

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491638** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.08.07

(22) Дата подачи заявки
2022.12.23

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) **КОЛЬЦЕВЫЕ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДЫ, КОДИРУЮЩИЕ АНТИФУЗОГЕННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ**

(31) **63/293,495**

(32) **2021.12.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/082345**

(87) **WO 2023/122789 2023.06.29**

(71) Заявитель:

**ФЛЭГШИП ПАЙОНИРИНГ
ИННОВЕЙШНЗ VI, ЭлЭлСи (US)**

(72) Изобретатель:

**Миральес Хинес Диего, Громада
Джеспер (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение в общем относится к композициям и способам получения, очистки и применения кольцевой РНК, кодирующей антифузогенный полипептид.

A1

202491638

202491638

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581526EA/023

КОЛЬЦЕВЫЕ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДЫ, КОДИРУЮЩИЕ АНТИФУЗОГЕННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Доставка полинуклеотидов и белков важна для широкого спектра терапевтических областей. Однако современные методы доставки зачастую являются неэффективными. Например, доставка коротких полипептидов, таких как полипептиды, в которых закодирован антифузогенный полипептид, зачастую приводит к короткому периоду полужизни и быстрому клиренсу полипептидов. Соответственно, существует потребность в улучшенных композициях и способах доставки антифузогенного полипептида, например, для лечения или предупреждения вирусной инфекции.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе кольцевой РНК, кодирующей антифузогенный полипептид, и способы ее получения, очистки и применения.

В одном аспекте в настоящем изобретении описан кольцевой полирибонуклеотид, который содержит полирибонуклеотидный груз, кодирующий антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с полипептидом из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-324.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит границу сплайсинга, соединяющую 5'-фрагмент экзона и 3'-фрагмент экзона.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит IRES, функционально связанный с экспрессионной последовательностью, кодирующей антифузогенный полипептид. Кольцевой полирибонуклеотид может дополнительно содержать спейсерную область между IRES и 3'-фрагментом экзона или 5'-фрагментом экзона. Длина спейсерной области может составлять по меньшей мере 5 рибонуклеотидов. Например, длина спейсерной области может составлять по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, или более

рибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной области составляет от 5 до 500 рибонуклеотидов. Спейсерная область может содержать последовательность поли(A), поли(A-C), поли(A-U) или поли(A-G). Спейсерная область может представлять собой случайную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления длина кольцевого полирибонуклеотида составляет по меньшей мере 500 рибонуклеотидов. Например, кольцевой полирибонуклеотид может составлять по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000 или более полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина кольцевого полирибонуклеотида составляет от 500 до 20000 рибонуклеотидов.

В другом аспекте описан линейный полирибонуклеотид, содержащий от 5' к 3': (A) 3'-фрагмент интрона; (B) 3'-сайт сплайсинга; (C) 3'-фрагмент экзона; (D) полирибонуклеотидный груз, кодирующий антифузогенный полипептид; (E) 5'-фрагмент экзона; (F) 5'-сайт сплайсинга и (G) 5'-фрагмент интрона.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит IRES, функционально связанный с экспрессионной последовательностью, кодирующей антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1). Кольцевой полирибонуклеотид может дополнительно содержать спейсерную область между IRES и 3'-фрагментом экзона или 5'-фрагментом экзона. Кольцевой полирибонуклеотид может дополнительно содержать спейсерную область между одним или несколькими из (A), (B), (C), (D), (E), (F) и (G).

Длина спейсерной области может составлять по меньшей мере 5 рибонуклеотидов. Например, длина спейсерной области может составлять по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более рибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной области составляет от 5 до 500 рибонуклеотидов. Спейсерная область может содержать последовательность поли(A), поли(A-C), поли(A-U) или поли(A-G). Спейсерная область может представлять собой случайную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует IRES. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует одна или обе из последовательности 5'-кэп и поли(A).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт инициации трансляции белка. В некоторых вариантах осуществления сайт инициации трансляции белка содержит последовательность Козак.

В некоторых вариантах осуществления длина линейного полирибонуклеотида составляет по меньшей мере 500 рибонуклеотидов. Например, линейный полирибонуклеотид может составлять по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1.000,

2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, или более полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина линейного полирибонуклеотида составляет от 500 до 20000 рибонуклеотидов.

В другом аспекте описан ДНК-вектор, кодирующий полирибонуклеотид (например, линейный или кольцевой полирибонуклеотид), описанный в данном документе.

В другом аспекте описан способ экспрессии антифузогенного полипептида (например, полипептида из таблицы 1) в клетке. Способ включает обеспечение кольцевого, линейного полирибонуклеотида или ДНК-вектора, описанных в данном документе, по отношению к клетке в условиях, подходящих для экспрессии антифузогенного полипептида.

В другом аспекте описан способ получения кольцевого полирибонуклеотида из линейного полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Способ включает обеспечение линейного полирибонуклеотида в условиях, подходящих для самосплайсинга линейного полирибонуклеотида, с получением кольцевого полирибонуклеотида.

В другом аспекте описана фармацевтическая композиция, которая содержит кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид или ДНК-вектор согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления и разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

В другом аспекте описан способ экспрессии антифузогенного полипептида (например, полипептида из таблицы 1) у субъекта. Способ включает введение первой дозы фармацевтической композиции в количестве, достаточном для получения концентрации в сыворотке крови, составляющей по меньшей мере 500 нг/мл (например, по меньшей мере 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл, 1000 нг/мл, 1100 нг/мл, 1200 нг/мл, 1300 нг/мл, 1400 нг/мл, 1500 нг/мл, 1600 нг/мл, 1700 нг/мл, 1800 нг/мл, 1900 нг/мл, 2000 нг/мл, 2100 нг/мл, 2200 нг/мл, 2300 нг/мл, 2400 нг/мл, 2500 нг/мл, 2600 нг/мл, 2700 нг/мл, 2800 нг/мл, 2900 нг/ мл, 3000 нг/мл или более) антифузогенного полипептида (например, полипептида из таблицы 1) у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать введение второй дозы фармацевтической композиции. Способ может дополнительно включать введение третьей, четвертой, пятой, шестой, седьмой, восьмой, девятой, десятой или более доз фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят через по меньшей мере один час (например, по меньшей мере через два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть часов, семь часов, восемь часов, девять часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать

