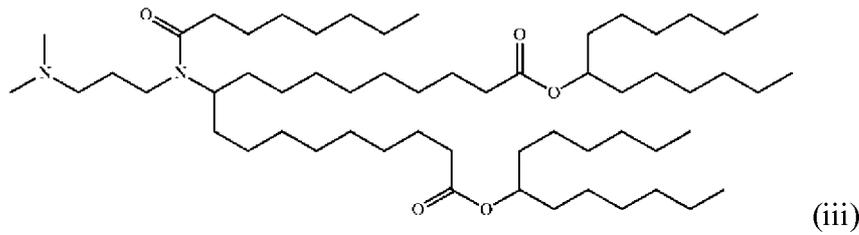
Некоторые неограничивающие примеры липидных соединений, которые можно применять (например, в комбинации с другими липидными компонентами) для образования липидных наночастиц для доставки композиций, описанных в данном документе, например, нуклеиновой кислоты (например, РНК (например, кольцевого полирибонуклеотида,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



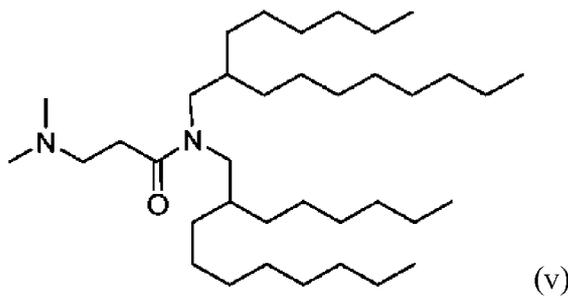
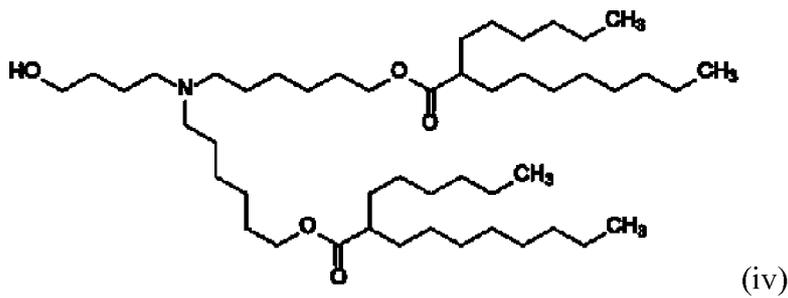
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (i), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



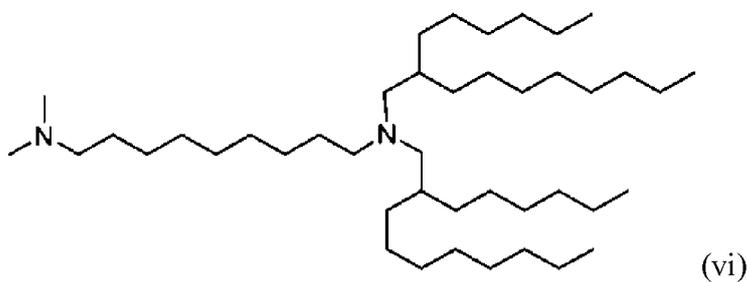
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (ii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



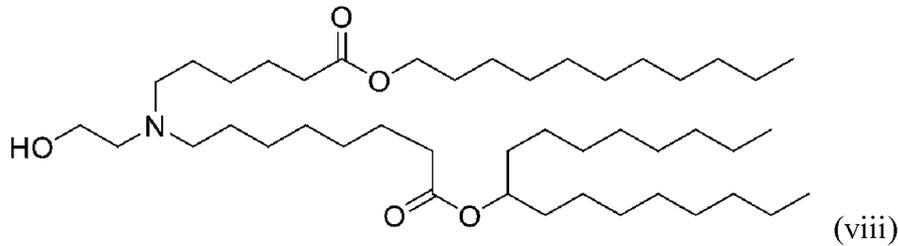
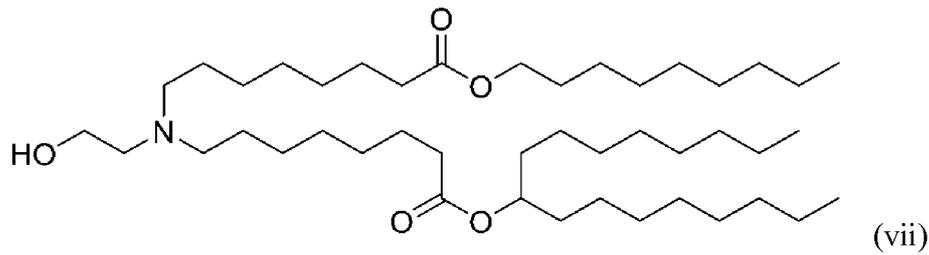
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (iii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



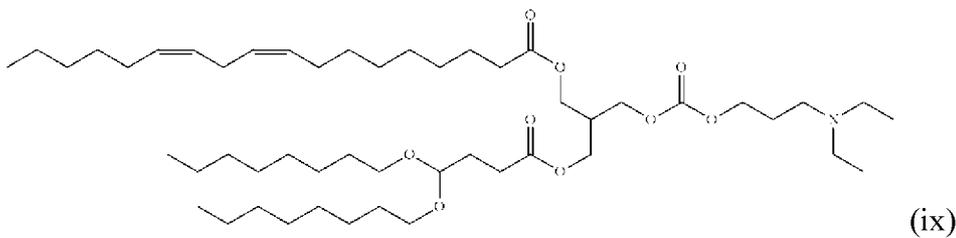
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (v), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



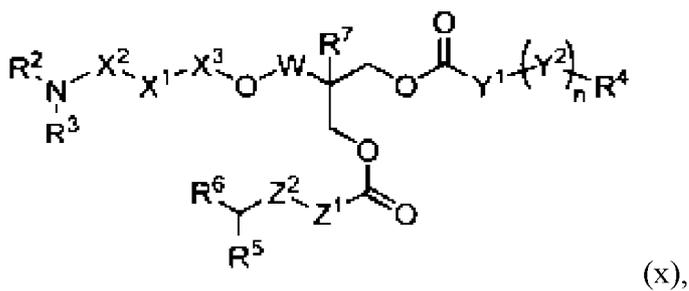
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (vi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



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



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



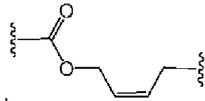
где

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

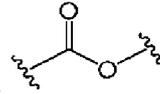
R^3 и атомом азота, к которому они присоединены, образует 5-, 6- или 7-членное кольцо, Y^1 представляет собой C2-12алкилен, Y^2 выбран из



(в любой ориентации),

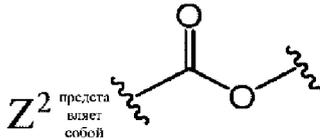


(в любой ориентации),



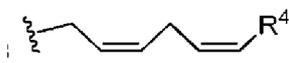
(в любой ориентации),

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



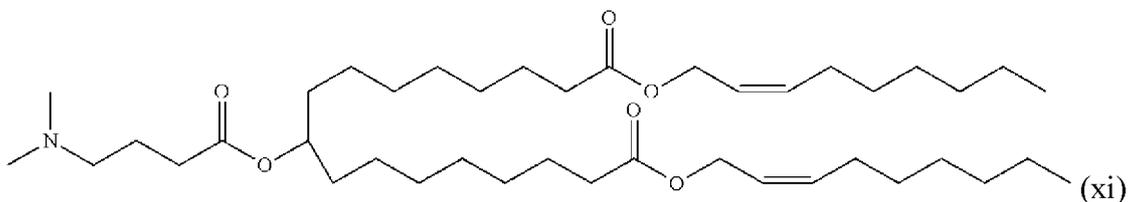
(в любой ориентации) или отсутствует, при условии, что если Z^1 представляет собой прямую связь, то Z^2 отсутствует;

R^5 представляет собой C5-9-алкил или C6-10-алкокси, R^6 представляет собой C5-9-алкил или C6-10-алкокси, W представляет собой метилен или прямую связь, и R^7 представляет собой H или Me или их соль, при условии, что если R^3 и R^2 представляют собой C2-алкилы, X^1 представляет собой O, X^2 представляет собой линейный C3-алкилен, X^3 представляет собой C(=O), Y^1 представляет собой линейный C₆-алкилен, $(Y^2)_n-R^4$ представляет собой

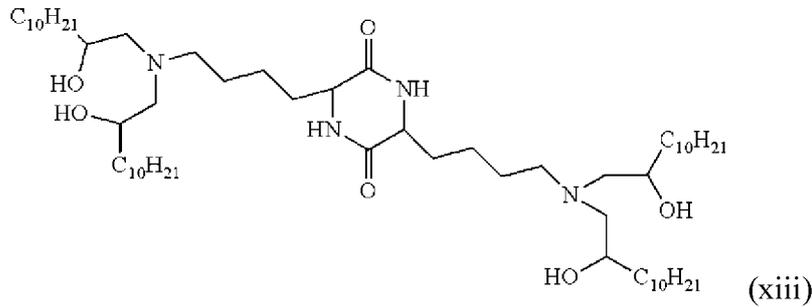
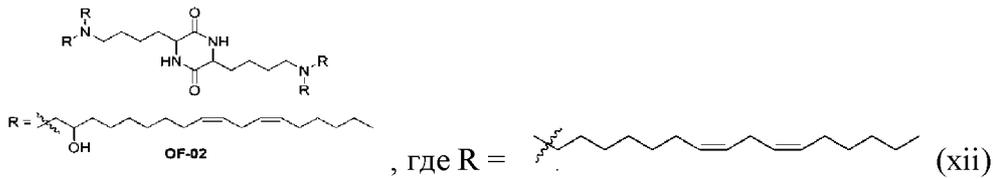


, R^4 представляет собой линейный C5-алкил, Z^1 представляет собой C2-алкилен, Z^2 отсутствует, W представляет собой метилен, и R^7 представляет собой H, то R^5 и R^6 не представляют собой C_x-алкокси.

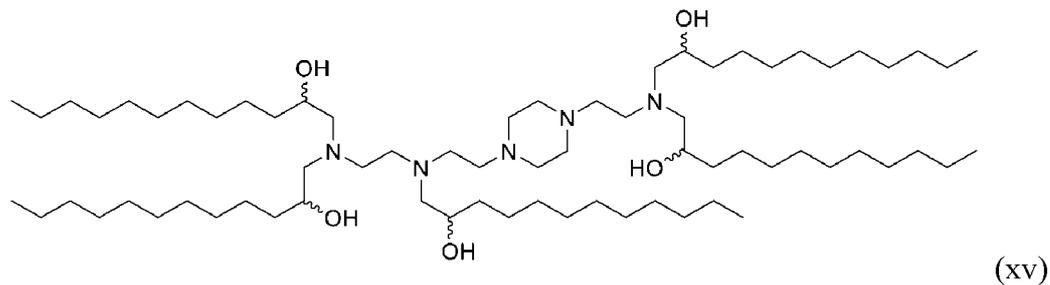
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



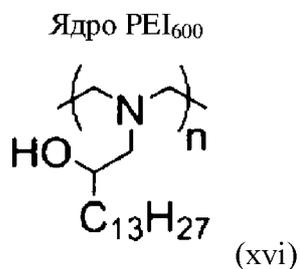
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



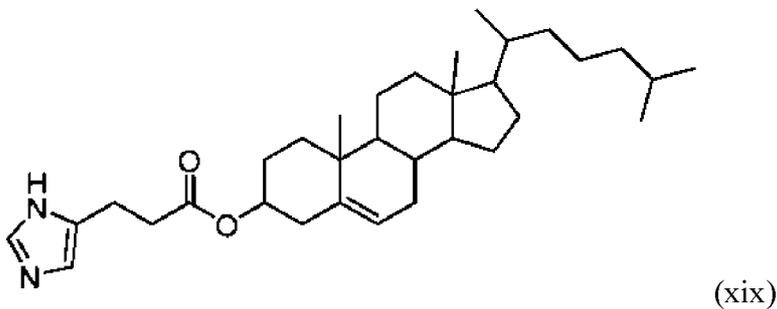
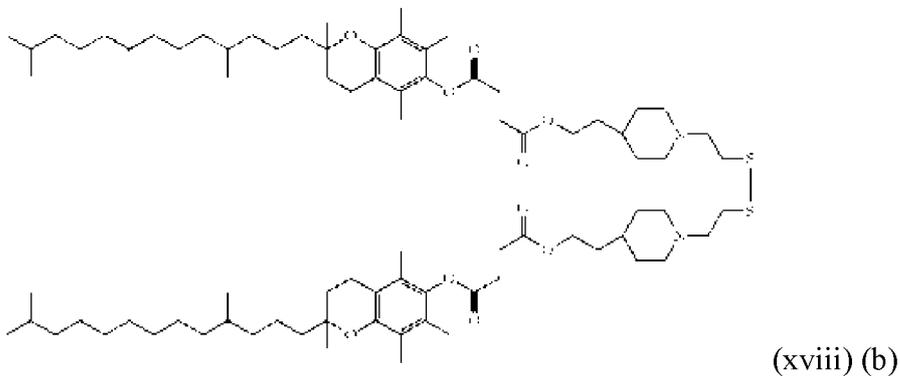
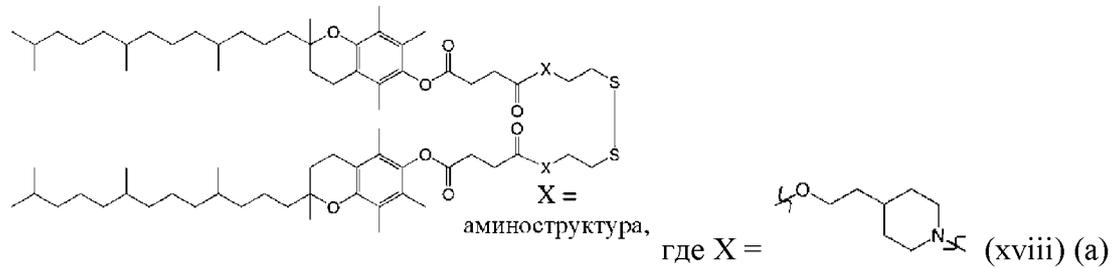
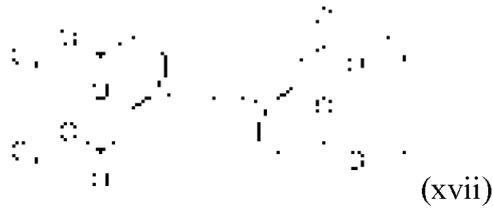
В некоторых вариантах осуществления LNP содержит соединение формулы (xiii) и соединение формулы (xiv).



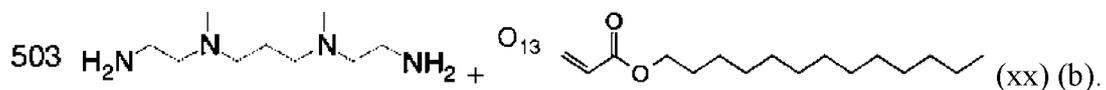
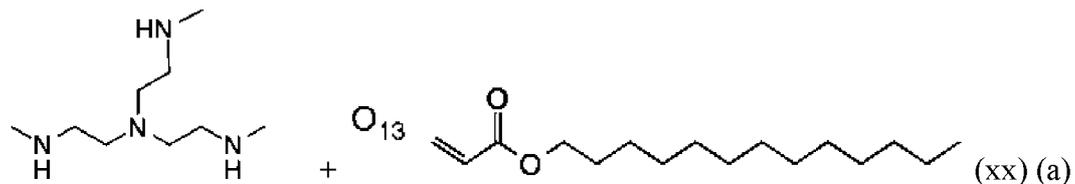
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xv), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



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

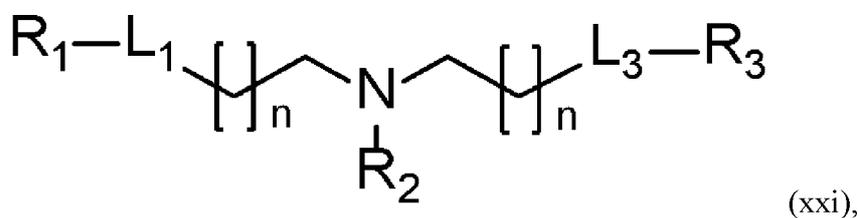


В некоторых вариантах осуществления липидное соединение, применяемое для образования липидных наночастиц для доставки композиций, описанных в данном документе, например, нуклеиновой кислоты (например, РНК (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид)), описанной в данном документе,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



В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например,

кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxi) представляет собой LNP, описанную в WO2021113777 (например, липид формулы (1), такой как липид из таблицы 1 в WO2021113777).