месяцев, один год или дольше) после первой дозы фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят в период от 1 часа до 1 года (например, от 1 часа до 1 дня, например, один час, два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть часов, семь часов, восемь часов, девять часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа или один день, например, от одного дня до одной недели, например, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней или одна неделя, например, от одной недели до одного месяца, например, две недели, три недели или один месяц, например, от одного месяца до одного года, например, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев или один год) после первой дозы фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят в период от 1 дня до 180 дней (например, от 1 дня до 90 дней, от 1 дня до 45 дней, от одного дня до 30 дней, от 1 дня до 14 дней, от 1 дня до 7 дней, от 2 дней до 45 дней, от 2 дней до 30 дней, от 2 дней до 14 дней, от 2 дней до 7 дней, от 3 дней до 90 дней, от 3 дней до 45 дней, от 3 дней до 30 дней, от 3 дней до 14 дней, от 3 дней до 7 дней, от 4 дней до 90 дней, от 4 дней до 45 дней, от 4 дней до 30 дней, от 4 дней до 14 дней, от 4 дней до 7 дней, от 5 дней до 90 дней, от 5 дней до 45 дней, от 5 дней до 30 дней, от 5 дней до 14 дней, от 5 дней до 7 дней, от 6 дней до 90 дней, от 6 дней до 45 дней, от 6 дней до 30 дней, от 6 дней до 14 дней, от 6 дней до 7 дней, от 7 дней до 90 дней, от 7 дней до 45 дней, от 7 дней до 30 дней, от 7 дней до 14 дней, от 14 дней до 90 дней, от 14 дней до 45 дней, от 14 дней до 30 дней, от 21 дня до 90 дней, от 21 дня до 60 дней, от 21 дня до 45 дней, от 21 дня до 30 дней, от 30 дней до 90 дней, от 30 дней до 60 дней, от 30 дней до 45 дней, от 45 до 180 дней, от 45 до 120 дней, от 45 до 100 дней, от 45 до 90 дней, от 45 до 60 дней, от 60 до 180 дней, от 60 до 120 дней, от 60 до 100 дней, от 60 до 90 дней, от 90 до 100 дней, от 90 до 120 дней или от 90 до 180 дней) после первой дозы фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления третью дозу вводят через по меньшей мере один час (например, по меньшей мере через два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть часов, семь часов, восемь часов, девять часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев, один год или дольше) после второй дозы фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления третью дозу вводят в период от 1 часа до 1 года (например, от 1 часа до 1 дня, например, один час, два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть часов, семь часов, восемь часов, девять часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа или один день, например, от одного дня до одной недели, например, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней или одна неделя, например, от одной

недели до одного месяца, например, две недели, три недели или один месяц, например, от одного месяца до одного года, например, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев или один год) после второй дозы фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления третью дозу вводят в период от 1 дня до 180 дней (например, от 1 дня до 90 дней, от 1 дня до 45 дней, от одного дня до 30 дней, от 1 дня до 14 дней, от 1 дня до 7 дней, от 2 дней до 45 дней, от 2 дней до 30 дней, от 2 дней до 14 дней, от 2 дней до 7 дней, от 3 дней до 90 дней, от 3 дней до 45 дней, от 3 дней до 30 дней, от 3 дней до 14 дней, от 3 дней до 7 дней, от 4 дней до 90 дней, от 4 дней до 45 дней, от 4 дней до 30 дней, от 4 дней до 14 дней, от 4 дней до 7 дней, от 5 дней до 90 дней, от 5 дней до 45 дней, от 5 дней до 30 дней, от 5 дней до 14 дней, от 5 дней до 7 дней, от 6 дней до 90 дней, от 6 дней до 45 дней, от 6 дней до 30 дней, от 6 дней до 14 дней, от 6 дней до 7 дней, от 7 дней до 90 дней, от 7 дней до 45 дней, от 7 дней до 30 дней, от 7 дней до 14 дней, от 14 дней до 90 дней, от 14 дней до 45 дней, от 14 дней до 30 дней, от 21 дня до 90 дней, от 21 дня до 60 дней, от 21 дня до 45 дней, от 21 дня до 30 дней, от 30 дней до 90 дней, от 30 дней до 60 дней, от 30 дней до 45 дней, от 45 до 180 дней, от 45 до 120 дней, от 45 до 100 дней, от 45 до 90 дней, от 45 до 60 дней, от 60 до 180 дней, от 60 до 120 дней, от 60 до 100 дней, от 60 до 90 дней, от 90 до 100 дней, от 90 до 120 дней или от 90 до 180 дней) после второй дозы фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят до того, как концентрация в сыворотке крови субъекта антифузогенного полипептида становится менее приблизительно 500 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает поддержание концентрации в сыворотке крови, составляющей по меньшей мере 500 нг/мл (например, по меньшей мере 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл, 1000 нг/мл, 1100 нг/мл, 1200 нг/мл, 1300 нг/мл, 1400 нг/мл, 1500 нг/мл, 1600 нг/мл, 1700 нг/мл, 1800 нг/мл, 1900 нг/мл, 2000 нг/мл, 2100 нг/мл, 2200 нг/мл, 2300 нг/мл, 2400 нг/мл, 2500 нг/мл, 2600 нг/мл, 2700 нг/мл, 2800 нг/мл, 2900 нг/мл, 3000 нг/мл или более), антифузогенного полипептида у субъекта, например, в течение по меньшей мере одного часа (например, по меньшей мере двух часов, трех часов, четырех часов, пяти часов, шести часов, семи часов, восьми часов, девяти 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, 23 часов, один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев, один год или дольше).

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает лечение или предупреждение вирусной инфекции у субъекта. Например, фармацевтическую композицию можно вводить субъекту в количестве и в течение периода времени, достаточного для лечения или предупреждения вирусной инфекции. Фармацевтическую композицию можно вводить субъекту для снижения риска вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает лечение или предупреждение инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека (HIV).

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает лечение или предупреждение коронавирусной инфекции (например, бета-коронавирусной инфекции, например, инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, такой как инфекция, вызываемая SARS-CoV-2, которая обуславливает симптомы COVID-19).

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает лечение или предупреждение инфекции, вызываемой вирусом гепатита С (HCV).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полинуклеотид, кодирующий антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1), применяют для снижения проникновения вируса.

В другом аспекте описан кольцевой полирибонуклеотид, который содержит полирибонуклеотидный груз, кодирующий несколько антифузогенных полипептидов. Полирибонуклеотидный груз может содержать экспрессирующие последовательности, кодирующие антифузогенные полипептиды. В некоторых вариантах осуществления антифузогенные полипептиды направлены на один и тот же вирус. Альтернативно антифузогенные полипептиды могут быть направлены на более чем один вирус.