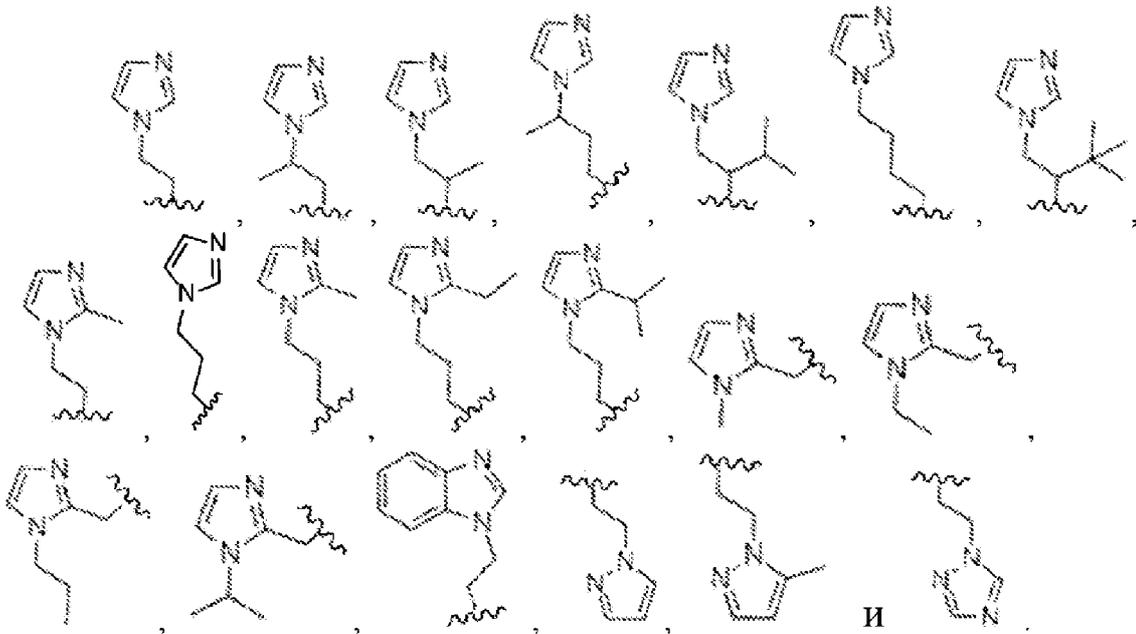


где

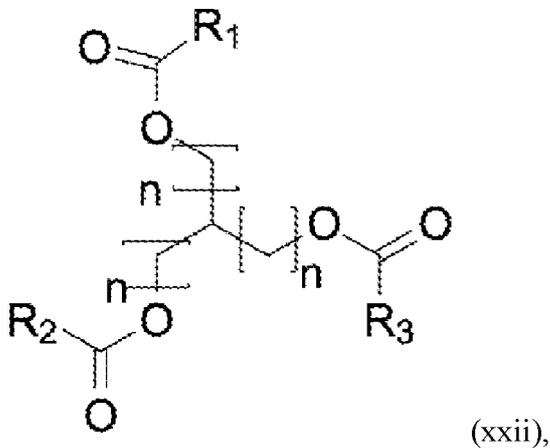
каждый n независимо представляет собой целое число от 2 до 15; каждый из L₁ и L₃ независимо представляют собой -OC(O)-* или -C(O)O-*, где "*" указывает точку присоединения к R₁ или R₃;

каждый из R₁ и R₃ независимо представляют собой линейный или разветвленный C₉-C₂₀алкил или C₉-C₂₀алкенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо, галогена, гидроксид, циано, алкила, алкенила, альдегида, гетероциклического алкила, гидроксильного алкила, дигидроксильного алкила, гидроксильного алкиламиноалкила, аминоалкила, алкиламиноалкила, диалкиламиноалкила, (гетероциклического) (алкил) аминоалкила, гетероциклического алкила, гетероарила, алкилгетероарила, алкинила, алкокси, амино, диалкиламино, аминоалкилкарбониламино, аминокарбонилалкиламино, (аминокарбонилалкил) (алкил) амино, алкенилкарбониламино, гидроксикарбонил, алкилоксикарбонил, аминокарбонил, аминоалкиламинокарбонил, алкиламиноалкиламинокарбонил, диалкиламиноалкиламинокарбонил, гетероциклического алкиламинокарбонил, (алкиламиноалкил) (алкил) аминокарбонил, алкиламиноалкилкарбонил, диалкиламиноалкилкарбонил, гетероциклического карбонил, алкенилкарбонил, алкинилкарбонил, алкилсульфоксида, алкилсульфоксидалкила, алкилсульфонил и алкилсульфонилалкила; и

R₂ выбран из группы, состоящей из:



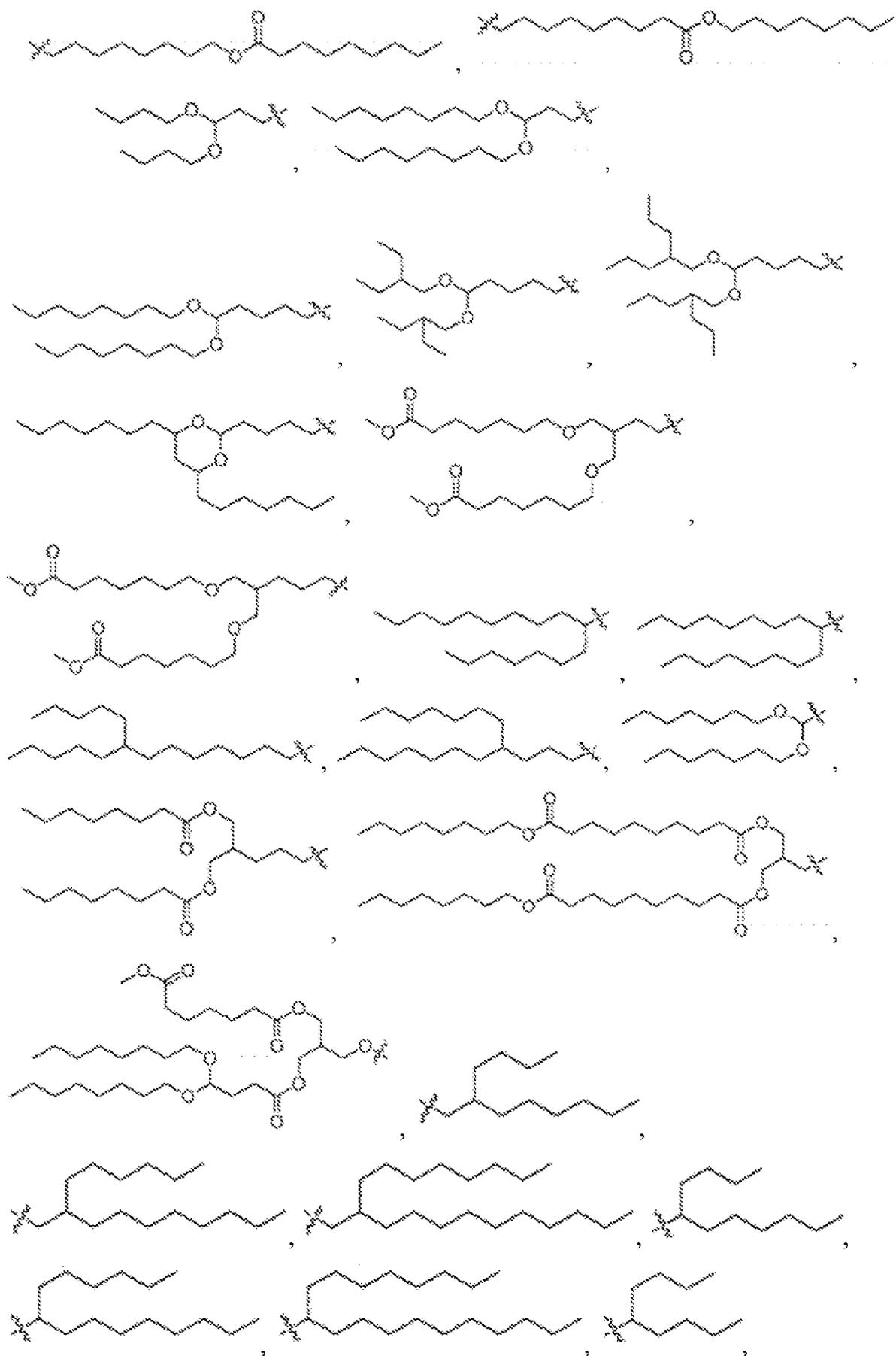
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxii) представляет собой LNP, описанную в WO2021113777 (например, липид формулы (2), такой как липид из таблицы 2 в WO2021113777).



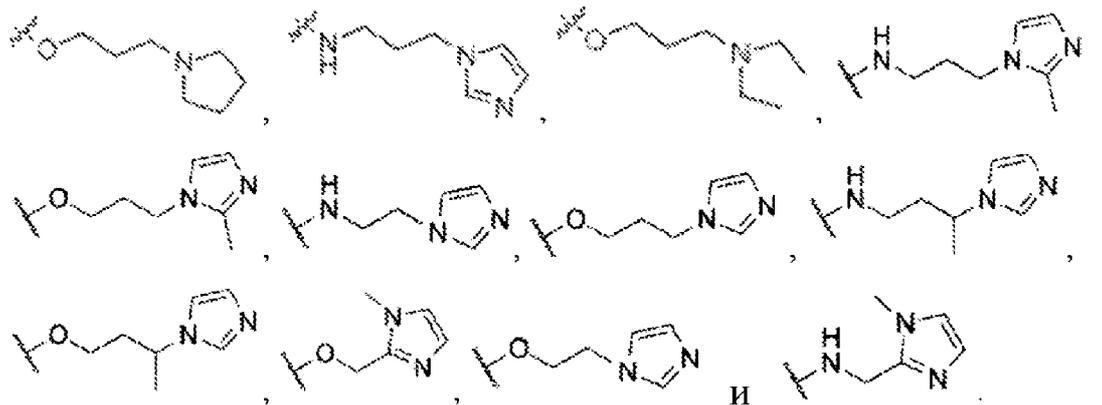
где

каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 15;

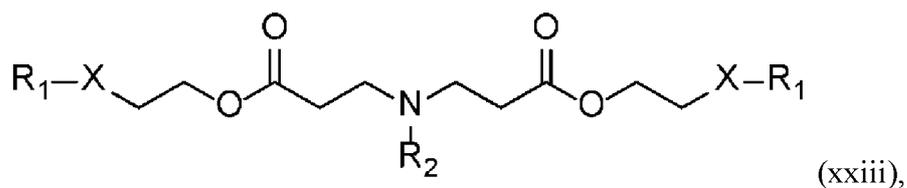
Каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из:



R_3 выбран из группы, состоящей из:



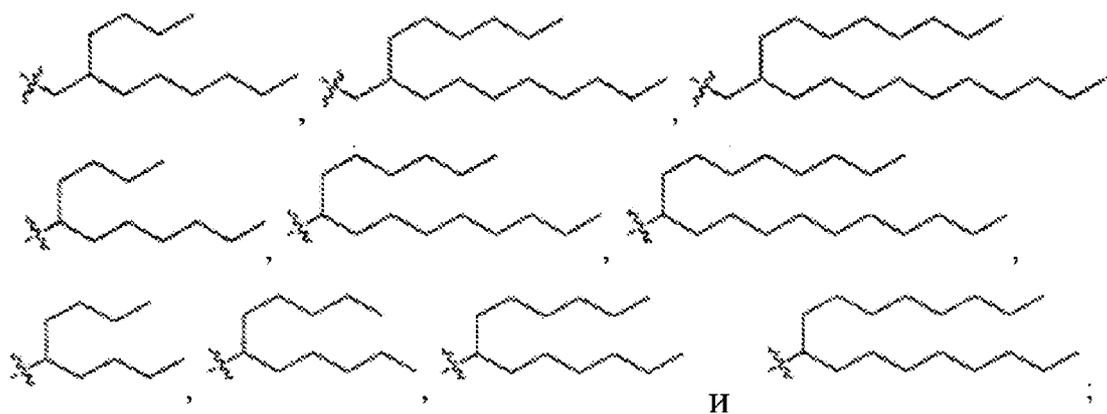
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxiii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxiii) представляет собой LNP, описанную в WO2021113777 (например, липид формулы (3), такой как липид из таблицы 3 в WO2021113777).



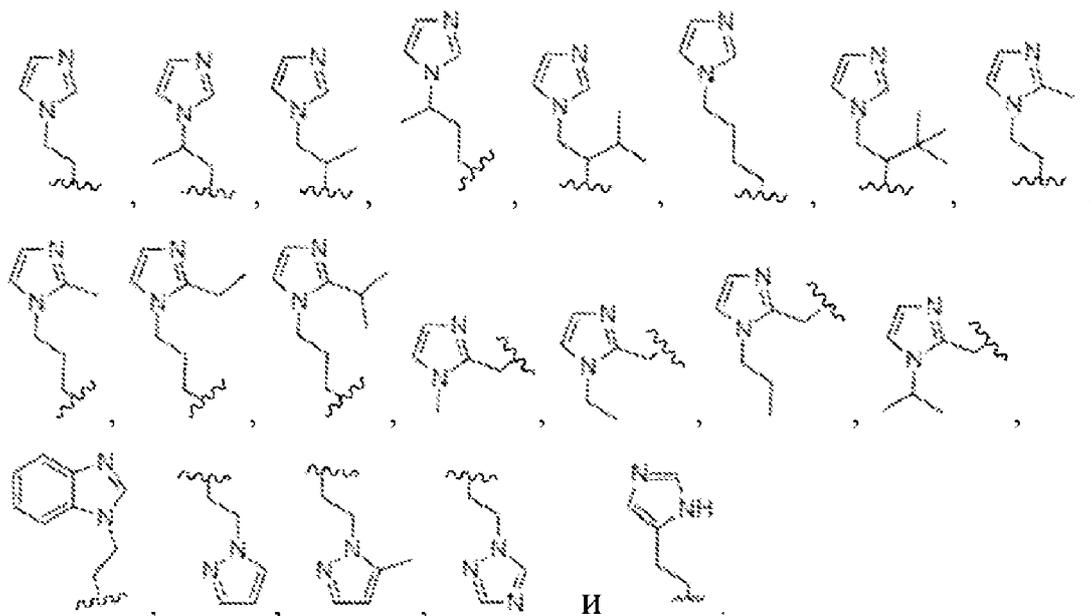
где

X выбран из -O-, -S- или -OC(O)-*, где * указывает точку присоединения к R₁;

R₁ выбран из группы, состоящей из:



и R₂ выбран из группы, состоящей из:



В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе (например, нуклеиновая кислота (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид) или белок), представлена в LNP, которая содержит ионизируемый липид. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой гептадекан-9-ил-8-((2-гидроксиэтил)(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил)амино)октаноат (SM-102); например, описанный в примере 1 документа US9867888 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилотдадека-9,12-диеноат (LP01), например, синтезированный в примере 13 из документа WO2015/095340 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)-9-(((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L319), например, синтезированный в примере 7, 8 или 9 документа US2012/0027803 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой 1,1'-((2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азандиил)бис(додекан-2-ол) (C12-200), например, синтезированный в примерах 14 и 16 документа WO2010/053572 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой липид на основе сложного эфира холестерина и имидазола (ICE) – (3S,10R,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,

14, 15, 16, 17-тетрадекагидро-1Н-циклопента[а]фенантрен-3-ил-3-(1Н-имидазол-4-ил)пропаноат, например, структуру (I) из документа WO2020/106946 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид может представлять собой катионный липид, ионизируемый катионный липид, например, катионный липид, который может существовать в положительно заряженной или нейтральной форме в зависимости от pH, или аминокислотный липид, который легко поддается протонированию. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой липид, способный быть положительно заряженным, например, в физиологических условиях. Иллюстративные катионные липиды содержат одну или несколько аминогрупп, которые несут положительный заряд. В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит катионный липид в составе с одним или несколькими нейтральными липидами, ионизируемыми аминокислотными липидами, биоразлагаемыми алкиновыми липидами, стероидами, фосфолипидами, включая полиненасыщенные липиды, структурными липидами (например, стеринами), PEG, холестерином и липидами, конъюгированными с полимером. В некоторых вариантах осуществления катионный липид может представлять собой ионизируемый катионный липид. Иллюстративный катионный липид, раскрытый в данном документе, может характеризоваться значением эффективной pK_a , составляющим более 6,0. В вариантах осуществления липидная наночастица может содержать второй катионный липид, характеризующийся другим значением эффективной pK_a (например, более высоким, чем значение первой эффективной pK_a) по сравнению с первым катионным липидом. Липидная наночастица может содержать от 40 до 60 молярных процентов катионного липида, нейтрального липида, стероида, липида, конъюгированного с полимером, и терапевтического средства, например, нуклеиновой кислоты (например, РНК (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида)), описанной в данном документе, инкапсулированной внутри липидной наночастицы или ассоциированной с ней. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота составлена совместно с катионным липидом. Нуклеиновая кислота может быть адсорбирована на поверхности LNP, например, LNP, содержащей катионный липид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть инкапсулирована в LNP, например, в LNP, содержащую катионный липид. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица может содержать нацеливающий компонент, например, она покрыта нацеливающим средством. В вариантах осуществления состав на основе LNP является биоразлагаемым. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица,

содержащая один или несколько липидов, описанных в данном документе, например, соединения формулы (i), (ii), (ii), (vii) и/или (ix), инкапсулирует по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или 100% молекулы РНК.

Иллюстративные ионизируемые липиды, которые можно применять в составах на основе липидных наночастиц, включают без ограничения липиды, перечисленные в таблице 1 документа WO2019051289, включенного в данный документ посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные липиды включают без ограничения соединения одной или нескольких из следующих формул: X из US2016/0311759; I из US20150376115 или из US2016/0376224; I, II или III из US20160151284; I, IA, II или IIA из US20170210967; I-с из US20150140070; A из US2013/0178541; I из US2013/0303587 или US2013/0123338; I из US2015/0141678; II, III, IV или V из US2015/0239926; I из US2017/0119904; I или II из WO2017/117528; A из US2012/0149894; A из US2015/0057373; A из WO2013/116126; A из US2013/0090372; A из US2013/0274523; A из US2013/0274504; A из US2013/0053572; A из WO2013/016058; A из WO2012/162210; I из US2008/042973; I, II, III или IV из US2012/01287670; I или II из US2014/0200257; I, II или III из US2015/0203446; I или III из US2015/0005363; I, IA, IB, IC, ID, II, IIA, IIB, IIC, IID или III-XXIV из US2014/0308304; из US2013/0338210; I, II, III или IV из WO2009/132131; A из US2012/01011478; I или XXXV из US2012/0027796; XIV или XVII из US2012/0058144; из US2013/0323269; I из US2011/0117125; I, II или III из US2011/0256175; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII из US2012/0202871; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV или XVI из US2011/0076335; I или II из US2006/008378; I из US2013/0123338; I или X-A-Y-Z из US2015/0064242; XVI, XVII или XVIII из US2013/0022649; I, II или III из US2013/0116307; I, II или III из US2013/0116307; I или II из US2010/0062967; I-X из US2013/0189351; I из US2014/0039032; V из US2018/0028664; I из US2016/0317458; I из US2013/0195920; 5, 6 или 10 из US10,221,127; III-3 из WO2018/081480; I-5 или I-8 из WO2020/081938; 18 или 25 из US9,867,888; A из US2019/0136231; II из WO2020/219876; 1 из US2012/0027803; OF-02 из US2019/0240349; 23 из US10,086,013; cKK-E12/A6 из Miao et al (2020); C12-200 из WO2010/053572; 7C1 из Dahlman et al (2017); 304-O13 или 503-O13 из Whitehead et al; TS-P4C2 из US9,708,628; I из WO2020/106946; I из WO2020/106946 и (1), (2), (3) или (4) из WO2021/113777. Иллюстративные липиды дополнительно предусматривают липид, указанный в любой из таблиц 1-16 из WO2021/113777.

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

Иллюстративные некатионные липиды включают без ограничения дистеароил-sn-глицерофосфоэтаноламин, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), монометилфосфатидилэтаноламин (такой как 16-О-монометил-PE), диметилфосфатидилэтаноламин (такой как 16-О-диметил-PE), 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE), гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC), яичный фосфатидилхолин (EPC), диолеоилфосфатидилсерин (DOPS), сфингомиелин (SM), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG), диэрукоилфосфатидилхолин (DEPC), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG), диэлаидоилфосфатидилэтаноламин (DEPE), лецитин, фосфатидилэтаноламин, лизолецитин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, сфингомиелин, яичный сфингомиелин (ESM), цефалин, кардиолипин, фосфатидную кислоту, цереброзиды, дицетилфосфат, лизофосфатидилхолин, дилинолеоилфосфатидилхолин или их смеси. Понятно, что можно также применять другие диацилфосфатидилхолиновые и диацилфосфатидилэтаноламиновые фосфолипиды.

Ацильные группы в данных липидах предпочтительно представляют собой ацильные группы, полученные из жирных кислот, имеющих C10-C24-углеродные цепи, например, лауроила, миристоила, пальмитоила, стеароила или олеоила. Дополнительные иллюстративные липиды в определенных вариантах осуществления включают без ограничения липиды, описанные в работе Kim et al. (2020) [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386), включенной в данный документ посредством ссылки. Такие липиды включают в некоторых вариантах осуществления растительные липиды, которые, как было обнаружено, обеспечивают улучшение трансфекции с использованием mRNA в печени (например, DGTS).

Другие примеры неcatiонных липидов, пригодных для применения в липидных наночастицах, включают без ограничения липиды, не содержащие фосфор, такие как, например, стеариламин, додециламин, гексадециламин, ацетилпальмитат, глицеринрицинолеат, гексадецилстеарат, изопропилмириститат, амфотерные акриловые полимеры, лаурилсульфат триэтанолamina, алкиларилсульфат, полиэтилоксилированные амиды жирных кислот, бромид диоктадецилдиметиламмония, церамид, сфингомиелин и т. п. Другие неcatiонные липиды описаны в документе WO2017/099823 или в публикации заявки на патент США US2018/0028664, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления неcatiонный липид представляет собой олеиновую кислоту или соединение формулы I, II или IV из документа US2018/0028664, включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Неcatiонный липид может составлять, например, 0-30% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления содержание неcatiонных липидов составляет 5-20% (мол.) или 10-15% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. В вариантах осуществления молярное соотношение ионизируемых липидов и нейтральных липидов находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 8:1 (например, составляет приблизительно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 или 8:1).

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

В некоторых аспектах липидная наночастица может дополнительно содержать компонент, такой как стерин, для обеспечения целостности мембраны. Одним иллюстративным стеринном, который можно применять в липидной наночастице, является холестерин и его производные. Неограничивающие примеры производных холестерина включают полярные аналоги, такие как 5 α -холестанол, 5 β -копростанол, холестерил-(2-

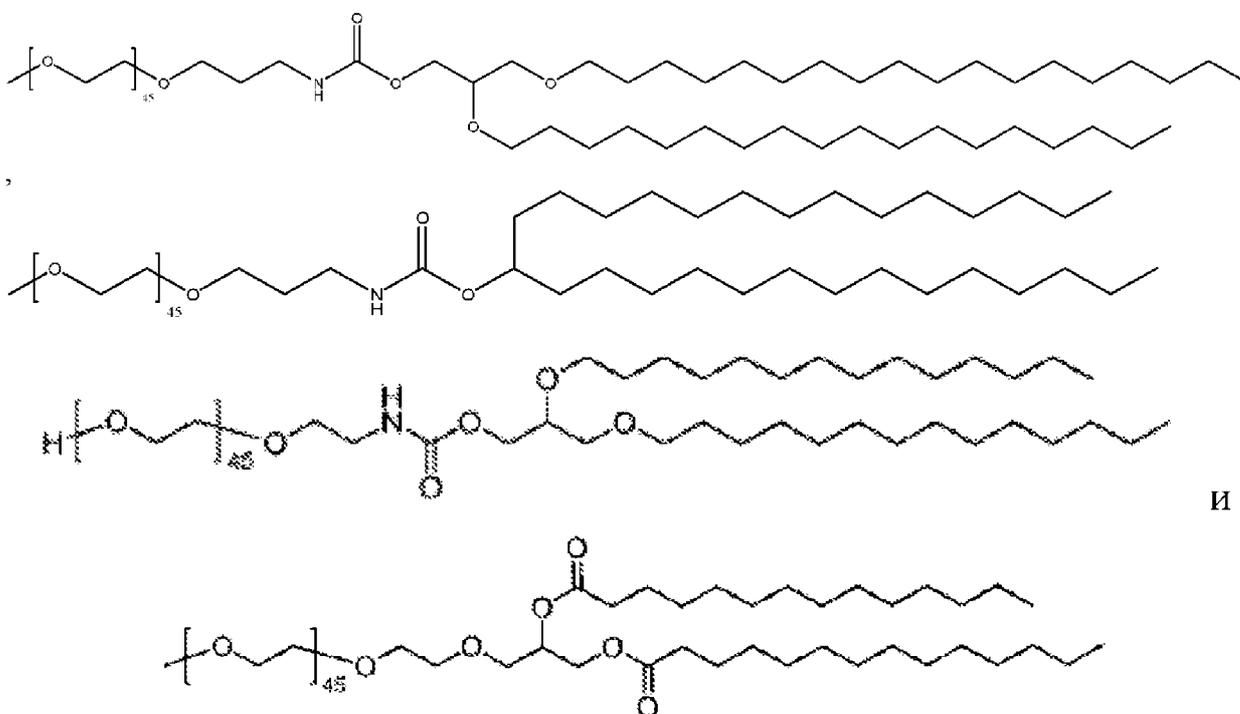
гидроксид)-этиловый эфир, холестерил-(4'-гидроксид)-бутиловый эфир и 6-кетохолестанол; неполярные аналоги, такие как 5 α -холестан, холестенон, 5 α -холестанон, 5 β -холестанон и холестерилдеcanoат и их смеси. В некоторых вариантах осуществления производное холестерина представляет собой полярный аналог, например, холестерил-(4'-гидроксид)бутиловый эфир. Иллюстративные производные холестерина описаны в публикации согласно РСТ W02009/127060 и публикации заявки на патент США US2010/0130588, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

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

Иллюстративные конъюгаты PEG-липид включают без ограничения PEG-диацилглицерин (DAG) (такой как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG)), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer), пегилированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), PEG-сукцинатдиацилглицерин (PEGS-DAG) (например, 4-0-(2',3'-ди(тетрадеcanoилокси)пропил-1-0-(w-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG)), PEG-диалкоксипропилкарбам, натриевую соль N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфозаноламина или их смесь. Дополнительные иллюстративные конъюгаты PEG-липид описаны, например, в US5,885,613, US6,287,591, US2003/0077829, US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2010/0130588, US2016/0376224, US2017/0119904, US2018/0028664 и WO2017/099823, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых

вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы III, III-a-I, III-a-2, III-b-1, III-b-2 или V из документа US2018/0028664, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы II из документа US20150376115 или US2016/0376224, содержание обоих из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил, PEG-димиристилоксипропил, PEG-дипальмитилоксипропил или PEG-дистеарилоксипропил. PEG-липид может представлять собой один или несколько из PEG-DMG, PEG-дилаурилглицерина, PEG-дипальмитоилглицерина, PEG-дистерилглицерина, PEG-дилаурилглицерида, PEG-димиристилглицерида, PEG-дипальмитоилглицерида, PEG-дистерилглицерида, PEG-холестерин-(1-[8'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диооктанил]карбамоил-[омега]-метилполи(этиленгликоль), PEG-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполи(этиленгликолевого) эфира) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид предусматривает PEG-DMG, 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид предусматривает структуру, выбранную из следующего:



И

В некоторых вариантах осуществления вместо PEG-липида также можно использовать липиды, конъюгированные с молекулой, отличной от PEG. Например, вместо PEG-липида или в дополнение к нему можно использовать конъюгаты полиоксазолин (POZ)-липид,

конъюгаты полиамид-липид (такие как конъюгаты АТТА-липид) и конъюгаты катионный полимер-липид (GPL).

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

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

общего веса композиции, 10-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 5% холестерина по молям или от общего веса композиции; или 2-30% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 2-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, 1-15% холестерина по молям или от общего веса композиции, 2-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 1-20% холестерина по молям или от общего веса композиции, или даже не более 90% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции и 2-10% некатионных липидов по молям или от общего веса композиции, или даже 100% катионного липида по молям или от общего веса композиции. В некоторых вариантах осуществления состав на основе липидных частиц содержит ионизируемый липид, фосфолипид, холестерин и пегилированный липид при молярном соотношении 50:10:38,5: 1,5. В некоторых других вариантах осуществления состав на основе липидных частиц содержит ионизируемый липид, холестерин и пегилированный липид при молярном соотношении 60:38,5: 1,5.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления также могут быть включены одно или несколько дополнительных соединений. Данные соединения можно вводить отдельно, или дополнительные соединения могут быть включены в липидные наночастицы по настоящему изобретению. Другими словами, липидные наночастицы могут содержать другие соединения в дополнение к нуклеиновой кислоте или по меньшей мере вторую нуклеиновую кислоту, отличающуюся от первой. Другие дополнительные соединения могут без ограничений быть выбраны из группы, состоящей из малых или больших

органических или неорганических молекул, моносахаридов, дисахаридов, трисахаридов, олигосахаридов, полисахаридов, пептидов, белков, аналогов пептидов и их производных, пептидомиметиков, нуклеиновых кислот, аналогов нуклеиновых кислот и производных, экстрактов, полученных из биологических материалов, или любых их комбинаций.

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

В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от нескольких 10 нм до нескольких 100 нм, например, как измерено посредством динамического светорассеяния (DLS). В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 40 нм до приблизительно 150 нм, например приблизительно 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 50 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 70 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 60 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 70 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 90 нм или от приблизительно 90 нм до приблизительно 100 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм. В конкретном

варианте осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять приблизительно 80 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять приблизительно 100 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP находится в диапазоне от приблизительно 1 мкм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 10 мкм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 20 мкм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 25 мкм до приблизительно 60 нм, от приблизительно 30 мкм до приблизительно 55 нм, от приблизительно 35 мкм до приблизительно 50 нм или от приблизительно 38 мкм до приблизительно 42 мкм.

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

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

приблизительно +5 мВ, от приблизительно +5 мВ до приблизительно +20 мВ, от приблизительно +5 мВ до приблизительно +15 мВ или от приблизительно +5 мВ до приблизительно +10 мВ.

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

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

Дополнительные иллюстративные липиды, составы, способы и определение характеристик LNP описаны в документах WO2020/061457, WO2021/113777 и WO2021226597, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительные иллюстративные липиды, составы, способы и определение характеристик LNP описаны в работе Hou et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater* (2021). doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (см., например, иллюстративные липиды и производные липидов на фиг. 2 в работе Hou et al.).

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

Составы на основе LNP, оптимизированные для доставки систем CRISPR-Cas, например, RNP Cas9-gRNA, gRNA, mRNA Cas9, описаны в документах WO2019067992 и WO2019067910, оба из которых включены посредством ссылки, и являются применимыми для доставки кольцевых полирибонуклеотидов и линейных полирибонуклеотидов, описанных в данном документе.

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

В вариантах осуществления полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид), кодирующий по меньшей мере часть (например, антигенную часть) иммуногена или полипептида, описанных в данном документе, составлен в виде LNP, где: (a) LNP содержат катионный липид, нейтральный липид, холестерин и PEG-липид, (b) LNP характеризуются средним размером частиц от 80 нм до 160 нм, и (c) полирибонуклеотид содержит: (i) структуру 5'-кэп; (ii) 5'-UTR; (iii) N1-метилпсевдоуридин, цитозин, аденин и гуанин; (iv) 3'-UTR; и (v) область поли(A). В вариантах осуществления полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид), составленный в LNP, представляет собой вакцину.

Иллюстративная дозировка LNP на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида) может предусматривать приблизительно 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 или 100 мг/кг (PHK). В некоторых вариантах осуществления доза иммуногенной композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, составляет 30-200 мкг, например, 30 мкг, 50 мкг, 75 мкг, 100 мкг, 150

мкг или 200 мкг. Иллюстративная дозировка AAV, содержащего полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид), может предусматривать МОИ, составляющую приблизительно 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} и 10^{14} в. г./кг.

Наборы

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает набор. В некоторых вариантах осуществления набор содержит (а) кольцевой полирибонуклеотид, иммуногенную композицию или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, и необязательно (b) информационный материал. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит адъювант, описанный в данном документе, который может быть представлен в виде отдельной композиции для введения в комбинации с кольцевым полирибонуклеотидом, иммуногенной композицией или фармацевтической композицией как часть определенного режима введения доз. Информационный материал может представлять собой описательный, учебный, маркетинговый или другой материал, который относится к способам, описанным в данном документе, и/или к применению фармацевтической композиции или кольцевого полирибонуклеотида для способов, описанных в данном документе. Фармацевтическая композиция или кольцевой полирибонуклеотид могут содержать материал для однократного введения (например, лекарственную форму для однократного введения) или могут содержать материал для многократного введения (например, "многодозовый" набор).

Информационный материал в наборах не ограничен по форме. В одном варианте осуществления информационный материал может включать информацию о получении фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, молекулярную массу фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, концентрацию, дату истечения срока годности, информацию о партии или месте производства и т. п. В одном варианте осуществления информационный материал относится к способам введения лекарственной формы фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления информационный материал относится к способам введения лекарственной формы кольцевого полирибонуклеотида.

В дополнение к лекарственной форме фармацевтической композиции и кольцевого полирибонуклеотида, описанных в данном документе, набор может содержать другие ингредиенты, такие как растворитель или буфер, стабилизатор, консервант, ароматизатор (например, антагонист горького вкуса или подсластитель), ароматическая добавка, краситель или красящее средство, например, для окрашивания одного или нескольких

компонентов в наборе или придания им оттенка, или другой косметический ингредиент и/или второе средство для лечения состояния или нарушения, описанных в данном документе. В качестве альтернативы, другие ингредиенты могут быть включены в набор, но в композициях или контейнерах, отличных от фармацевтической композиции или кольцевого полирибонуклеотида, описанных в данном документе. В таких вариантах осуществления набор может содержать инструкции для смешивания фармацевтической композиции или молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), описанных в данном документе, и других ингредиентов, или для применения фармацевтической композиции или молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), описанных в данном документе, вместе с другими ингредиентами.

В некоторых вариантах осуществления компоненты набора хранят в инертных условиях (например, в атмосфере азота или другого инертного газа, такого как аргон). В некоторых вариантах осуществления компоненты набора хранят в безводных условиях (например, с осушителем). В некоторых вариантах осуществления компоненты хранят в светоблокирующем контейнере, таком как флакон из желтого стекла.

Лекарственная форма фармацевтической композиции или молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), описанных в данном документе, может быть представлена в любой форме, например, в жидкой, высушенной или лиофилизированной форме. Предпочтительно, чтобы фармацевтическая композиция или молекула нуклеиновой кислоты (например, кольцевой полирибонуклеотид), описанные в данном документе, были по сути чистыми и/или стерильными. Если фармацевтическая композиция или молекула нуклеиновой кислоты (например, кольцевой полирибонуклеотид), описанные в данном документе, представлены в жидком растворе, жидкий раствор предпочтительно представляет собой водный раствор, при этом стерильный водный раствор является предпочтительным. Если фармацевтическая композиция или молекула нуклеиновой кислоты (например, кольцевой полирибонуклеотид), описанные в данном документе, представлены в виде высушенной формы, восстановление обычно происходит посредством добавления подходящего растворителя. Растворитель, например, стерильная вода или буфер, необязательно может быть предоставлен в наборе.

Набор может содержать один или несколько контейнеров для композиции, содержащей лекарственную форму, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит отдельные контейнеры, перегородки или отсеки для композиции и информационного материала. Например, фармацевтическая композиция

или кольцевой полирибонуклеотид могут содержаться в бутылке, флаконе или шприце, а информационный материал может содержаться в пластиковом рукаве или пакете. В других вариантах осуществления отдельные элементы набора содержатся в одном контейнере без перегородок. Например, лекарственная форма фармацевтической композиции или молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), описанных в данном документе, содержится в бутылке, флаконе или шприце, к которым прикреплен информационный материал в форме этикетки. В некоторых вариантах осуществления набор содержит множество (например, упаковку) отдельных контейнеров, каждый из которых содержит одну или несколько стандартных лекарственных форм фармацевтической композиции или кольцевого полирибонуклеотида, описанных в данном документе. Например, набор содержит множество шприцев, ампул, пакетов из фольги или блистерных упаковок, при этом каждое из них содержит одну стандартную дозу лекарственной формы, описанной в данном документе.

Контейнеры в наборах могут быть воздухонепроницаемыми, водонепроницаемыми (например, невосприимчивыми к изменениям влажности или испарения) и/или светонепроницаемыми.

Набор необязательно содержит устройство, подходящее для применения лекарственной формы, например, шприц, пипетку, щипцы, мерную ложку, тампон (например, ватный тампон или деревянный тампон) или любое такое устройство.