Определения

Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже даны определения ряда терминов. Термины, определенные в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалисту средней квалификации в областях, относящихся к настоящему изобретению. Термины, такие как термины в форме единственного числа, не предназначены для обозначения только объекта в единственном числе, но включают общий класс, для иллюстрации которого может быть применен конкретный пример. Термин "или" применяют для обозначения "и/или", если явно не указано, что он относится только к альтернативным вариантам или альтернативные варианты являются взаимоисключающими, хотя в настоящем изобретении предусмотрено определение, которое относится только к альтернативным вариантам и "и/или". В данном документе терминология применяется для описания конкретных вариантов осуществления, но их применение не следует рассматривать как ограничивающее за исключением тех случаев, когда это указано в формуле изобретения.

При использовании в данном документе любые значения, представленные в виде диапазона значений, включают как верхние, так и нижние границы, и любые значения, содержащиеся в пределах верхних и нижних границ.

Используемый в данном документе термин "приблизительно" относится к значению, которое находится в пределах $\pm 10\%$ от указанного значения.

Используемый в данном документе термин "носитель" означает соединение, композицию, реагент или молекулу, которые облегчают перенос или доставку композиции (например, кольцевого полирибонуклеотида) в клетку путем ковалентной модификации кольцевого полирибонуклеотида, посредством частичного или полного инкапсулирования

средства или их комбинации. Неограничивающие примеры носителей включают углеводные носители (например, ангидрид-модифицированный фитогликоген или материал типа гликогена), наночастицы (например, наночастицу, которая инкапсулирует кольцевой полирибонуклеотид или ковалентно соединена, связывается с кольцевым полирибонуклеотидом), липосомы, фузосомы, дифференцированные *ex vivo* ретикулоциты, экзосомы, белковые носители (например, белок, ковалентно связанный с кольцевым полирибонуклеотидом) или катионные носители (например, катионный липополимер или реагент для трансфекции).

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

Используемый в данном документе термин "эффективность циркуляризации" означает величину, равную соотношению полученного кольцевого полирибонуклеотида и его некольцевого исходного материала.

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" 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 "экспрессионная последовательность"

означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует продукт, например, пептид или полипептид (например, антифузогенный полипептид). 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, антифузогенного полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антифузогенный полипептид, относится к непрерывной, менее чем целой части последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты. Фрагмент полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, например, относится к непрерывной, менее чем целой части (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 любого антифузогенного полипептида, раскрытого в данном документе.

Используемый данным документе термин "Fc-домен" относится к полипептидной цепи, которая содержит по меньшей мере шарнирный домен, а также второй и третий константные домены антитела (C_H2 и C_H3) или их функциональные фрагменты (например, фрагменты, которые способны к димеризации и связыванию с Fc-рецептором). Fc-домен может относиться к любому изотипу антитела иммуноглобулина, в том числе IgG, IgE, IgM, IgA или IgD (например, IgG). Кроме того, Fc-домен может относиться к подтипу IgG (например, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4) (например, IgG1). Fc-домен не содержит какой-либо части иммуноглобулина, которая может играть роль антигенраспознающей области, например, вариабельный домен или определяющую комплементарность область (CDR). Fc-домены в конъюгатах, описанных в данном документе, могут содержать одно или несколько изменений относительно последовательности Fc-домена дикого типа (например, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 аминокислотные замены, добавления или делеции), которые изменяют взаимодействие между Fc-доменом и Fc-рецептором. Примеры подходящих изменений известны из уровня техники. Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в IgG или Fc-домене соответствует системе нумерации EU для антител, также называемой EU-индексом по Kabat, которая описана, например, у Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991

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 (Т) в последовательности нуклеиновой кислоты. Формула для расчета содержания тимидина представляет собой $T / (A+G+C+T) \times 100\%$.

Под термином "гетерологичный" подразумевается появление в контексте, отличном от контекста, встречающегося в природе (нативного). "Гетерологичная" полинуклеотидная последовательность указывает на то, что полинуклеотидная последовательность применяется образом, отличным от того, который существует в нативном для этой последовательности геноме. Например, "гетерологичный промотор" применяется для управления транскрипцией последовательности, которая не представляет собой последовательность, которая транскрибируется под управлением этого промотора в нативных условиях; таким образом, последовательность "гетерологичного промотора" часто включается в экспрессионную конструкцию посредством методик рекомбинантных нуклеиновых кислот. Термин "гетерологичный" также применяется для обозначения заданной последовательности, которая находится в не встречающемся в природе отношении к другой последовательности; например, гетерологичная кодирующая или не кодирующая нуклеотидная последовательность обычно вставлена в геном посредством методик трансформации генома, что приводит к получению генетически модифицированного или рекомбинантного генома.

Используемый в данном документе термин "фрагмент интрона" относится к части интрона, где первый фрагмент интрона и второй фрагмент интрона вместе образуют интрон, такой как каталитический интрон. Фрагмент интрона может представлять собой 5'-часть интрона (например, 5'-часть каталитического интрона) или 3'-часть интрона (например, 3'-часть каталитического интрона), так что 5'-фрагмент интрона и 3'-фрагмент интрона вместе образуют функциональный интрон, такой как функциональный интрон, способный к каталитическому самосплайсингу. Термин "фрагмент интрона" означает интрон, разделенный на две части. Термин "фрагмент интрона" не означает, не подразумевает или не предполагает, что две части или половины имеют одинаковую длину. Термин "фрагмент интрона" используется как синоним термина "сплит-интрон" и может использоваться вместо термина "полуинтрон".

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 "доставка в "голом" виде" представляет собой состав для доставки в клетку без помощи носителя и без ковалентной модификации компонента, которая 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.

Термин "фармацевтическая композиция" предназначен также для раскрытия того, что кольцевой или линейный полирибонуклеотид, содержащийся в фармацевтической композиции, может применяться для лечения организма человека или животного посредством терапии. Таким образом, подразумевается, что он эквивалентен термину "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 содержать 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. Подразумевается, представленный в используемой в данном документе полирибонуклеотидной последовательности тимин (Т) представляет собой урацил (U).

Используемый в данном документе термин "полирибонуклеотидный груз" в данном документе включает любую последовательность, включающую по меньшей мере один полирибонуклеотид. В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, где каждая экспрессионная последовательность кодирует полипептид. В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит одну или несколько некодирующих последовательностей, как, например, полирибонуклеотид, обладающий регуляторными или каталитическими функциями. В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит комбинацию экспрессирующихся и некодирующих последовательностей. В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит одну или несколько

полирибонуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе, таких как один или несколько регуляторных элементов, элементов, представляющих собой участок внутренней посадки рибосомы (IRES), или спейсерных последовательностей.