Наборы по настоящему изобретению могут содержать лекарственные формы с различными концентрациями для обеспечения субъекта дозами, подходящими для одного или нескольких из режимов фазы инициации, режимов фазы индукции или режимов фазы поддерживающей терапии, описанных в данном документе. В качестве альтернативы набор может содержать делимую таблетку, позволяющую пользователю вводить разделенные дозы по мере необходимости.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры, которые предназначены для иллюстрации, а не для ограничения настоящего изобретения, представлены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники описание того, как композиции и способы, описанные в данном документе, могут применяться, изготавливаться и оцениваться. Примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением.

Пример 1. Экспрессия секретлируемых иммуногенов VZV *in vitro*

В данном примере продемонстрирована экспрессия секретлируемых иммуногенов VZV с кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

Кольцевую РНК конструировали таким образом, чтобы она содержала сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) и нуклеотидную последовательность, кодирующую секретлируемый иммуноген VZV. В данном примере ДНК-конструкции разрабатывали таким образом, что они содержали IRES, полинуклеотидный груз и спейсерный элемент. Конструкцию разрабатывали таким образом, чтобы она содержала polyA50 в качестве спейсерного элемента и комбинацию модифицированного IRES CVB3 (SEQ ID NO:113) и ORF в качестве полинуклеотидного груза. ORF содержала сигнальную последовательность секреции люциферазы *Gaussia* (Gluc), нуклеотидную последовательность gE VZV и нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT, содержащую последовательность VSGWRLFKKIS (SEQ ID NO: 123) с пептидным линкером GGGGS (SEQ ID NO: 112).

В данном примере кольцевые РНК получали посредством самосплайсинга с использованием способа, описанного в данном документе. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с применением РНК-полимеразы T7 с ДНК-матрицы, содержащей перечисленные выше мотивы, в присутствии 7,5 mM NTP. ДНК-матрицу удаляли путем обработки ДНКазой. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050). Самосплайсинг происходил во время транскрипции; дополнительной реакции не требовалось. Кольцевую РНК, кодирующую gE VZV, очищали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной (PAGE с мочевиной) или посредством колоночной хроматографии с обращенной фазой.

Кольцевой РНК (2 пикомоля) трансфицировали клетки HEK293T (200000 клеток на лунку в 96-луночном планшете в бессывороточной среде) с применением Lipofectamine MessengerMax (Invitrogen, LMRNA015) в соответствии с инструкциями производителя. MessengerMax отдельно использовали в качестве контроля (отрицательный контроль). В

качестве контроля также использовали плазмиду со вставленной нуклеотидной последовательностью секретируемого gE VZV (плазида Sec gE). Супернатант собирали через 18 часов и измеряли экспрессию с использованием gE-специфического ELISA. Планшеты для ELISA покрывали 5 мкг/мл антитела к gE в 100 мкл покрывающего буфера и инкубировали в течение ночи при 4°C. Супернатанты с трансфицированными клетками загружали в планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего трижды промывали с помощью TBS-T. Биотинилированное моноклональное антитело к gE (9C8) добавляли в планшет при разбавлении 1:1000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего трижды промывали с помощью TBS-T. Конъюгированный с HRP стрептавидин добавляли в планшет при разбавлении 1:10000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего четыре раза промывали с помощью TBS-T.

На фиг. 6 показано, что кольцевая РНК, кодирующая секретируемый gE (Sec gE), была успешно транслирована *in vitro*.

Пример 2. Экспрессия несекретируемых иммуногенов VZV *in vitro*

В данном примере продемонстрирована экспрессия несекретируемых иммуногенов VZV с кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

Кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали IRES и нуклеотидную последовательность, кодирующую трансмембранный иммуноген VZV. В данном примере ДНК-конструкции разрабатывали таким образом, что они содержали IRES, полинуклеотидный груз и спейсерный элемент. Конструкции №1, №2 и №3 разрабатывали таким образом, чтобы они содержали polyA50 в качестве спейсерного элемента и комбинацию модифицированного сайта внутренней посадки рибосомы CVB3 (IRES) (SEQ ID NO:113) и ORF в качестве полинуклеотидного груза. Конструкцию №4 разрабатывали таким образом, чтобы она содержала polyA50 в качестве спейсерного элемента и комбинацию IRES EV71 (SEQ ID NO:115) и ORF в качестве полинуклеотидного груза. ORF конструировали таким образом, чтобы она содержала нуклеотидную последовательность трансмембранного gE VZV и нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT с пептидным линкером G4S. В данном примере получали четыре различные конструкции, при этом каждая характеризовалась отличающейся нуклеотидной последовательностью трансмембранного gE VZV (SEQ ID NO: 124-128), описанной в таблице 4. Кольцевые РНК получали, как описано в примере 1.

Кольцевой РНК (2 пикомоля) трансфицировали клетки HEK293T (20000 клеток на лунку в 96-луночном планшете в бессывороточной среде) с применением Lipofectamine

MessengerMax (Invitrogen, LMRNA015) в соответствии с инструкциями производителя. MessengerMax отдельно использовали в качестве контроля. Клетки собирали через 24 часа после трансфекции, окрашивали красителем, позволяющим отличить живые клетки от мертвых, и зондировали антителом к gE (9C8), а затем конъюгированным с PE антителом к мышинному антителу. Экспрессию gE измеряли через 24 часа посредством проточной цитометрии.

На **фиг. 7** показано, что умеренные и высокие уровни экспрессии gE были выявлены на клеточной поверхности клеток HEK293T из всех кольцевых РНК, кодирующих трансмембранный gE.

Таблица 4

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
124	atgggcgtcaaggtcctgttcgcctgatctgcatcgccgtggccgaggccatgggcaccgtgaacaagcccgtggtggg cgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcacctgcggtaccacaaccccgtgcgggcccagcgtgctgcggtacgacga ttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctg ggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacgg cttcctggagaacggccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgca gcccaccagatgagcggccaggaggacctgggagcagacaccggcatccacgtgatccccacctgaacggcgacga ccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtagcggcgacgtgtcaaggggcgacctgaacccaagccccaggg ccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccctcaccctgcgggccccatccagcggatctacggcgtg cggtagaccgaaacctggagcttctgccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctg aagcacaccacctgctccaggacgtggtggtgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgaga tcagctaccggtccagggcaagaaagagccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcacctgttcgacgagctg gagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtagctggcgtgtacatctg gaacatcgggggcagcagcggcaccagcacctacgccaccttctggtgacctggaaggggcgacgagaagaccggaa cccccccccgctgacccccagccccggggcgccgaattccatagtggaaactaccacagccacgtgttcagcgtgg gcgacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccctcgacctgctcctggagtggctgtacgt gcccatgacccccactgccagccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccacccaacgcccccaagtcctgagcc acatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcac gccgacaactacaccgctactgctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaac cacctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgtcgtggtgacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggcttctcctaccgccggcca gccccagccaccactaagccaaggagatccccctgaacccccggcaccagccccctgatccggtacgccgcctgg accggcgccctggccggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc

125	<p>atggtgagcggctggcggctgtcaagaaaatcagcggcggaggaggagtggcaccgtgaacaagcccgtggtggg cgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcacctgcggatcaccaaccccgtgcgggcccagcgtgctgcggtacgacga ttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctg ggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacgg cttctggagaaccccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccgggcatcgacagcggcgagcggctgatgca gcccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacctgaacggcgacga ccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagctacggcgacgtgtcaaggcgacctgaacccaagccccaggg ccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccctcaccctgcgggccccatccagcggatctacggcgtg cggfacaccgaaacctggagcttctgccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgctg aagcacaccacctgctccaggacgtggtggtgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgaga tcagctaccggtccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcacctgttcgacgagctg gagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggctgctgcggaccgagaagcagctacctggcgtgtacatctg gaacatgcggggcagcgcggcaccagcacctacgccaccttctggtgacctggaagggcgacgagaagaccggaa ccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgg gcgacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgt gccccatgacccccacctgccagccatcgggctgtacagcacctgcctgtaccacccaacgcccccaagtgcctgagcc acatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcac gccgacaactacaccgctactgctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggcac cacctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtactcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggcttctcctaccgccggcca gccccagccaccactaagcccaaggagatccccctgaacccccggcaccagccccctgatccggtacgccgcctgg accggcggcctggccgacgtggtgctgtgtgctgctggtgatcttctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggcc gcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcggcctgccctggacgacttcgaggacagcgcgag agcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcggaagccacggcggcagcttaccacctgtacatcgaca agacccgg</p>
126	<p>atgggcaccgtgaacaagcccgtggtggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcacctgcggatcaccaacccc gtgcgggcccagcgtgctgcggtacgacgattccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagcccta ctatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagccc ctacatctggccccggaacgactacgacggcttctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccgg ggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcat ccacgtgatccccacctgaacggcgacaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagctacggcgacgtgttc aagggcgacctgaacccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccctcacctg</p>

	<p> cgggccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttctgccagcctgacctgcaccggcga cgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtgggtggtgacctggactgcgccga gaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggaagaagaggccgaccagccctggatcgt ggtgaacaccagcacctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcgg accgagaagcagctacctgggctgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttctggt gacctggaagggcgacgagaagaccggaaacccccccccgctgacccccagccccggggcgccgaattccatat gtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggacacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggc ccccctgacctgctctggagtggctgtacgtgccatcgacccccactgcccagccatgaggctgtacagcacctgcctg taccacccaacgccccagctgcctgagccacatgaacagcggctgcaccttaccagtccccacctggcccagcgggt ggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgctactgctgggcatcagccacatggagccc agcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccacctgaagtctggacacccccgagagcctgagcggcctgtactgt gttcgtgggtgacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacacctggtcagcaccgtggaccacttctgtaacgccatc gaggagcggggcttctcctaccgccggccagccccagccaccactaagcccaaggagatccccctgtaacccccg gcaccagccccctgatccggtacgccgctggaccggcggcctggccgcaagtggctgctgttgcctgggtgatcttctgat ctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcggccgg cctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcgccgggagcca cggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagaccggggaggaggagggaagcgtcagcggctggcggctgttcaa gaagatcagc </p>
127	<p> atggtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggaggaggtggcaccgtgaacaagccccgtgggg cgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcacctgcggatcaccaacccccgtcgggccagcgtgctgcggtacgacga ttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctg ggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacgg cttctggagaacgccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgca gcccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacctgaacggcgacga ccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagctacggcgacgtgttcaaggcgacctgaacccccagccccagg ccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccccttaccctgcgggccccatccagcggatctacggcgtg cggfacaccgaaacctggagcttctgccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctg aagcacaccacctgctccaggacgtgggtggtgacctggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgaga tcagctaccggtccagggaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcacctgttcgacgagctg gagctggacccccctgagatcgagccccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagctacctggcgtgtacatctg gaacatcgggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttctggtgacctggaagggcgacgagaagaccggaa ccccacccccgctgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgg gcgacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgagggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgt gccccatgacccccacctgccagccatcgggctgtacagcacctgctgtaccacccaacgccccagctgcctgagcc </p>

	<p> acatgaacagcggctgcacfttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcac gccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggcac caccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggagggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggcttctcctaccgccggcca gccccagccaccactaagccaaggagatccccctgaaccccggcaccagccccctgttcggttacgccctgg accggcggcctggccgagtggtgctgtgcctggtgatcttctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggcc gcccgggtggacaag </p>
128	<p> atggtgagcggctggcggctgtcaagaaaatcagcggcggaggaggaggtggcaccgtgaacaagcccgtggtggg cgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcggggcagcgtgctgcggtacgacga ttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcaccacgccgagagctcctg ggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacgg ctctcggagaacgccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgca gccaccagatgagcggccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacga ccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtagcggcagctgttcaaggcgacctgaacccaagccccaggg ccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccccttaccctgcgggccccatccagcggatctacggcgtg cggtagaccgaaacctggagcttctgccagcctgacctgcaccggcgacggcctccgccatccagcacatctgcctg aagcacaccacctgcttcaggacgtggtggtgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgaga tcagctaccggtccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcacctgttcgacgagctg gagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaagtgctgcggaccgagaagcagtagctggcgtgtacatctg gaacatgcggggcagcagcggcaccagcacctacgccacfttctggtgacctggaagggcgacgagaagaccggaa cccccccccgctgacccccagccccggggcgccgaattccatagtggaaactaccacagccacgtgttcagcgtgg gcgacacctcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtactg gccatcgacccacctgccagccatcgggctgtacagcacctgcctgtaccacccaacgccccagtgctgagcc acatgaacagcggctgcacfttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcac gccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggcac caccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggagggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggcttctcctaccgccggcca gccccagccaccactaagccaaggagatccccctgaaccccggcaccagccccctgatccggttacgccctgg accggcggcctggccgagtggtgctgtgtgcctggtgatcttctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggcc gcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcggcggcctgccctggacgacttcgaggacagcgag agcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcgggaagccacggcggcagctttacaccgtgtacatcgaca agaccggg </p>

Пример 3. Экспрессия несекретируемых иммуногенов VZV с различными элементами IRES *in vitro*

В данном примере продемонстрирована экспрессия трансмембранного иммуногена gE VZV с кольцевой РНК с различными элементами IRES в клетках млекопитающих.

В данном примере создавали набор кольцевой РНК, кодирующей трансмембранный gE VZV, при этом каждый из них характеризовался различными IRES. ДНК-конструкции разрабатывали таким образом, что они содержали IRES, полинуклеотидный груз и спейсерный элемент. Полезная нагрузка, представляющая собой полинуклеотид, предусматривает комбинацию IRES и нуклеотидной последовательности трансмембранного gE VZV, а также нуклеотидной последовательности, кодирующей пептидную метку HiBiT с пептидным линкером G4S, как представлено в таблице 5.

Таблица 5

IRES	Последовательность нуклеиновой кислоты IRES	Последовательность нуклеиновой кислоты Tm gE VZV
Модифицированный CVB3	ТТААААСАСGССТGТGGGТТGATССC ACCCАСAGGCCСAТТGGGCGCTAGC АСТСТGGTATCАСGGTACСТТТGTGC GCCTGТТТТАТACCCССТСССССААС TGТААСТТАGАAGТААСАСАСАСCG ATCAACAGTCAGCGTGGCАСACCAG CCACGТТТТGATCAAGCACTTCTGT ACCCCGGACTGAGTATCAATAGACT GCTCАСCGGТТGAAGGAGAAAGCG TTCGTATCCGGCCAАСТACTTCGAA AAACСТАGТААСАСCGTGGAAAGTTG CAGAGTGTТТCGCTCAGCACTACCCС AGTGТАGATCAGGTCGATGAGTCAC CGCATТССССАСGGGCGACC GTGGC GGTGGCTGCGТТGGCGGCCTGCCCA TGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAA TАСAGАСATGGTGCGAAGAGTCTAT TGAGCTAGТТGGTAGTCCТССGGCCС CTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCG GAGCАСАСACCCTCAAGCCAGAGGG	ATGGGGACAGТТААТАААССТGTG GTGGGGGTATТGATGGGGТТСGGА АТТАТCАСGGGAACGТТGCGTATA АСГААТССGGTCAGAGCАТССGTC TTGCGATACGATGATТТТCАСATCG ATGAAGАСAAACTGGATACAAACT СCGTATATGAGCCTTACTACCATTC AGATCАТGCGGAGTCTTCATGGGT AAATCGGGGAGAGTCTTCGCGAAA AGCGTACGATCATAACTCАСCTTA TATATGGCCACGТААТGATTATGA TGGAТТТТTAGAGAACGCACACGA ACACCATGGGGTGTATAATCAGGG СCGTGGTATCGATAGCGGGGAACG GTTAATGCAACCCACАСAAATGTC TGCACAGGAGGATCTTGGGGACGA TACGGGCATCCACGТТATCCCTAC GTTAAACGGCGATGACAGACATAA AATTGTAAATGTGGACCAACGTCA ATACGGTGACGTGТТТАAGGAGA

CAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTG CAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGT CCGTGTTTCATTTTATTCCTATACTG GCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGA TCGTTACCATATAGCTATTGGATTGG CCATCCGGTGACTAATAGAGCTATT ATATATCCCTTTGTTGGGTTTATAACC ACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACA TTACAATTCATTGTTAAGTTGAATAC AGCAAC (SEQ ID NO: 113)	TCTTAATCCAAAACCCCAAGGCCA AAGACTCATTGAGGTGTCAGTGGA AGAAAATCACCCGTTTACTTTACG CGCACCGATTTCAGCGGATTTATGG AGTCCGGTACACCGAGACTTGGAG CTTTTTGCCGTCATTAACCTGTACG GGAGACGCAGCGCCCGCCATCCAG CATATATGTTTAAAACATACAACA TGCTTTC AAGACGTGGTGGTGGAT GTGGATTGCGCGGAAAATACTAAA GAGGATCAGTTGGCCGAAATCAGT TACCGTTTTCAAGGTAAGAAGGAA GCGGACCAACCGTGGATTGTTGTA AACACGAGCACACTGTTTGATGAA CTCGAATTAGACCCCCCGAGATT GAACCGGGTGTCTTGAAAGTACTT CGGACAGAAAAACAATACTTGGGT GTGTACATTTGGAACATGCGCGGC TCCGATGGTACGTCTACCTACGCC ACGTTTTTGGTCACCTGGAAAGGG GATGAAAAACAAGAAACCCTACG CCCGCAGTAACTCCTCAACCAAGA GGGGCTGAGTTTCATATGTGGAAT TACCACTCGCATGTATTTTCAGTTG GTGATACGTTTAGCTTGGCAATGC ATCTTCAGTATAAGATACATGAAG CGCCATTTGATTTGCTGTTAGAGTG GTTGTATGTCCCATCGATCCTACA TGTC AACCAATGCGGTTATATTCTA CGTGTTTGTATCATCCCAACGCACC CCAATGCCTCTCTCATATGAATTCC GGTTGTACATTTACCTCGCCACATT TAGCCCAGCGTGTGCAAGCACAG TGTATCAA AATTGTGAACATGCAG ATAACTACACCGCATATTGTCTGG
---	--