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, чтобы поли(А) не подвергалась трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(А) расположена в направлении 3' по отношению к терминирующему элементу и 3'-нетранслируемой области.

В контексте данного документа элементы нуклеиновой кислоты являются "функционально связанными" или "функционально соединенными", если они размещены в векторе так, чтобы они могли быть транскрибированы с образованием линейной РНК, которая затем может быть подвергнута циркуляризации с получением кольцевой РНК с применением способов, представленных в данном документе.

"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 обнаруживаемые 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), информационную РНК (мРНК), предшественник мРНК (пре-мРНК), антисмысловую РНК (asRNA) и охватывает как нуклеотидную последовательность, так и любые ее структурные варианты осуществления, такие как однонитевая, двухнитевая, трехнитевая, спиральная, шпилечная и т. д. 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. Варианты осуществления полинуклеотидов включают выделенные и очищенные молекулы ДНК/РНК, синтетические молекулы ДНК/РНК и синтетические аналоги ДНК/РНК.

Варианты осуществления полинуклеотидов, например, полирибонуклеотидов или полидезоксирибонуклеотидов, могут предусматривать один или несколько вариантов нуклеотидов, включая нестандартный(-е) нуклеотид(-ы), неприродный(-е) нуклеотид(-ы), аналог(-и) нуклеотида или модифицированные нуклеотиды. Примеры модифицированных нуклеотидов включают без ограничения диаминопурин, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 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, 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-карбоксипропил)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, фосфатная цепь, содержащая 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше фосфатных компонентов) и модификации с использованием тиоловых компонентов (например, альфа-тиотрифосфат и бета-тиотрифосфаты). В вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты модифицированы по компоненту, являющемуся основой (например, по одному или нескольким атомам, которые, как правило, доступны для образования водородной связи с комплементарным нуклеотидом, и по одному или нескольким атомам, которые, как правило, не способны образовывать водородную связь с комплементарным нуклеотидом), компоненту, являющемуся сахаром, или фосфатному

остову. В вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты содержат 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* 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 не природных), 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 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 (например, вирусной инфекции, например, вызываемой HIV, SARS-CoV-2, HCV, вирусом гриппа или RSV) или, в качестве альтернативы, снижение тяжести или частоты возникновения симптомов заболевания или нарушения, развивающегося впоследствии. Терапевтическое средство можно вводить субъекту, который подвержен повышенному риску развития вирусной инфекции 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 вирусной инфекции.

Используемый в данном документе термин "регуляторный элемент" означает

компонент, такой как последовательность нуклеиновой кислоты, который модифицирует экспрессию экспрессионной последовательности в кольцевом или линейном полирибонуклеотиде.

Используемый в данном документе "спейсер" относится к любой непрерывной нуклеотидной последовательности (например, из одного или нескольких нуклеотидов), которая обеспечивает наличие расстояния или эластичности между двумя смежными полинуклеотидными областями.

"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.

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

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к организму, такому как животное, растение или микроб. В вариантах осуществления субъект представляет собой позвоночное животное (например, млекопитающее, птицу, рыбу, рептилию или амфибию). В вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В вариантах осуществления субъект представляет собой отличное от человека

млекопитающее. В одних вариантах осуществления субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как отличный от человека примат (например, нечеловекообразные обезьяны, человекообразные обезьяны), копытное животное (например, крупный рогатый скот, буйвол, бизон, овца, коза, свинья, верблюд, лама, альпака, олень, лошади, ослы), хищное млекопитающее (например, собака, кошка), грызун (например, крыса, мышь) или зайцеобразное (например, кролик). В вариантах осуществления субъект представляет собой птицу, такую как представитель таких таксонов птиц, как Galliformes (например, куры, индейки, фазаны, перепела), Anseriformes (например, утки, гуси), Paleognathae (например, страусы, эму), Columbiformes (например, голуби, горлицы) или Psittaciformes (например, попугаи). В вариантах осуществления субъект представляет собой беспозвоночное, такое как членистоногое (например, насекомые, арахниды, ракообразные), нематода, аннелида, гельминт или моллюск. В вариантах осуществления субъект представляет собой сельскохозяйственного вредителя, относящегося к беспозвоночным, или беспозвоночное, которое является паразитическим для хозяина, представляющего собой беспозвоночное или позвоночное. В вариантах осуществления субъект представляет собой растение, такое как покрытосемянное растение (которое может быть двудольным или однодольным) или голосемянное растение (например, хвойное, саговник, гнетовидное, гинкго), папоротник, хвощ, плаун или бриофит. В вариантах осуществления субъект представляет собой эукариотическую водоросль (одноклеточную или многоклеточную). В вариантах осуществления субъект представляет собой растение сельскохозяйственного или садоводческого значения, такое как пропашные культуры, плодоносящие растения и деревья, овощные культуры, деревья и декоративные растения, включая декоративные цветочные растения, кустарники, деревья, почвопокровные растения и газонные травы.

В данном документе термин "антифузогенный полипептид" относится к полипептиду, такому как полипептид размером от 10 до 200 аминокислот, который подавляет события, ассоциированные со слиянием вируса, такие как проникновение вируса или слияние вируса. Антифузогенный полипептид включает, например, полипептид из таблицы 1. Антифузогенный полипептид включает полипептид, а также любые его биологически активные фрагменты (например, фрагмент размером по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 аминокислот). Антифузогенный полипептид включает, например, полипептид, который нацеливается на HIV, SARS-CoV-2, HCV или RSV. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид включает полипептид, характеризующийся по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-324. Антифузогенный полипептид также относится к полинуклеотиду (например, полирибонуклеотиду), например, кольцевому полирибонуклеотиду, кодирующему антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1) или его биологически активному фрагменту.

Используемые в данном документе термины "лечить" и "лечение" относятся к профилактическому или терапевтическому лечению вирусной инфекции, например, вызываемой HIV, SARS-CoV-2, HCV, вирусом гриппа или RSV, у субъекта. Эффект лечения может включать обращение вспять, облегчение, снижение тяжести, излечение, подавление прогрессирования, снижение вероятности рецидива заболевания или одного или нескольких симптомов или проявлений вирусной инфекции, стабилизацию (т. е. обеспечение отсутствия ухудшения) статуса вирусной инфекции или предупреждения распространения вирусной инфекции по сравнению со статусом или состоянием вирусной инфекции при отсутствии терапевтического лечения.