		<p>GAATATCTCATATGGAGCCTAGCT TTGGTCTAATCTTACACGACGGGG GCACCACGTTAAAGTTTGTAGATA CACCCGAGAGTTTGTTCGGGATTAT ACGTTTTTGTGGTGTATTTAACGG GCATGTTGAAGCCGTAGCATAAC TGTTGTATCCACAGTAGATCATTTT GTAAACGCAATTGAGGAGCGTGGA TTCCCGCCAACGGCCGGTCAGCCA CCGGCGACTACTAAACCCAAGGAA ATTACCCCGTAAACCCCGGAACG TCACCACTTCTACGATATGCCGCAT GGACCGGAGGGCTTGCAGCAGTAG TACTTTTATGTCTCGTAATATTTT AATCTGTACGGCTAAACGAATGAG GGTTAAAGCCGCCAGGGTAGACAA GTGA (SEQ ID NO: 121)</p>
EMCV	<p>ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGA ATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATA TGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCT TTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAAC CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATT CCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAA AGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAG CTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGT AGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAAC CCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCT GCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGA TACACCTGCAAAGGCGGCACAACCC CAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAG TTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTC CTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTG AAGGATGCCCAGAAGGTACCCATT</p>	<p>SEQ ID NO: 121</p>

	<p>GTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCG GTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGT CGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCC CCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCC TTGAAAAACACGATGATAATA (SEQ ID NO: 114)</p>	
EV71	<p>TTAAAACAGCTGTGGGTTGTCACCC ACCCACAGGGTCCACTGGGCGCTAG TACACTGGTATCTCGGTACCTTTGTA CGCCTGTTTTATACCCCCTCCCTGAT TTGCAACTTAGAAGCAACGCAAACC AGATCAATAGTAGGTGTGACATAACC AGTCGCATCTTGATCAAGCACTTCTG TATCCCCGGACCGAGTATCAATAGA CTGTGCACACGGTTGAAGGAGAAAA CGTCCGTTACCCGGCTAACTACTTCG AGAAGCCTAGTAACGCCATTGAAGT TGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTCCC CCCGTGTAGATCAGGTCGATGAGTC ACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTG GCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCC TATGGGGTAACCCATAGGACGCTCT AATACGGACATGGCGTGAAGAGTCT ATTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGC CCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTG CGGAGCACATACCCTTAATCCAAAG GGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTC TGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGT GTCCGTGTTTCTTTTTATTCTTGTATT GGCTGCTTATGGTGACAATTAAGA ATTGTTACCATATAGCTATTGGATTG GCCATCCAGTGTCAAACAGAGCTAT TGTATATCTCTTTGTTGGATTCACAC CTCTCACTCTTGAAACGTTACACACC CTCAATTACATTATACTGCTGAACAC</p>	SEQ ID NO: 121

	GAAGCGGCCACC (SEQ D NO: 115)	
HRV-2 (ринови рус человек а типа 89 (HRV89))	TTAAAACTGGGAGTGGGTTGTTCCC ACTCACTCCACCCATGCGGTGTTGTA CTCTGTTATTACGGTAACTTTGTACG CCAGTTTTTCCCACCCTTCCCCATAA TGTAAGTTAGAAAGTTTGTACAATATG ACCAATAGGTGACAATCATCCAGAC TGTCAAAGGTCAAGCACTTCTGTTC CCCGGTCAATGAGGATATGCTTTAC CCAAGGCAAAAACCTTAGAGATCGT TATCCCCACACTGCCTACACAGAGC CCAGTACCATTTTTGATATAATTGGG TTGGTCGCTCCCTGCAAACCCAGCA GTAGACCTGGCAGATGAGGCTGGAC ATTCCCCACTGGCGACAGTGGTCCA GCCTGCGTGGCTGCCTGCTCACCTT CTTGGGTGAGAAGCCTAATTATTGA CAAGGTGTAAAGAGCCGCGTGTGCT CAGTGTGCTTCCTCCGGCCCCTGAAT GTGGCTAACCTTAACCCTGCAGCCG TTGCCATAATCCAATGGGTTTGC GG TCGTAATGCGTAAGTGCGGGATGGG ACCAACTACTTTGGGTGTCCGTGTTT CCTGTTTTTCTTTTGATTGCATTTTAT GGTGACAATTTATAGTGTATAGATT GTCATC (SEQ ID NO: 116)	SEQ ID NO: 121
AEV	TTTGAAAGAGGCCTCCGGAGTGTCC GGAGGCTCTCTTTCGACCCAACCCAT ACTGGGGGGTGTGTGGGACCGTACC TGGAGTGCACGGTATATATGCATTC CCGCATGGCAAGGGCGTGCTACCTT GCCCCTTGACGCATGGTATGCGTCAT CATTTGCCTTGGTTAAGCCCCATAGA AACGAGGCGTCACGTGCCGAAAATC	SEQ ID NO: 121

	<p>CCTTTGCGTTTCACAGAACCATCCTA ACCATGGGTGTAGTATGGGAATCGT GTATGGGGATGATTAGGATCTCTCG TAGAGGGATAGGTGTGCCATTCAAA TCCAGGGAGTACTCTGGCTCTGACA TTGGGACATTTGATGTAACCGGACC TGGTTCAGTATCCGGGTTGTCCTGTA TTGTTACGGTGTATCCGTCTTGGCAC ACTGAAAGGGTATTTTTGGGTAATC CTTTCCTACTGCCTGATAGGGTGGCG TGCCCGGCCACGAGAGATTAAGGGT AGCAATTTAAACGCCACC (SEQ ID NO: 122)</p>	
<p>Айчиви рус</p>	<p>TTTGAAAAGGGGGTGGGGGGGCCTC GGCCCCCTCACCTCTTTTCCGGTGG TCTGGTCCCGGACCACCGTACTCCA TTCAGCTTCTTCGGAACCTGTTCCGA GGAATTAACGGGCACCCATACTCC CCCCACCCCTTTTGTAACCTAAGTA TGTGTGCTCGTGATCTTGACTCCAC GGAACGGACCGATCCGTTGGTGAAC AAACAGCTAGGTCCACATCCTCCCTT CCCCTGGGAGGGCCCCCGCCCTCCC ACATCCTCCCCCAGCCTGACGTATC ACAGGCTGTGTGAAGCCCCCGCGAA AGCTGCTCACGTGGCAATTGTGGGT CCCCCTTCATCAAGACACCAGGTCT TTCCTCCTTAAGGCTAGCCCCGGCGT GTGAATTCACGTTGGGCAACTAGTG GTGTCACTGTGCGCTCCCAATCTCGG CCGCGGAGTGCTGTTCCCCAAGCCA AACCCCTGGCCCTTCACTATGTGCCT GGCAAGCATATCTGAGAAGGTGTTC CGCTGTGGCTGCCAACCTGGTGACA</p>	<p>SEQ ID NO: 121</p>

	GGTGCCCCAGTGTGCGTAACCTTCTT CCGTCTCCGGACGGTAGTGATTGGTT AAGATTTGGTGTAAGGTTTCATGTGC CAACGCCCTGTGCGGGATGAAACCT CTACTGCCCTAGGAATGCCAGGCAG GTACCCACCTCCGGGTGGGATCTG AGCCTGGGCTAATTGTCTACGGGTA GTTTCATTTCCAATCCTTTTATGTCG GAGTCGCCACC (SEQ ID NO: 117)	
Крохив ирус В	GTATAAGAGACAGGTGTTTGCCTTG TCTTCGGACTGGCATCTTGGGACCA ACCCCCCTTTTCCCAGCCATGGGTT AAATGGCAATAAAGGACGTAACAAC TTTGTAAACCATTAAGCTTTGTAATTT TGTAACCACTAAGCTTTGTGCACATA ATGTAACCATCAAGCTTGTTAGTCCC AGCAGGAGGTTTGCATGCTTGTAGC CGAAATGGGGCTCGACCCCCCATAG TAGGATACTTGATTTTGCATTCCATT GTGGACCTGCAAACCTACACATAG AGGCTTTGTCTTGCATCTAAACACCT GAGTACAGTGTGTACCTAGACCCTA TAGTACGGGAGGACCGTTTGTTCCT CAATAACCCTACATAATAGGCTAGG TGGGCATGCCCAATTTGCAAGATCC CAGACTGGGGGTTCGGTCTGGGCAGG GTTAGATCCCTGTTAGCTACTGCCTG ATAGGGTGGTGCTCAACCATGTGTA GTTTAAATTGAGCTGTTTCATATACCG CCACC (SEQ ID NO: 118)	SEQ ID NO: 121
Эховир ус 11	TTAAAACAGCCTGTGGGTGTTCCCA TCCACAGGGCCCCTGGGCGCCAGC ACTCTGGTATTGCGGTACCTTAGTGC GCCTGTTTTATATACCCGTCCCCAA	SEQ ID NO: 121

	ACGTAACCTTAGACGCATGTCAACGA AGACCAATAGTAAGCGCAGCACACC AGCTGTGTTCCGGTCAAGCACTTCTG TTACCCCGGACCGAGTATCAATAAG CTACTCACGTGGCTGAAGGAGAAAA CGTTCGTTACCCGACCAATTAATTCA AGAAACCTAGTAACACCATGAAGGT TGCGCAGTGTTTCGCTCCGCACAACC CCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTC ACCGCATTCCCACGGGTGACCGTG GCGGTGGCTGCGCTGGCGGCCTGCC CATGGGGAAACCCATGGGACGCTTC AATACTGACATGGTGCGAAGAGTCT ATTGAGCTAATTGGTAGTCCTCCGGC CCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTG CGGAGCAGATACCCACACACCAGTG GGCAGTCTGTCGTAACGGGCAACTC TGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGT GTCCGTGTTTCTCTTTATCCTTATACT GGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAG ATTGTTACCATATAGCTATTGGATTG GCCATCCGGTGACAAATAGAGCAAT TGTGTATTTGTTTGTGGTTTCGTGC CATTAAATTACAAGGTTCTAAACAC CCTTAATCTTATTATAGCATTCAACA CAACAAAGCCACC (SEQ ID NO: 119)	
Модифицированный CVB3	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 121

Кольцевые РНК получали, как описано в примере 1.

Кольцевой РНК (1,0 пикомоля) трансфицировали клетки НЕК293Т (100000 клеток на лунку в 96-луночной планшете в бессывороточной среде) с применением Lipofectamine MessengerMax (Invitrogen, LMRNA015) в соответствии с инструкциями производителя.

MessengerMax отдельно использовали в качестве контроля. Клетки собирали через 24 часа после трансфекции и измеряли экспрессию gE, как описано выше.

На фиг. 8 показано, что иммуногены gE VZV были выявлены на клеточной поверхности клеток HEK293T из каждой из кольцевых РНК, кодирующих трансмембранный gE, за исключением кольцевой РНК, содержащей IRES AEV.

Пример 4. Экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевой РНК в мышинной модели

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевых РНК в мышинной модели.

Кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали IRES и нуклеотидную последовательность, кодирующую секретиремый иммуноген VZV или несекретиремый иммуноген VZV (например, трансмембранный иммуноген VZV).

В данном примере ДНК-конструкции разрабатывали таким образом, чтобы они содержали IRES, полинуклеотидный груз и спейсерный элемент. Конструкции разрабатывали таким образом, чтобы они содержали polyA50 в качестве спейсерного элемента и комбинацию модифицированного сайта внутренней посадки рибосомы CVB3 (IRES) (SEQ ID NO: 48) и ORF в качестве полинуклеотидного груза. В случае ДНК-конструкции, кодирующей секретиремый иммуноген VZV, ORF конструировали таким образом, чтобы она содержала сигнальную последовательность секреции, нуклеотидную последовательность gE VZV и нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT с пептидным линкером G4S ("G4S" раскрыт под SEQ ID NO: 112) (SEQ ID NO: 113). В случае конструкции ДНК, кодирующей несекретиремый иммуноген VZV, ORF конструировали таким образом, чтобы она содержала нуклеотидную последовательность трансмембранного gE VZV и нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT (SEQ ID NO: 123) с пептидным линкером G4S (SEQ ID NO: 112).

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с применением РНК-полимеразы T7 с ДНК-матриц в присутствии 7,5 mM NTP. ДНК-матрицу удаляли путем обработки ДНКазой в течение 20 минут. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050). Самосплайсинг происходил во время транскрипции; дополнительной реакции не требовалось. Кольцевую РНК, кодирующую gE VZV, очищали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной (PAGE с мочевиной) или посредством колоночной хроматографии с обращенной фазой.

Очищенную кольцевую РНК составляли с липидной наночастицей с получением препарата на основе кольцевой РНК. Вкратце, кольцевую РНК разбавляли 25 mM

ацетатным буфером с $\text{pH} = 4$ (профильтрованным через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм) до концентрации 0,2 мкг/мкл. Липидные наночастицы (LNP) составляли посредством предварительного растворения ионизируемого липида (например, ALC0315), холестерина, DSPC и DMG-PEG2000 в этаноле (профильтрованном через стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,2 мкм) при молярном соотношении 50/38,5/10/1,5 мол. %. Конечное весовое соотношение ионизируемый липид/РНК составляло 6/1 вес/вес. Растворы липида и РНК смешивали в чипе-микромиксере с применением микрофлюидной системы при соотношении скоростей потока буфер/этанол 3/1 и общей скорости потока 1 мл/мин. Затем LNP подвергали диализу в PBS с $\text{pH} = 7,4$ в течение 3 часов с удалением этанола. LNP концентрировали до требуемой концентрации РНК с применением центрифужных фильтров Amicon с отсечкой по 100 кДа, при необходимости.

Три мыши Balb/C на группу ($n = 3$) получали дозу препарата на основе кольцевой РНК, составляющую либо 10 мкг, либо 50 мкг, путем внутримышечной инъекции в день 0 (праймирующая доза) и день 28 (бустерная доза). Мышам ($n = 3$) не вводили кольцевую РНК путем внутримышечной инъекции в день 0 и день 28, но вводили PBS, который использовали в качестве контролей. Мышей ($n = 3$), которым путем внутримышечной инъекции вводили 5 мкг вакцины SHINGRIX в день 0 и день 28, также использовали в качестве контролей.

Через 6 часов, 2 дня и 5 дней после введения праймирующей дозы образцы сыворотки крови собирали у каждой мыши, которой путем инъекции вводили дозы 50 мкг препарата на основе кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE VZV, или PBS. Уровни gE VZV измеряли с использованием метки HiBiT; анализа для выявления биолюминесцентного белка в соответствии с инструкциями производителя (система для внеклеточного выявления HiBiT Nano-Glo®, № по каталогу Promega N420). Данные показаны на **фиг. 9** как среднее значение для трех животных на группу. Концентрацию gE (нг/мл) интерполировали из стандарта HiBiT. Через шесть часов после внутримышечной иммунизации кольцевой РНК, кодирующей секретируемый gE, секретируемый gE был выявлен в сыворотке крови в концентрациях ~200 нг/мл.

Пример 5. Иммуногенность иммуногенов VZV из кольцевой РНК в мышинной модели

В данном примере продемонстрировано, что кольцевые РНК, кодирующие иммуноген VZV, индуцируют иммуногенспецифический ответ у мышей.

Кольцевые РНК разрабатывали, получали и составляли в LNP, как описано в примере 4.

Три мыши Balb/C на группу ($n = 3$) получали дозу препарата на основе кольцевой РНК, составляющую либо 10 мкг, либо 50 мкг, путем внутримышечной инъекции в день 0

(праймирующая доза) и день 28 (бустерная доза). Мышам ($n = 3$) не вводили кольцевую РНК путем внутримышечной инъекции, но вводили PBS, который использовали в качестве контролей. Мышей ($n = 3$), которым путем внутримышечной инъекции вводили 5 мкг вакцины SHINGRIX, также использовали в качестве контролей.

Образцы сыворотки крови выделяли из мышей, которым вводили препараты на основе кольцевой РНК, как описано в примере 4, в дни 14, 35 и 42. Образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия VZV-специфического IgG. Планшеты для ELISA покрывали в течение ночи при 4°C белком gE (белок, изготовленный на заказ в Genscript; 100 нг на лунку) в 100 мкл 1X покрывающего буфера (Biolegend, 421701). Затем планшеты блокировали в течение 1 часа с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% BSA и 0,05% Tween 20). Сыворотку крови последовательно разбавляли 8 раз (4-кратные разбавления от 500 до 8192000), затем добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-буферного солевого раствора с детергентом Tween® (TBS-T) планшеты инкубировали с антителом к IgG мыши для выявления, конъюгированным с HRP (Abcam, ab97023), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, затем добавляли субстрат тетраметилбензол (TMB) для ELISA (ThermoFisher, 34022). Планшет выдерживали в течение 20 минут, а затем реакцию гасили с применением 0,2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (O. D.) определяли при 450 нм. Титр конечной точки определяли как последнее разбавление со значением оптической плотности, в 4 раза превышающим фоновое значение.

Результаты демонстрируют, что антитела к gE начали продуцироваться в день 14 после инъекции для секретируемого и трансмембранного gE, и титр продолжал повышаться после введения бустерной дозы (**фиг. 10**).

В день 42 после введения праймирующей дозы мышей умерщвляли, а селезенки собирали и тестировали в отношении ответов Т-клеток на gE VZV посредством анализа ELISpot в соответствии с протоколом производителя (Mabtech, 3321-4HPT-10). Вкратце, селезенки собирали и обрабатывали с получением суспензии отдельных клеток. Спленоциты высевали при 0,5 М клеток на лунку в планшеты для ELISpot IFN- γ . Спленоциты либо не стимулировали, либо стимулировали пептидными пулами gE (JPT, PM-VZV-gE) в концентрации 1 мкг/мл. Клетки культивировали в течение ночи и планшет анализировали на следующий день в соответствии с протоколом производителя. **На фиг. 11** показано, что кольцевая РНК, кодирующая секретируемый gE (Sec gE), и кольцевая РНК, кодирующая трансмембранный gE (Tm gE), обеспечивали праймирование Т-клеточных ответов после иммунизации дозой 10 мкг.