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

Используемый в данном документе термин "эффективность трансляции" означает скорость или величину выработки белка или пептида с рибонуклеотидного транскрипта. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансляции может быть выражена в виде количества вырабатываемого белка или пептида в расчете на заданное количество транскрипта, который кодирует белок или пептид, например, за заданный период времени, например, в заданной системе трансляции, например, бесклеточной системе трансляции, такой как лизат ретикулоцитов кролика.

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

Используемый в данном документе термин "вектор" означает часть ДНК, которая является синтезированной (например, с применением ПЦР) или которая получена из вируса, плазмиды или клетки высшего организма, в которую фрагмент чужеродной ДНК может быть или был вставлен с целью клонирования или экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор может стабильно сохраняться в организме. Вектор может содержать, например, точку начала репликации, селективируемый маркер или репортерный ген, такой как ген устойчивости к антибиотику или GFP, или сайт множественного клонирования (MCS). Термин включает фрагменты линейной ДНК (например, ПЦР-продукты, линейаризованные фрагменты плазмиды), плазмидные векторы, вирусные векторы, космиды, бактериальные искусственные хромосомы (BAC), искусственные хромосомы дрожжей (YAC) и т. п. В одном варианте осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат сайт множественного клонирования (MCS). В другом варианте осуществления векторы, представленные в данном документе, не содержат MCS.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлено схематическое изображение, демонстрирующее белковые

домены или области различных S-белков коронавируса и последовательности областей HR1 и HR2.

На фиг. 2 представлено схематическое изображение, демонстрирующее различные антифузогенные полипептиды и последовательности, полученные из области HR2 SARS CoV-2.

На фиг. 3 представлено схематическое изображение, демонстрирующее иллюстративные варианты осуществления конструкций антифузогенных полипептидов с несколькими ORF.

На фиг. 4А и 4В представлены графики, демонстрирующие подавляющую эффективность в отношении слияния с применением псевдовирuсов Омикрон и Дельта. **На фиг. 4А** продемонстрирован % подавления штаммов Дельта и Омикрон с применением либо полноразмерной HR2, либо полноразмерной HR2 с меткой HiBiT. **На фиг. 4В** продемонстрирована относительная экспрессия антифузогенного полипептида по сравнению с холостым контролем.

На фиг. 5 представлен график, демонстрирующий экспрессию *in vivo* полноразмерных антифузогенных полипептидов HR2 с меткой HiBiT и без нее через 6 часов и 24 часа.

На фиг. 6А и 6В представлены графики, демонстрирующие нейтрализацию *in vitro* псевдовирuса штаммов Wuhan и Омикрон SARS CoV-2 с помощью полипептида HR2A. **На фиг. 6А** продемонстрирована нейтрализация штамма Wuhan SARS CoV-2 с помощью HR2A. **На фиг. 6В** продемонстрирована нейтрализация штамма Омикрон SARS CoV-2 с помощью HR2A.

На фиг. 7А и 7В представлены графики, демонстрирующие степень подавления (%) штаммов псевдовирuса Омикрон BA4 и BA.5 SARS CoV-2 (**фиг. 7А**) или псевдовирuса SARS CoV-1 (**фиг. 7В**).

На фиг. 8А-8D представлены графики, демонстрирующие степень подавления (%) псевдовирuса SARS CoV-2 с помощью полноразмерной HR2 (HR2Complete). **На фиг. 8А** продемонстрировано подавление штамма Wuhan. **На фиг. 8В** продемонстрировано подавление штамма Омикрон BA.4 и BA.5. **На фиг. 8С** продемонстрировано подавление штамма Омикрон BA.1. **На фиг. 8D** продемонстрировано подавление псевдовирuса SARS CoV-1.

На фиг. 9 представлено схематическое изображение, на котором продемонстрированы схемы и последовательности конструкций различных антифузогенных полипептидов HIV.

На фиг. 10А и 10В представлены графики (**фиг. 10А**) и таблица (**фиг. 10В**), на которых продемонстрирована экспрессия различных антифузогенных полипептидов HIV с кольцевой РНК.

На фиг. 11А и 11В представлены графики, на которых продемонстрирована экспрессия различных антифузогенных полипептидов HIV с кольцевой РНК (**фиг. 11А**) или плазмидной ДНК (**фиг. 11В**).

На фиг. 12 представлена таблица, в которой продемонстрирована экспрессия различных антифузогенных полипептидов HIV с кольцевой РНК.

Подробное описание

В настоящем изобретении описаны композиции, содержащие кольцевой полирибонуклеотид (кольцевую РНК), кодирующий антифузогенный полипептид, и способы его применения. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, являются в частности применимыми для доставки полинуклеотидного груза, кодирующего антифузогенный полипептид, в клетку-мишень.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать полирибонуклеотидный груз, кодирующий полипептид из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с полипептидом из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-324.

Кольцевой полирибонуклеотид может быть получен из предшественника, такого как линейный дезоксирибонуклеотид, кольцевой дезоксирибонуклеотид или кольцевой полирибонуклеотид.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать, например, границу сплайсинга, соединяющую 5'-фрагмент экзона и 3'-фрагмент экзона.

Описанные в данном документе линейные молекулы РНК представляют собой полирибонуклеотид, кодирующий антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления линейные молекулы РНК содержат от 5' к 3': (A) 3'-фрагмент каталитического интрона; (B) 3'-сайт сплайсинга; (C) 3'-фрагмент экзона; (D) полирибонуклеотидный груз, кодирующий антифузогенный полипептид (например, полирибонуклеотидный груз, кодирующий IRES, функционально связанный с экспрессионной последовательностью, кодирующей антифузогенный полипептид); (E) 5'-фрагмент экзона; (F) 5'-сайт сплайсинга и (G) 5'-фрагмент каталитического интрона. Фрагменты каталитического интрона и сайты сплайсинга могут затем обеспечивать самосплайсинг линейного полирибонуклеотида с образованием таким образом кольцевого полирибонуклеотида, кодирующего антифузогенный полипептид.

Также описаны способы применения кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Например, кольцевой полирибонуклеотид может быть составлен в виде композиции (например, фармацевтической композиции) для введения субъекту, например, субъекту-человеку. Фармацевтическую композицию можно вводить в виде одной или нескольких доз композиции. Композицию можно вводить субъекту для лечения или предупреждения вирусной инфекции (например, вызываемой HIV, SARS-CoV-2,

HCV, вирусом гриппа или RSV).

Полинуклеотиды

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе кольцевого полирибонуклеотида, кодирующего антифузогенный полипептид, варианты его применения и способы получения кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид получают из линейного полирибонуклеотида (например, посредством осуществления самосплайсинга совместимых концов линейного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид транскрибируется с дезоксирибонуклеотидной матрицы (например, вектора, линеаризованного вектора или cDNA). Соответственно, в настоящем изобретении описаны дезоксирибонуклеотиды, линейные полирибонуклеотиды и кольцевые полирибонуклеотиды и композиции на их основе, применимые в получении кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих антифузогенный полипептид.

Матричные дезоксирибонуклеотиды

В настоящем изобретении описаны матричные дезоксирибонуклеотиды для получения кольцевой РНК, описанной в данном документе. В варианте осуществления дезоксирибонуклеотид содержит следующие функционально связанные в ориентации от 5' к 3' элементы: (A) 3'-фрагмент каталитического интрона; (B) 3'-сайт сплайсинга; (C) 3'-фрагмент экзона; (D) полирибонуклеотидный груз, кодирующий антифузогенный полипептид; (E) 5'-фрагмент экзона; (F) 5'-сайт сплайсинга и (G) 5'-фрагмент каталитического интрона. В вариантах осуществления дезоксирибонуклеотид содержит дополнительные элементы, например, за пределами любого из элементов (A), (B), (C), (D), (E), (F) или (G) или между ними. В вариантах осуществления любой из элементов (A), (B), (C), (D), (E), (F) или (G) отделен друг от друга с помощью спейсерной последовательности, описанной в данном документе.

В вариантах осуществления дезоксирибонуклеотид представляет собой, например, кольцевой ДНК-вектор, линеаризованный ДНК-вектор или линейную ДНК (например, cDNA, например, полученную из ДНК-вектора).

В некоторых вариантах осуществления дезоксирибонуклеотид дополнительно содержит промотор РНК-полимеразы, функционально связанный с последовательностью, кодирующей линейную РНК, описанную в данном документе. В вариантах осуществления промотор РНК-полимеразы является гетерологичным по отношению к последовательности, кодирующей линейную РНК. В некоторых вариантах осуществления промотор РНК-полимеразы представляет собой промотор Т7, промотор Т6, промотор Т4, промотор Т3, промотор вируса SP6 или промотор SP3.

В некоторых вариантах осуществления дезоксирибонуклеотид содержит сайт множественного клонирования (MCS).

В некоторых вариантах осуществления дезоксирибонуклеотид применяется для получения кольцевой РНК с размером в диапазоне от приблизительно 100 до

приблизительно 20000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления размер кольцевой РНК составляет по меньшей мере 100, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500 или 5.000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления размер кольцевой РНК составляет не более 20000, 15000 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000 или 4000 нуклеотидов.

Линейные полирибонуклеотиды

В настоящем изобретении также описаны линейные полирибонуклеотиды, кодирующие антифузогенный полипептид. Линейный полирибонуклеотид можно применять для создания кольцевого полирибонуклеотида, например, путем лигирования или сплайсинга (например, самосплайсинга) линейного полирибонуклеотида с получением кольцевого полирибонуклеотида. В варианте осуществления линейный полирибонуклеотид содержит следующие функционально связанные в ориентации от 5' к 3' элементы: (A) 3'-фрагмент каталитического интрона; (B) 3'-сайт сплайсинга; (C) 3'-фрагмент экзона; (D) полирибонуклеотидный груз, кодирующий антифузогенный полипептид; (E) 5'-фрагмент экзона; (F) 5'-сайт сплайсинга и (G) 5'-фрагмент каталитического интрона. В вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит дополнительные элементы, например, за пределами любого из элементов (A), (B), (C), (D), (E), (F) или (G) или между ними. Например, любой из элементов (A), (B), (C), (D), (E), (F) или (G) может быть отделен спейсерной последовательностью, описанной в данном документе.

В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ получения линейной РНК, кодирующей антифузогенный полипептид, путем осуществления транскрипции в бесклеточной системе (например, транскрипции *in vitro*) с применением дезоксирибонуклеотида (например, вектора, линейаризованного вектора или cDNA), кодирующего антифузогенный полипептид, представленного в данном документе, в качестве матрицы (например, вектора, линейаризованного вектора или cDNA, представленных в данном документе, с промотором РНК-полимеразы, размещенным выше области, которая кодирует линейную РНК).

В вариантах осуществления дезоксирибонуклеотидная матрица транскрибируется с получением линейной РНК, содержащей компоненты, описанные в данном документе. При экспрессии линейный полирибонуклеотид обеспечивает получение сплайсинг-совместимого полирибонуклеотида, который может быть подвергнут самосплайсингу с целью получения кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления длина линейного полирибонуклеотида составляет от 50 до 20000, от 100 до 20000, от 200 до 20000, от 300 до 20000 (например, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000, или 20.000) рибонуклеотидов. В вариантах осуществления длина линейного полирибонуклеотида

составляет, например, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 2000, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 4000 или по меньшей мере 5000 рибонуклеотидов.

Кольцевые полирибонуклеотиды

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретение предусмотрен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий экспрессионную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид. В вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит IRES, функционально связанный с экспрессионной последовательностью, кодирующей антифузогенный полипептид. Кольцевой полирибонуклеотид может содержать границу сплайсинга, например, соединяющую 5'-фрагмент экзона и 3'-фрагмент экзона. Кольцевой полирибонуклеотид может содержать любой один или несколько элементов, описанных в данном документе. 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 вариантах осуществления кольцевой полинуклеотид дополнительно содержит полирибонуклеотидный груз. В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную (или кодирующую) последовательность, некодирующую последовательность или комбинацию экспрессионной (кодирующей) последовательности и некодирующей последовательности. В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную (кодирующую) последовательность, кодирующую полипептид. В вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит IRES, функционально связанный с экспрессионной последовательностью, кодирующей полипептид. В некоторых вариантах осуществления IRES расположен выше экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления IRES расположен ниже экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит спейсерную область между IRES и 3'-фрагментом экзона или 5'-фрагментом экзона. Длина спейсерной области может составлять, например, по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20) рибонуклеотидов. Длина 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. В некоторых вариантах осуществления спейсерная область содержит последовательность поли(A). В некоторых вариантах осуществления спейсерная область содержит последовательность поли(A-C). В некоторых вариантах осуществления спейсерная область содержит последовательность поли(A-G). В некоторых вариантах осуществления спейсерная область содержит последовательность поли(A-T). В некоторых вариантах осуществления спейсерная область содержит случайную последовательность. В некоторых вариантах осуществления первая область отжига и вторая область отжига

соединяются, образуя таким образом кольцевую полирибонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления кольцевую РНК получают с помощью дезоксирибонуклеотидной матрицы или линейной РНК, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кольцевую РНК получают посредством любого из способов, описанных в данном документе.