В день 42 после введения праймирующей дозы мышей умерщвляли и селезенки обрабатывали с получением суспензии отдельных клеток, как описано выше. Спленоциты высевали при 0,5/лунка в 96-луночный планшет с U-образным дном. Спленоциты либо не стимулировали, либо стимулировали пептидными пулами gE (JPT, PM-VZV-gE) в концентрации 1 мкг/мл. Спленоциты культивировали в течение 1 часа с последующим добавлением ингибиторов внутриклеточного белка (ингибиторы транспорта белка GolgiPlug™ и GolgiStop™ (BD, 555028)), а затем культивировали в течение дополнительных 5 часов. Затем спленоциты фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали в соответствии с протоколом производителя (BD, 555028).

На фиг. 12A показано, что кольцевая РНК, кодирующая секретиремый gE (Sec gE), и кольцевая РНК, кодирующая трансмембранный gE (Tm gE), обеспечивали праймирование CD8 T-клеток после иммунизации дозой 10 мкг. **На фиг. 12B** показано, что кольцевая РНК, кодирующая секретиремый gE (Sec gE), и кольцевая РНК, кодирующая трансмембранный gE (Tm gE), обеспечивали праймирование CD4 T-клеток после иммунизации дозой 10 мкг. Кольцевые РНК обеспечивали праймирование значительно большего количества CD4 T-клеток по сравнению с вакциной SHINGRIX.

Эти результаты демонстрируют, что кольцевая РНК, кодирующая секретиремый gE или трансмембранный gE, индуцировала gE-специфические гуморальные и клеточные иммунные ответы у мышей.

Пример 11. Разработка, получение и очистка кольцевой РНК, кодирующей иммуногены VZV

В данном примере описаны разработка, получение и очистка *in vitro* кольцевых РНК, которые кодируют иммуногены VZV (например, иммуноген gE VZV). Кольцевые РНК разрабатывают для включения IRES, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноген VZV, и по меньшей мере одного спейсерного элемента. Некоторые из кольцевых РНК, кодирующих иммуноген VZV, также кодируют нативную лидерную последовательность или сигнал секреции.

В данном примере кольцевые РНК получают посредством одного из двух иллюстративных способов и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Иллюстративный способ 1. Лигирование с помощью ДНК-шунта

Посредством данного способа получают кольцевую РНК с применением лигирования с помощью шунта. Линейную РНК, обработанную RppH, циркуляризируют с применением ДНК-шунта. Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с использованием РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (New England Biolabs), обрабатывают

РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356) следуя инструкциям производителя. В качестве альтернативы или дополнительно РНК транскрибируют при избытке GMP относительно GTP.

Лигирование с помощью шунта выполняют следующим образом: кольцевую РНК получают посредством обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов с применением РНК-лигазы. Для очистки кольцевых РНК смеси для лигирования разделяют посредством PAGE в денатурирующих условиях с использованием 4% геля, и вырезают полосы РНК, соответствующие каждой из кольцевых РНК. Вырезанные из геля фрагменты РНК измельчают и РНК элюируют буфером для элюирования из геля (0,5 М ацетат натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA) в течение одного часа при 37°C. В качестве альтернативы или дополнительно кольцевую РНК очищают посредством колоночной хроматографии. Собирают супернатант и снова элюируют РНК, добавляя к измельченному гелю буфер для элюирования геля, и инкубируют в течение одного часа. Остатки геля удаляют посредством центрифужных фильтров и осаждают этанолом. Электрофорез в агарозном геле применяют в качестве анализа контроля качества для валидации чистоты и циркуляризации.

Иллюстративный способ 2. Циркуляризация посредством самосплайсирующегося интрона

Посредством данного способа получают кольцевую РНК с применением самосплайсинга. Кольцевую РНК получают *in vitro*. Обеспечивают транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы. Реакционные смеси для транскрипции *in vitro* включали 1 мкг ДНК-матрицы с промотором РНК-полимеразы T7, 10X реакционный буфер для T7, 7,5 мМ АТР, 7,5 мМ СТР, 7,5 мМ GTP, 7,5 мМ UTP, 10 мМ DTT, 40 ед. ингибитора РНКаз и фермент T7. Транскрипцию выполняют при 37°C в течение 4 ч. Транскрибированную РНК обрабатывают ДНКазой с использованием 1 ед. ДНКазы I при 37°C в течение 15 мин. Для содействия циркуляризации путем самосплайсирования добавляют дополнительное количество GTP до конечной концентрации 2 мМ, инкубируют при 55°C в течение 15 мин. Затем РНК очищают на колонке и визуализируют посредством PAGE с мочевиной.

Пример 12. Экспрессия иммуногенов VZV *in vitro*

В данном примере описана экспрессия иммуногенов VZV с кольцевых РНК в клетках млекопитающих. Для измерения экспрессии иммуногенов VZV с конструкций РНК получают и очищают кольцевую РНК, кодирующую иммуноген VZV, в соответствии со способами, описанными в данном документе. Кольцевой РНК (0,1 пиколя) трансфицируют НЕК293 (10000 клеток на лунку в 96-луночной планшете в

бессывороточной среде) с применением MessengerMax (Invitrogen, LMRNA). Клеточный супернатант собирают через 24 часа. Анализ посредством ELISA выполняют следующим образом: планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96 лунок) покрывают антителом для захвата в течение ночи при 4°C в 100 мкл PBS. После трехкратной промывки с использованием TBS-T планшеты блокируют в течение 1 часа с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% FBS и 0,05% Tween 20). Затем в каждую лунку добавляют разведения супернатантов в 100 мкл блокирующего буфера и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с использованием TBS-T планшеты инкубируют с HRP детектирующим антителом в течение 1 часа при комнатной температуре. В каждую лунку добавляют тетраметилбензол (Pierce 34021), позволяют прореагировать в течение 5-15 минут и затем гасят 2 н. серной кислотой. Значение оптической плотности (OD) определяют при 450 нм.

Пример 13. Экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевой РНК в мышинной модели

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевых РНК. Кольцевые РНК конструируют и получают, как описано в примере 11. После очистки кольцевые РНК составляют следующим образом:

А. кольцевую РНК разбавляют с помощью PBS с получением препарата на основе кольцевой РНК ("голой").

В. кольцевую РНК составляют с липидной наночастицей с получением препарата на основе кольцевой РНК (составленной с LNP). Вкратце, кольцевую РНК разбавляют 25 мМ ацетатным буфером с pH = 4. Липидные наночастицы (LNP) составляют посредством предварительного растворения ионизируемого липида (например, ALC0315), холестерина, DSPC и DMG-PEG2000 в этаноле при мольном соотношении 50/38,5/10/1,5 мол. %. Конечное весовое соотношение ионизируемый липид/РНК составляет 8/1 вес/вес. Растворы липидов и РНК смешивают на чипе-микросмесителе с использованием микрофлюидной системы. Затем LNP подвергают диализу в PBS с pH = 7,4 с удалением этанола. Концентрацию кольцевой РНК корректируют с помощью PBS.

С. кольцевую РНК составляют с адьювантом, таким как адьювант Addavax™ (Invivogen), адьювант MF59®, AS01/AS01B, AS03, квасцы, CpG1018 или поли(I:C) с получением препарата на основе кольцевой РНК (составленной с адьювантом). Вкратце, кольцевую РНК смешивают с адьювантом.

В одном подходе препараты на основе кольцевой РНК ("голой", составленной с LNP, составленной с адьювантом) вводят мышам внутрикожно или внутримышечно в день 0, при этом второе внутрикожное или внутримышечное введение осуществляют через 4

недели. Во втором подходе мышам вводят препарат на основе кольцевой РНК, полученный посредством разбавления кольцевой РНК с помощью PBS ("голой"), или препарат на основе кольцевой РНК, полученный посредством составления кольцевой РНК в LNP (составленной с LNP), внутривожно или внутримышечно в день 0, при этом вторую внутривожную или внутримышечную инъекцию осуществляют через 4 недели. Для второго подхода адъювант (такой как адъювант Addavax™ (Invivogen), адъювант MF59®, AS01/AS01B, AS03, квасцы, CpG1018 или поли(I:C)) вводят мышам в день 0 (одновременная доставка с препаратом на основе кольцевой РНК) или через 24 часа. В случае обоих подходов контрольную группу мышей обрабатывают средой-носителем и не обрабатывают кольцевой РНК. Можно включить дополнительную контрольную группу, включающую введение кольцевой РНК, но не включающую введение адъюванта.

Образцы крови собирают на протяжении всего исследования для мониторинга титров gE-специфических антител в сыворотке крови посредством ELISA. Кровь (35 мкл) собирают из хвостовой вены каждой мыши в сухие пробирки через 1 день, 2 дня, 3 дня и 7 дней, а затем один раз в неделю в течение 9 недель после введения дозы. Сыворотку крови собирают посредством центрифугирования в течение 25 минут при 1300 g при 4°C и уровни иммуногена VZV измеряют посредством ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

В конечной временной точке мышей умерщвляют. Селезенку и лимфатические узлы собирают и тестируют в отношении специфичности иммуногена gE посредством проточной цитометрии и ELISpot. Собранную сыворотку крови тестируют в анализе ингибирования инфекции для определения нейтрализующей способности сывороточных антител.

Пример 14. Экспрессия иммуногенов VZV с кольцевой РНК, доставляемой с адъювантом, в мышинной модели *in vivo*

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевых РНК с иммунным усилением посредством доставки вместе с адъювантом, таким как адъювант AddaSO3™ (Invivogen). Кольцевые РНК конструируют и получают, как описано в примере 11. Кольцевые РНК составляют посредством смешивания с равным объемом раствора адъюванта AddaSO3™. Препараты на основе кольцевой РНК/адъювантов вводят мышам внутримышечно в день 0, при этом второе введение осуществляют через 4 недели. Контрольную группу мышей обрабатывают средой-носителем и не обрабатывают кольцевой РНК. Можно включить дополнительную контрольную группу, включающую введение кольцевой РНК, но не включающую введение адъюванта. Образцы крови собирают на протяжении всего исследования для

мониторинга титров gE-специфических антител в сыворотке крови посредством ELISA. Кровь (35 мкл) собирают из хвостовой вены каждой мыши в сухие пробирки через 1 день, 2 дня, 3 дня и 7 дней, а затем один раз в неделю в течение 9 недель после введения дозы. Сыворотку крови собирают посредством центрифугирования в течение 25 минут при 1300 g при 4°C и уровни иммуногена VZV измеряют посредством ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

В конечной временной точке мышей умерщвляют. Селезенку и лимфатические узлы собирают и тестируют в отношении Т-клеток, специфических в отношении иммуногена gE, посредством проточной цитометрии и ELISpot. Собранную сыворотку крови тестируют в анализе ингибирования инфекции для определения нейтрализующей способности сывороточных антител.

Пример 15. Экспрессия иммуногенов VZV с кольцевой РНК, доставляемой с адьювантом, в мышинной модели *in vivo*

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов VZV *in vivo* с кольцевых РНК с иммунным усилением посредством доставки вместе с адьювантом, таким как адьювант AddaSO3™ (Invivogen). Кольцевые РНК конструируют и получают, как описано в примере 11. Кольцевые РНК составляют посредством смешивания с равным объемом раствора адьюванта AddaSO3™. Препараты на основе кольцевой РНК/адьювантов вводят мышам внутривенно в день 0, при этом второе введение осуществляют через 4 недели. Контрольную группу мышей обрабатывают средой-носителем и не обрабатывают кольцевой РНК. Можно включить дополнительную контрольную группу, включающую введение кольцевой РНК, но не включающую введение адьюванта. Образцы крови собирают на протяжении всего исследования для мониторинга титров gE-специфических антител в сыворотке крови посредством ELISA. Кровь (35 мкл) собирают из хвостовой вены каждой мыши в сухие пробирки через 1 день, 2 дня, 3 дня и 7 дней, а затем один раз в неделю в течение 9 недель после введения дозы. Сыворотку крови собирают посредством центрифугирования в течение 25 минут при 1300 g при 4°C и уровни иммуногена VZV измеряют посредством ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

В конечной временной точке мышей умерщвляют. Селезенку и лимфатические узлы собирают и тестируют в отношении Т-клеток, специфических в отношении иммуногена gE, посредством проточной цитометрии и ELISpot. Собранную сыворотку крови тестируют в анализе ингибирования инфекции для определения нейтрализующей способности сывороточных антител.

Другие варианты осуществления

Различные модификации и варианты описанных композиций, способов и путей применения по настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от объема и сути настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное настоящее изобретение не должно неправомерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Более того, предполагается, что различные модификации описанных режимов для осуществления настоящего изобретения, которые очевидны специалистам в данной области, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

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

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[1] Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный иммуноген вируса ветряной оспы (VZV).

[2] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [1], где полипептидный иммуноген VZV представляет собой гликопротеин VZV или его иммуногенный фрагмент.

[3] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [2], где гликопротеин VZV выбран из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV или их иммуногенного фрагмента.

[4] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [3], где гликопротеин VZV представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент.

[5] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где гликопротеин VZV представляет собой мутационный вариант gE VZV или его иммуногенный фрагмент, содержащий не более 10 аминокислотных замен, делеций или вставок относительно gE VZV дикого типа.

[6] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует якорный домен (домен для удерживания в ER).

[7] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует карбоксиконцевой хвостовой домен.

[8] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-524, 1-546, 1-561, 1-573 или 1-623 gE VZV.

[9] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.

[10] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-573 gE VZV и мутацию Y569A.

[11] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-623 gE VZV и мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.

[12] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68.

[13] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [12], где полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68.

[14] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, а полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70.

[15] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [14], где полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, а полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70.

[16] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [4], где полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83.

[17] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [16], где полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную

последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83.

[18] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [1], где полипептидный иммуноген VZV представляет собой немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент.

[19] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [18], где немедленно-ранний белок VZV представляет собой полипептид IE63.

[20] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [19], где полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 84.

[21] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [20], где полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 84.

[22] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [18], где полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 85.

[23] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [22], где полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 85.

[24] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[23], где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием GC, составляющим по меньшей мере 51%.

[25] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [24], где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием GC от 51% до 60%.

[26] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[25], где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием уридина, составляющим более 20%.

[27] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [26], где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, характеризуется содержанием уридина от 20% до 28%.

[28] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[27], где полипептидный иммуноген VZV дополнительно содержит последовательность, кодирующую домен мультимеризации.

[29] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [28], где домен мультимеризации выбран из домена сборки T4, домена ферритина, β -кольцеобразного пептида, пептида AaLS или домена люмазинсинтазы.

[30] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [28] или [29], где домен мультимеризации находится на N-конце полипептидного иммуногена VZV.

[31] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [28] или [29], где домен мультимеризации находится на C-конце полипептидного иммуногена VZV.

[32] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[31], где открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, функционально связана с IRES.

[33] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[32], где открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, кодирует второй полипептид.

[34] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [33], где полипептидный иммуноген VZV и второй полипептид разделены полипептидным линкером, саморасщепляющимся пептидом 2A, сайтом расщепления протеазой или саморасщепляющимся пептидом 2A в тандеме с сайтом расщепления протеазой.

[35] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [34], где сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления фурином.

[36] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[32], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит вторую открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептид, функционально связанный со вторым IRES.

[37] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [33]-[36], где второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген.

[38] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [37], где второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген VZV.

[39] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [38], где второй полипептид представляет собой гликопротеин VZV, выбранный из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV, немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент.

[40] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [39], где второй полипептид представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент.

[41] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [33], где второй полипептид представляет собой IE63 VZV или его иммуногенный фрагмент.

[42] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [33]-[36], где второй полипептид представляет собой полипептидный адъювант.

[43] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [42], где адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

[44] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[43], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[45] Кольцевой полирибонуклеотид согласно варианту осуществления [44], где стимулятор врожденной иммунной системы выбран из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

[46] Иммуногенная композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из вариантов осуществления [1]-[45] и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[47] Иммуногенная композиция согласно варианту осуществления [46], где композиция дополнительно содержит второй кольцевой полирибонуклеотид.

[48] Иммуногенная композиция согласно варианту осуществления [47], где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептидный иммуноген.

[49] Иммуногенная композиция согласно варианту осуществления [47], где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный адъювант.

[50] Иммуногенная композиция согласно варианту осуществления [47], где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[51] Способ индуцирования у субъекта иммунного ответа против VZV, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции согласно любому из вариантов осуществления [1]-[50].

[52] Способ предупреждения у субъекта инфекции VZV, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции согласно любому из вариантов осуществления [1]-[50].

[53] Способ лечения субъекта, у которого имеется инфекция VZV или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции согласно любому из вариантов осуществления [1]-[50].

[54] Способ согласно варианту осуществления [53], где у субъекта ранее была диагностирована инфекция VZV или нарушение, ассоциированное с инфекцией VZV.

[55] Способ согласно варианту осуществления [53] или [54], где инфекция VZV является бессимптомной, или инфекция VZV является неактивной.

[56] Способ согласно любому из вариантов осуществления [53]-[55], где у субъекта был диагностирован опоясывающий лишай.

[57] Способ согласно варианту осуществления [56], где введение кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции обеспечивает снижение частоты или тяжести симптомов, ассоциированных с опоясывающим лишаем.

[58] Способ согласно любому из вариантов осуществления [51]-[57], где субъект представляет собой субъекта-человека.

[59] Способ по любому из вариантов осуществления [51]-[58], дополнительно включающий введение субъекту адъюванта.

[60] Способ согласно любому из вариантов осуществления [51]-[59], дополнительно включающий введение субъекту полипептидного иммуногена VZV.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный иммуноген вируса ветряной оспы (VZV).
2. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 1, где полипептидный иммуноген VZV представляет собой гликопротеин VZV или его иммуногенный фрагмент.
3. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 2, где гликопротеин VZV выбран из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV или их иммуногенного фрагмента.
4. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 3, где гликопротеин VZV представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент.
5. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где гликопротеин VZV представляет собой мутационный вариант gE VZV или его иммуногенный фрагмент, содержащий не более 10 аминокислотных замен, делеций или вставок относительно gE VZV дикого типа.
6. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует якорный домен (домен для удерживания в ER).
7. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV представляет собой усеченный полипептид, в котором отсутствует карбоксиконцевой хвостовой домен.
8. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-524, 1-546, 1-561, 1-573 или 1-623 gE VZV.
9. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV содержит мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.
10. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-573 gE VZV и мутацию Y569A.
11. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV содержит аминокислоты 1-623 gE VZV и мутацию Y569A, мутацию Y582G или двойную мутацию Y569A/Y582G.
12. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 29-33 и 65-68.
13. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV дополнительно содержит сигнальную последовательность, а полипептид gE VZV и сигнальная последовательность вместе содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 34-38 и 69-70.

14. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептид gE VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-47 и 71-83.

15. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 1, где полипептидный иммуноген VZV представляет собой немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент.

16. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 15, где немедленно-ранний белок VZV представляет собой полипептид IE63.

17. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 16, где полипептид IE63 VZV содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 84.

18. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 16, где полипептид IE63 VZV, необязательно дополнительно содержащий сигнальную последовательность, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 85.

19. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 1-18, где полипептидный иммуноген VZV дополнительно содержит последовательность, кодирующую домен мультимеризации.

20. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 1-19, где открытая рамка считывания, кодирующая полипептидный иммуноген VZV, кодирует второй полипептид.

21. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 20, где полипептидный иммуноген VZV и второй полипептид разделены полипептидным линкером, саморасщепляющимся пептидом 2A, сайтом расщепления протеазой или саморасщепляющимся пептидом 2A в тандеме с сайтом расщепления протеазой.

22. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 20 или п. 21, где второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген.

23. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 22, где второй полипептид представляет собой полипептидный иммуноген VZV.

24. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 23, где второй полипептид представляет собой гликопротеин VZV, выбранный из gE, gI, gB, gH, gK, gL, gC, gN и gM VZV, немедленно-ранний белок VZV или его иммуногенный фрагмент.

25. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 24, где второй полипептид представляет собой gE VZV или его иммуногенный фрагмент.

26. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 24, где второй полипептид представляет собой IE63 VZV или его иммуногенный фрагмент.

27. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 20 или п. 21, где второй полипептид представляет собой полипептидный адъювант.

28. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 1-27, где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

29. Иммуногенная композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 1-28 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

30. Иммуногенная композиция по п. 29, где композиция дополнительно содержит второй кольцевой полирибонуклеотид.

31. Иммуногенная композиция по п. 30, где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую второй полипептидный иммуноген.

32. Иммуногенная композиция по п. 30, где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептидный адъювант.

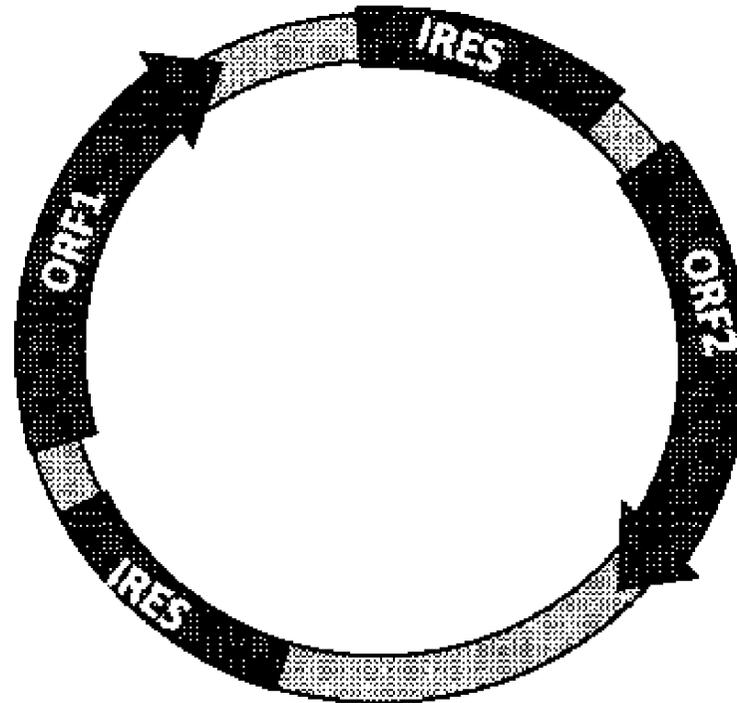
33. Иммуногенная композиция по п. 30, где второй кольцевой полирибонуклеотид содержит некодирующую последовательность рибонуклеиновой кислоты, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

34. Способ индуцирования у субъекта иммунного ответа против VZV, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции по любому из пп. 1-33.

35. Способ предупреждения у субъекта инфекции VZV, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции по любому из пп. 1-33.

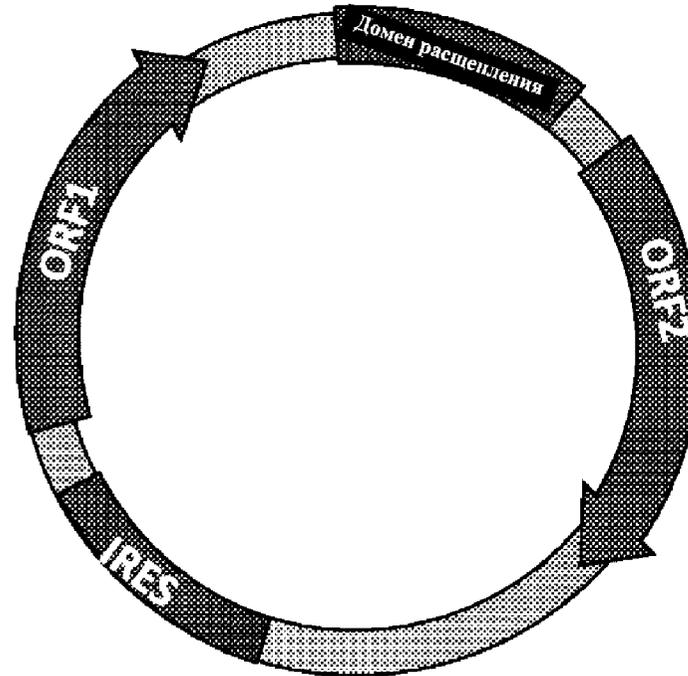
36. Способ лечения субъекта, у которого имеется инфекция VZV или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида или иммуногенной композиции по любому из пп. 1-33.

Фиг. 1



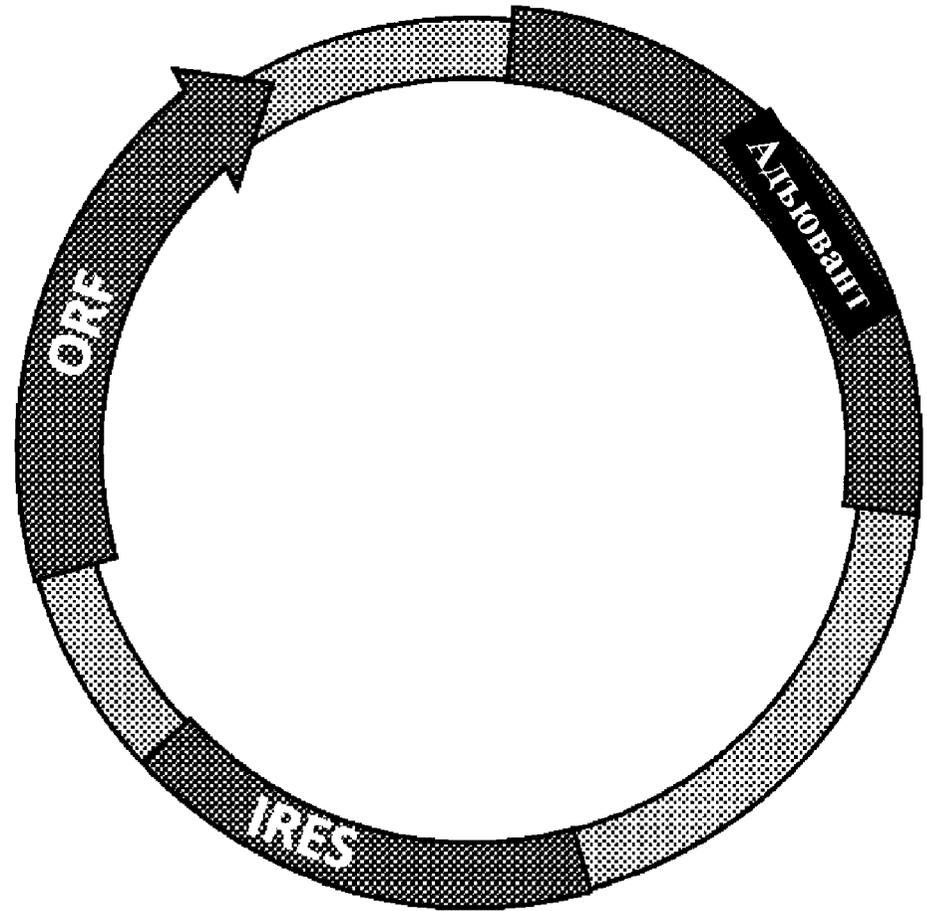
Пример	ORF1	ORF2	Где
А	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Каждый из иммуногена 1 и иммуногена 2 представляет собой иммуноген VZV
В	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 представляет собой иммуноген VZV, а иммуноген 2 представляет собой иммуноген, отличный от иммуногена VZV
С	Иммуноген	Адьювант	ORF1 кодирует иммуноген VZV, а ORF2 кодирует полноценный адьювант.

Фиг. 2

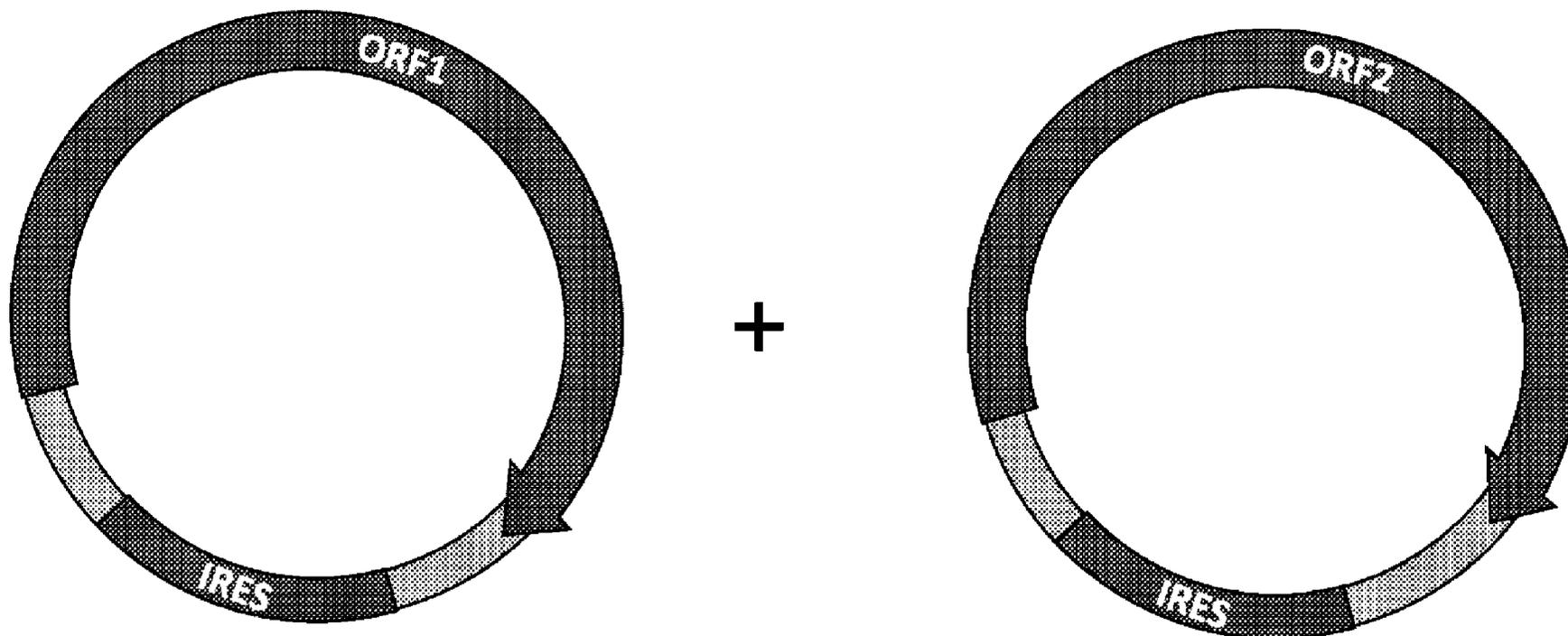


Пример	ORF1	Сайт расщепления	ORF2	Где
А	Иммуноген 1	2А, фурин или фурин-2А	Иммуноген 2	Каждый из иммуногена 1 и иммуногена 2 представляют собой иммуногены VZV
В	Иммуноген 1	2А, фурин или фурин-2А	Иммуноген 2	Иммуноген 1 представляет собой иммуноген VZV, а иммуноген 2 представляет собой иммуноген, отличный от иммуногена VZV
С	Иммуноген	2А, фурин или фурин-2А	Адьювант	ORF1 кодирует иммуноген VZV, а ORF2 кодирует полипептидный адьювант.

Фиг. 3



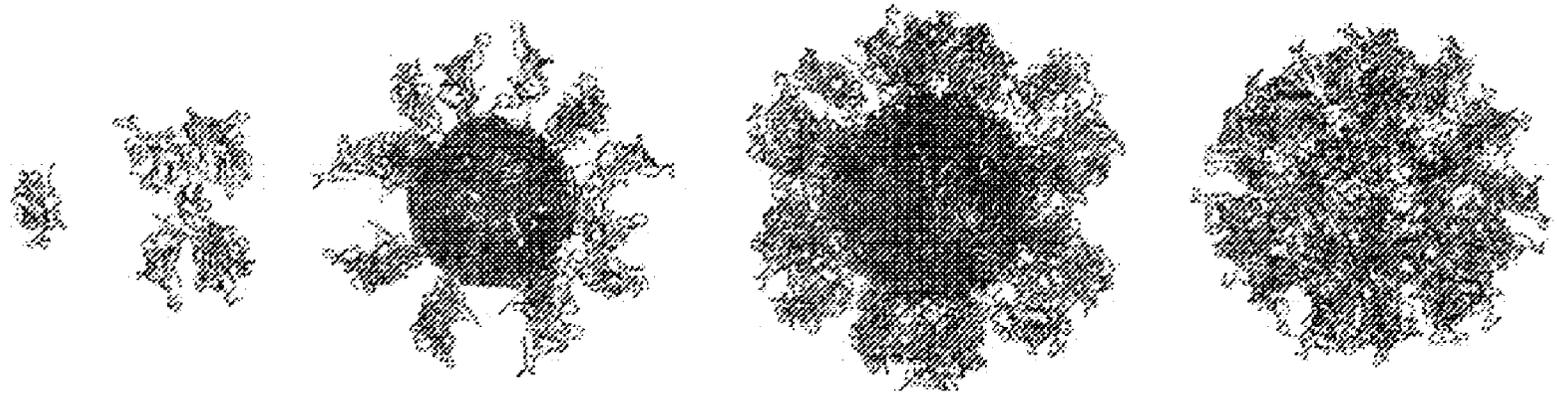
Фиг. 4



4/13

Пример	ORF1	ORF2	Где
А	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Каждый из иммуногена 1 и иммуногена 2 представляют собой иммуногены VZV
В	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 представляет собой иммуноген VZV, а иммуноген 2 представляет собой иммуноген, отличный от иммуногена VZV
С	Иммуноген	Адьювант	ORF1 кодирует иммуноген VZV, а ORF2 кодирует полипептидный адьювант.