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.

В результате циркуляризации кольцевой полирибонуклеотид может обладать определенными характеристиками, которые отличают его от линейной РНК. Например, кольцевой полирибонуклеотид является менее восприимчивым к разрушению под действием экзонуклеазы по сравнению с линейной РНК. Таким образом, кольцевой полирибонуклеотид является более стабильным, чем линейная РНК, в частности при инкубировании в присутствии экзонуклеазы. Увеличенная стабильность кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с линейной РНК делает кольцевой полирибонуклеотид в большей степени применимым в качестве реагента для трансформации клеток для получения полипептидов, и он характеризуется возможностью более простого и длительного хранения, чем линейная РНК. Стабильность кольцевого полирибонуклеотида, обработанного экзонуклеазой, может быть протестирована с

применением способов, стандартных в данной области техники, посредством которых определяют, произошло ли разрушение РНК (например, посредством гель-электрофореза). Более того, в отличие от линейной РНК, кольцевой полирибонуклеотид является менее восприимчивым к дефосфорилированию при инкубировании кольцевого полирибонуклеотида с фосфатазой, такой как кишечная фосфатаза теленка.

Описанные в данном документе кольцевые полирибонуклеотиды и композиции или фармацевтические композиции на их основе можно применять в терапевтических и ветеринарных способах введения доз для получения некоторого уровня кольцевого полирибонуклеотида, уровня связывания с мишенью или уровня белка во множестве клеток после обеспечения множества по меньшей мере двумя дозами кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является неиммуногенным в организме млекопитающего, например, человека. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид способен реплицироваться или реплицируется в клетке животного из аквакультуры (рыбы, крабов, креветок, устриц и т. д.), клетке млекопитающего, например, клетке домашнего питомца или зоопаркового животного (кошек, собак, ящериц, птиц, львов, тигров и медведей и т. д.), клетке фермерского или рабочего животного (лошадей, коров, свиней, кур и т. д.), клетке человека, культивируемых клетках, первичных клетках или линиях клеток, стволовых клетках, клетках-предшественниках, дифференцированных клетках, половых клетках, раковых клетках (например, онкогенных, метастатических), неонкогенных клетках (нормальных клетках), фетальных клетках, эмбриональных клетках, зрелых клетках, митотических клетках, немитотических клетках или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, которая содержит кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, где клетка представляет собой клетку животного из аквакультуры (рыбы, крабов, креветок, устриц и т. д.), клетку млекопитающего, например, клетку домашнего питомца или зоопаркового животного (кошек, собак, ящериц, птиц, львов, тигров и медведей и т. д.), клетку фермерского или рабочего животного (лошадей, коров, свиней, кур и т. д.), клетку человека, культивируемую клетку, первичную клетку или линию клеток, стволовую клетку, клетку-предшественника, дифференцированную клетку, половую клетку, раковую клетку (например, онкогенную, метастатическую), неонкогенную клетку (нормальные клетки), фетальную клетку, эмбриональную клетку, зрелую клетку, митотическую клетку, немитотическую клетку или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления клетка модифицирована таким образом, что она содержит кольцевой полирибонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательности для продуктов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт связывания для связывания с мишенью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид вводят во множество клеток посредством любого режима введения доз, описанного в данном документе. В

некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, индуцирует ответ или уровень ответа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления продукты экспрессии, кодируемые последовательностями, включенными в кольцевой полирибонуклеотид, экспрессируются в одной или нескольких клетках множества клеток.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни, по меньшей мере равным периоду полужизни его линейного эквивалента, например, линейной экспрессионной последовательности или линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется увеличенным периодом полужизни по сравнению с его линейным эквивалентом. В некоторых вариантах осуществления период полужизни увеличен на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или больше. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни или персистенции в клетке, составляющим по меньшей мере приблизительно 1 час, например, по меньшей мере 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часа, 6 часа, 12 часов, 24 часов, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев или дольше. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни или персистенцией в клетке, составляющим от приблизительно 1 часа до приблизительно 60 дней, например, приблизительно 1 час, 2 часа, 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, 35 дней, 40 дней, 45 дней, 50 дней, 55 дней или 60 дней. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни или персистенции в клетке во время деления клетки. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни или персистенции в клетке после деления. В определенных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни или персистенции в делящейся клетке, составляющим по меньшей мере приблизительно 10 минут, например, по меньшей мере приблизительно 1 час, например, по меньшей мере 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев или дольше. В определенных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни или персистенции в делящейся клетке, составляющим от приблизительно 10 минут до приблизительно 60 дней, например, приблизительно 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 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, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 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 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней,

30 дней или 60 дней.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид модулирует клеточную функцию, например, временно или длительно. В определенных вариантах осуществления клеточная функция является стабильно измененной, как, например, в результате модулирования, которая сохраняется в течение по меньшей мере приблизительно 10 минут, например, по меньшей мере приблизительно 1 часа, например, по меньшей мере 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев или дольше. В определенных вариантах осуществления клеточная функция является стабильно измененной, как, например, в результате модулирования, которая сохраняется в течение периода от приблизительно 1 часа до приблизительно 60 дней, например, от приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней, например, 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 или 60 дней.

Элементы полинуклеотидов

Полинуклеотиды (например, кольцевые полирибонуклеотиды), описанные в данном документе, могут содержать любой один или несколько элементов, описанных в данном документе, и экспрессионную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид.

Антифузогенные полипептиды

В настоящем изобретении предусмотрены кольцевые полирибонуклеотиды, которые кодируют по меньшей мере одну экспрессионную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид подавляет проникновение вируса. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид подавляет слияние вируса.

В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид представляет собой полипептид или его вариант, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид представляет собой полипептид, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 аминокислот из последовательности в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид представляет собой полипептид, содержащий непрерывный отрезок из по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% аминокислот из последовательности в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид представляет собой полипептид, содержащий последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с последовательностью из таблицы 1. В некоторых вариантах

осуществления антифузогенный полипептид представляет собой вариант последовательности в таблице 1, который содержит не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти мутаций (например, замен, делеций или вставок). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит экспрессионную последовательность, кодирующую более одного антифузогенного полипептида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий более одного слитого белка, снижает вероятность уклонения вируса.