Фиг. 5



Иммуноген

**Иммуноген-
домен сборки-
иммуноген**

**Иммуноген-
ферритин**

**Иммуноген-
AaLS**

**Иммуноген-
bann**

Копии: 1

Копии: 6

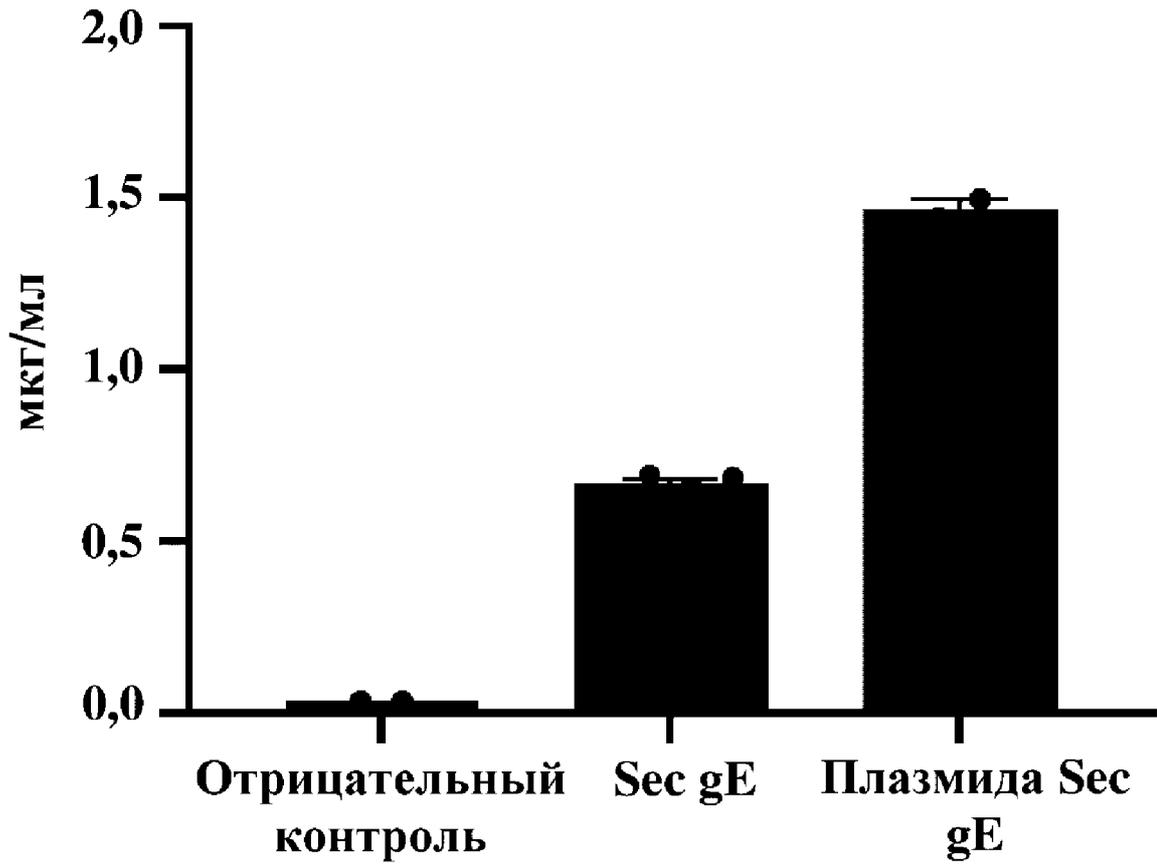
Копии: 24

Копии: 60

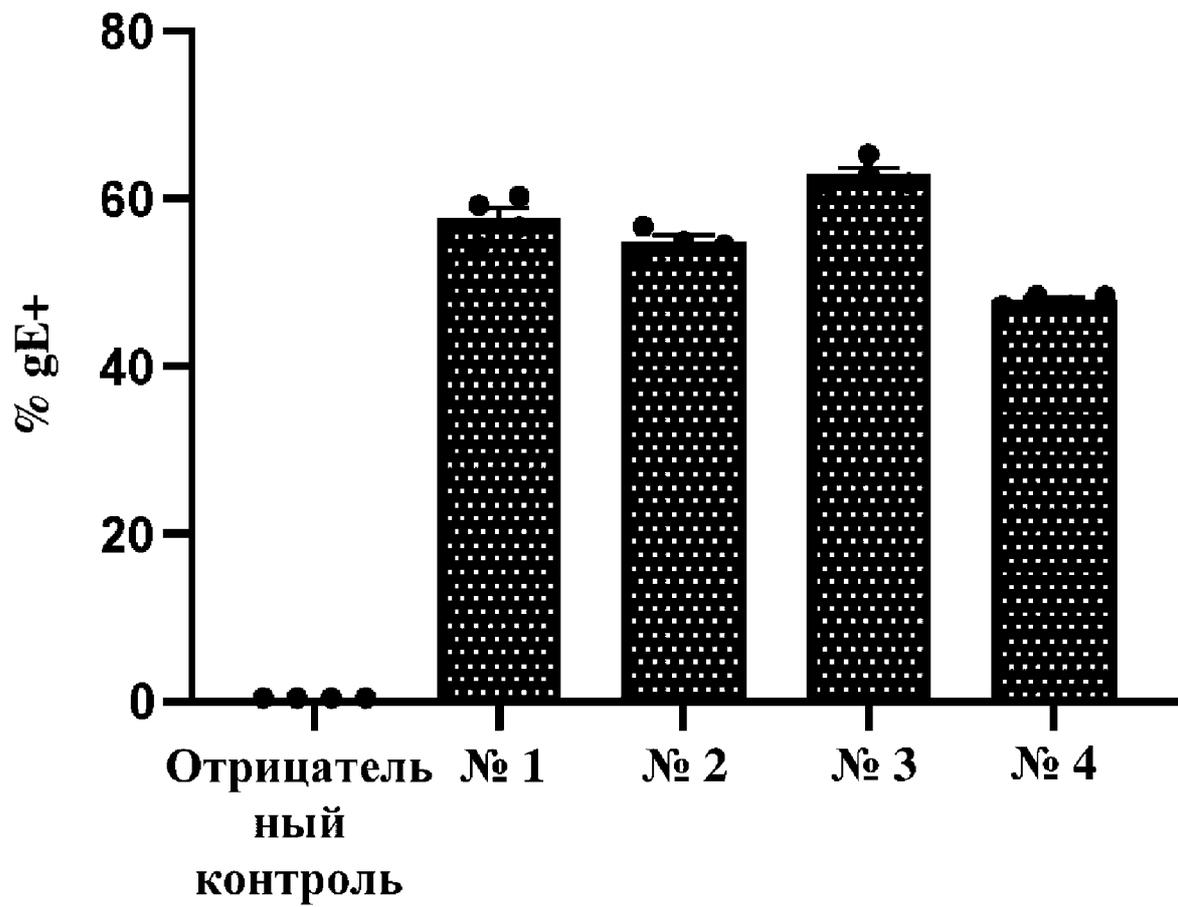
Копии: 60



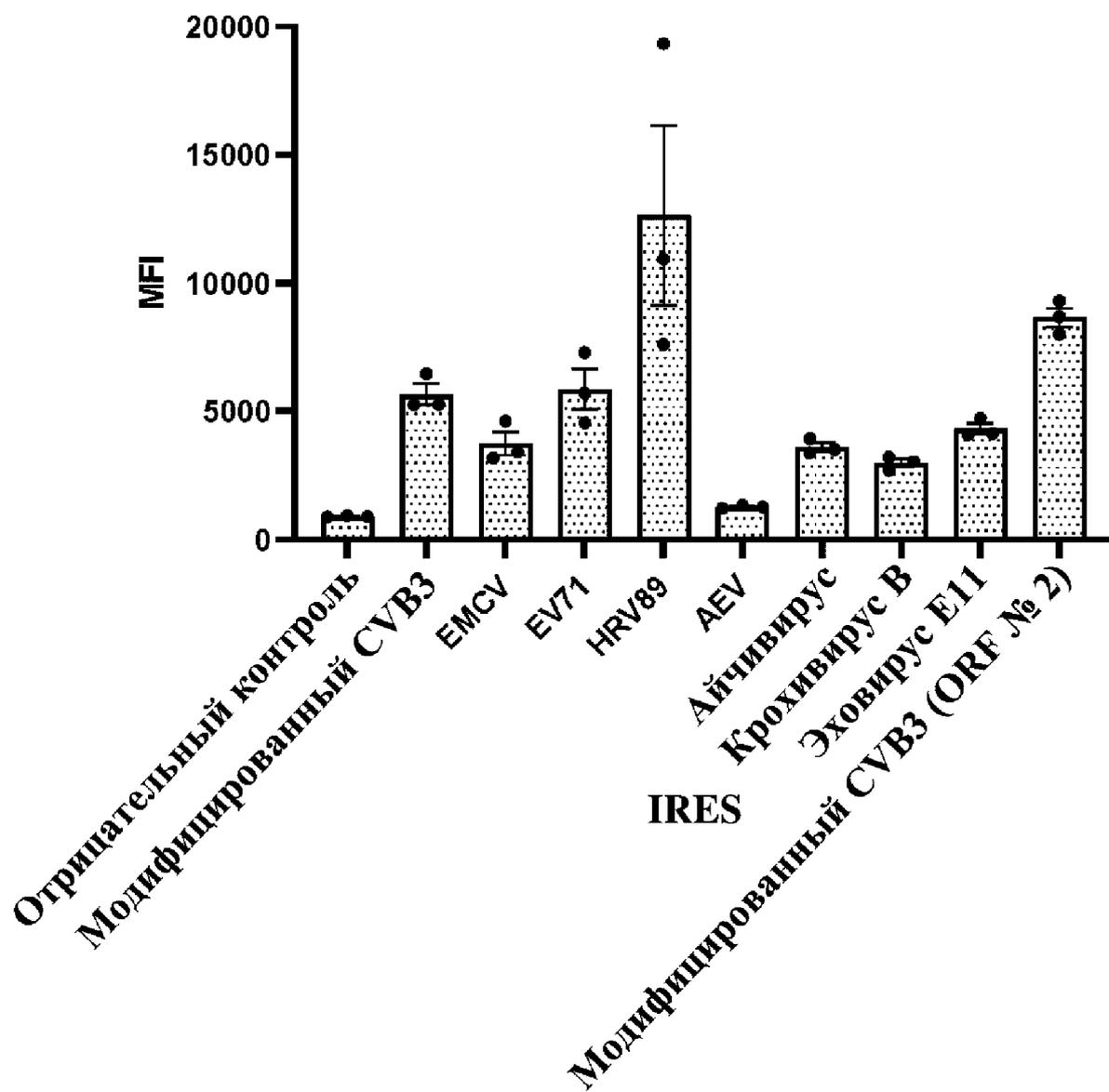
Фиг. 6

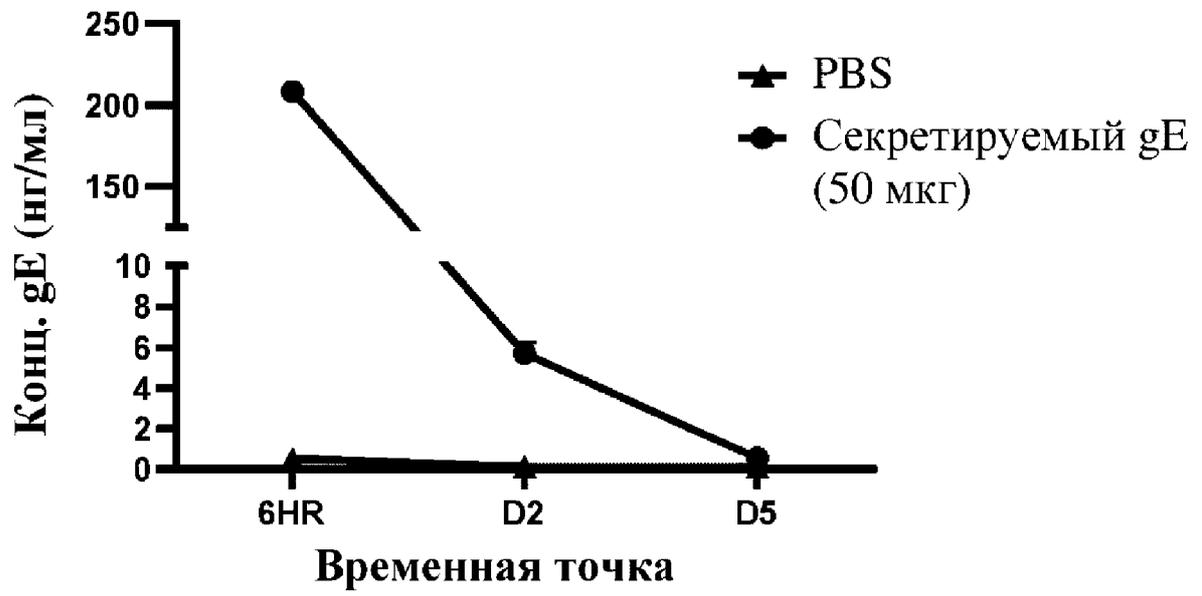


Фиг. 7

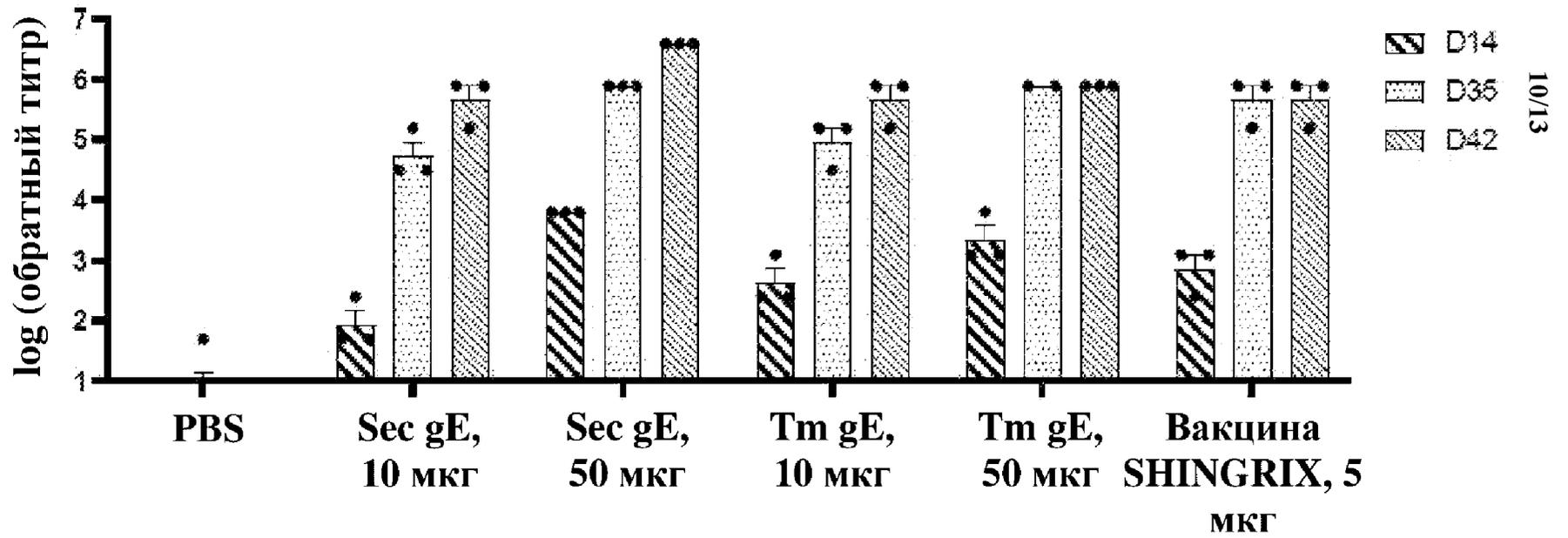


Фиг. 8

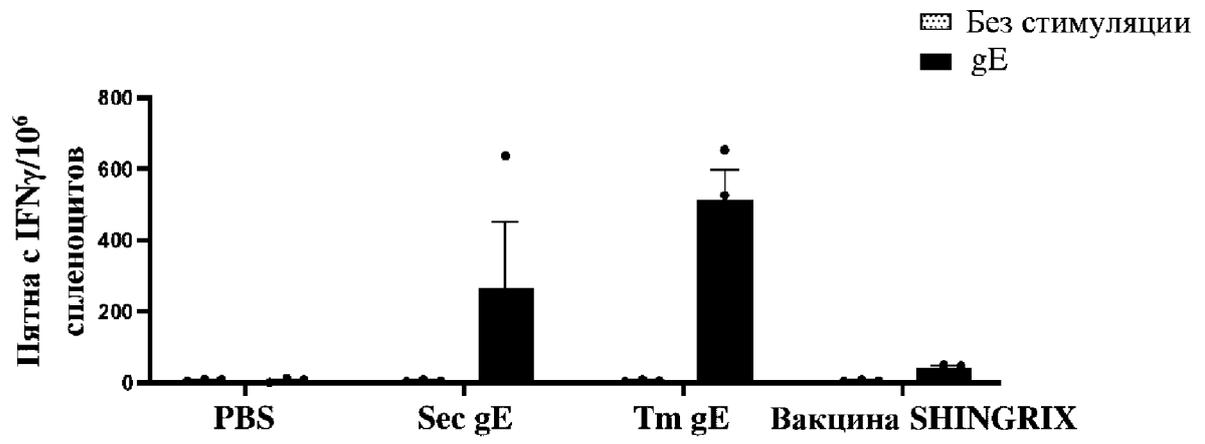




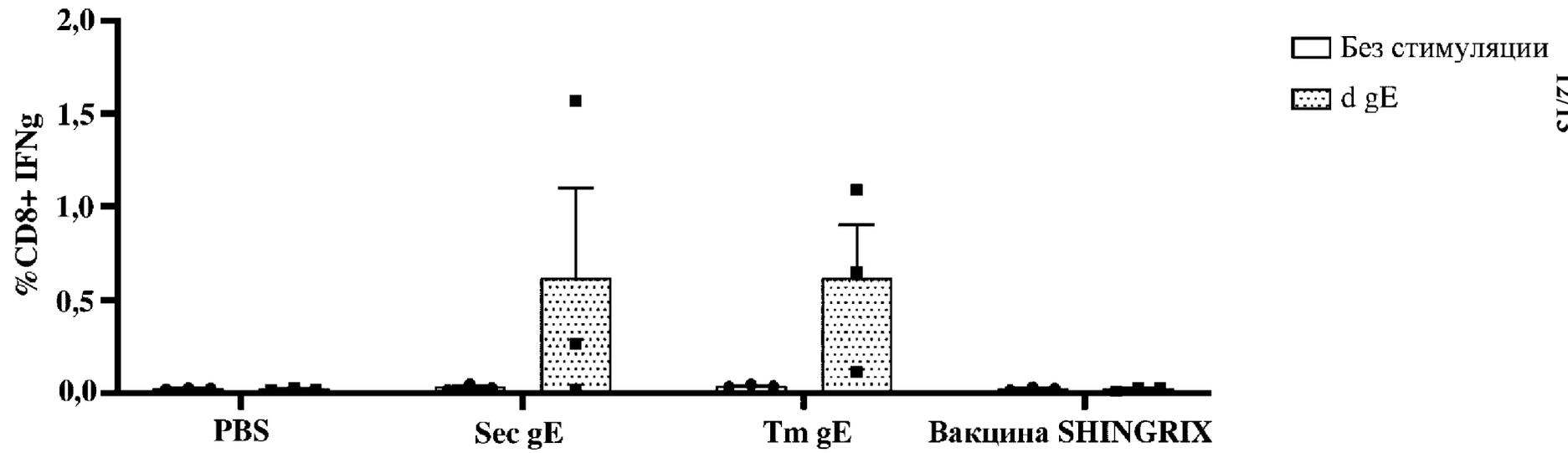
Фиг. 10



11/13
Фиг. 11



Фиг. 12А



Фиг. 12В