В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид нацелен на один или несколько (например, два, три, четыре или пять) вирусов. Вирусы, на которые может быть нацелен антифузогенный полипептид, включают без ограничения все штаммы вирусов, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления вирус не инфицирует людей. В некоторых вариантах осуществления вирус инфицирует людей.

Таблица 1. Иллюстративные антифузогенные полипептиды

Источник	Пептид	Мишень	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Золотая вешенка, <i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Противовирусный белок Y3	Вирус табачной мозаики (TMV), гемагглютинин гриппа (HA), псевдовирионы вируса иммунодефицита человека (HIV)	AACARFIDDFCDTL TPNIYRPRDNGQRC YAVNGHRCDFTVF NTNNGGNPIRASTP NCKTVLRTAANRCP TGGRGKINPNAPFLF AIDPNDGDCSTNF	1
Прудовая лягушка Дарума, <i>Rana brevipoda porsa</i>	Бревинин-1	Вирус простого герпеса-1 (HSV-1), вирус простого герпеса-2 (HSV-2)	FLPVLAGIAAKVVP ALFCKITKKC	2
Европейская обыкновенная лягушка, <i>Rana temporaria</i>	Темпорин В	CCV, FV3	LLPIVGNLLKSLL	3
Европейская обыкновенная лягушка, <i>Rana</i>	Темпорин G	Вирус гриппа А (IAV), респираторные	FFPVIGRILNGIL	4

<i>temporaria</i>		вирусы парагриппа (PIV)		
Североамериканская лягушка, <i>Rana pipiens</i> , и орегонская пятнистая лягушка, <i>Rana pretiosa</i>	Ранатейрин ЗР	HIV	GLMDTVKNVAKNL AGHMLDKLKCKITG C	5
Человек, <i>Homo sapiens</i>	Нейтрофильный пептид-1 человека (HNP-1)	Псевдотипированные вирусы, экспрессирующие шиповидные белки SARS-CoV-2	ACYCRIPACIAGERR YGTCIYQGRLWAFCC C	6
Человек, <i>Homo sapiens</i>	HNP-2	Псевдотипированные вирусы, экспрессирующие шиповидные белки SARS-CoV-2	CYCRIPACIAGERRY GTCIYQGRLWAFCC	7
Человек, <i>Homo sapiens</i>	HNP-3	Псевдотипированные вирусы, экспрессирующие шиповидные белки SARS-CoV-2	DCYCRIPACIAGERR YGTCIYQGRLWAFCC C	8
Человек, <i>Homo sapiens</i>	HNP-4	Псевдотипированные вирусы, экспрессирующие шиповидные белки SARS-CoV-2	VCSCRLVFCRRETEL RVGNCLIGGVSFTY CCTRV	9
Человек,	Дефензин	Вирус ВК (BKV)	ATCYCRTGRCATRE	10

<i>Homo sapiens</i>	человека (HD-5)		SLSGVCEISGRLYRL CCR	
Человек, <i>Homo sapiens</i>	HD-6	Респираторно- синцитиальный вирус (RSV), PIV человека (HPIV), HIV, HSV, вирус гриппа А (IAV), BKV, аденовирусы человека (HAdV), папилломавирус человека (HPV)	AFTCHCRRSCYSTE YSYGTCTVMGINHR FCCL	11
Кролик, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	Нейтрофильный пептид 1 кролика (NP-1)	HSV, вирусы с оболочкой	VVCACRRALCLPRE RRAGFCRIRGRIHPL CCRR	12
Кролик, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	Нейтрофильный дефензин 2 кролика (NP-2)	RSV, HIV, HSV	VVCACRRALCLPLE RRAGFCRIRGRIHPL CCRR	13
Нейтрофил свиньи, <i>Sus scrofa</i>	Протегрин 1 (PG- 1)	HIV, HSV-1, HSV- 2, вирус репродуктивно- респираторного синдрома свиней (PRRSV)	RGGRLCYCRRRFCV CVGR	14
Атлантически й мечехвост, <i>Limulus polyphemus</i>	Полифемузин I	HIV	RRWCFRVCYRGFC YRKCR	15
Атлантически й мечехвост, <i>Limulus polyphemus</i>	Полифемузин II	HIV	RRWCFRVCYKGFC YRKCR	16
Гемоциты из	Тахиплезин I	HIV, HSV-1, HSV-	KWCFRVCYRGICYR	17

Юго-Восточной Азии, <i>Tachypleus tridentatus</i> , <i>Tachypleus gigas</i> , <i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>	(TP1)	2, иридовирус сингапурского группера (SGIV)	RCR	
Кролик, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	Нейтрофильный дефензин 3а кролика (NP-3а)	RSK, HIV, HSV	GICACRRRFCPNSER FSGYCRVNGARYV RCCSRR	18
Нейтрофил свиньи, <i>Sus scrofa</i>	PG-2	Вирус псевдобешенства (PRV), PRRSV	RGGRLCYCRRRFCI CV	19
Нейтрофил свиньи, <i>Sus scrofa</i>	PG-3	PRRSV	RGGGLCYCRRRFCV CVGR	20
Нейтрофил свиньи, <i>Sus scrofa</i>	PG-4	PRRSV	RGGRLCYCRGWICF CVGR	21
Крыса, <i>Rattus novgicus</i>	NP-1 крысы, дефензин крысы	HIV, HSV	VTCYCRRTRCGFRE RLSGACGYRGRIYR LCCR	22
Крыса, <i>Rattus novgicus</i>	NP-2 крысы	HIV, HSV	VTCYCRSTRCGFRE RLSGACGYRGRIYR LCCR	23
Крыса, <i>Rattus novgicus</i>	NP-3 крысы	HIV, HSV	CSCRTSSCRFGERLS GACRLNGRIYRLCC	24
Крыса, <i>Rattus novgicus</i>	NP-4 крысы	HIV, HSV	ACYCRIGACVSGER LTGACGLNGRIYRL CCR	25
Австралийска	Каэрин 1.1	HIV, вирус	GLLSVLGSAKHVL	26

я древесная лягушка, <i>Litoria splendida</i> , <i>Litoria rothii</i>		лейкоза мышей	PHVVPVIAEHL	
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>	Каэрин 1.2	HIV	GLLGVLGSAKHVL PHVVPVIAEHL	27
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>	Каэрин 1.3	HIV	GLLSVLGSAQHVL PHVVPVIAEHL	28
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>	Каэрин 1.4	HIV	GLLSSLSSVAKHVL PHVVPVIAEHL	29
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>	Каэрин 1.5	HIV	GLLSVLGSVVKHVI PHVVPVIAEHL	30
Австралийская оранжевобедрая лягушка, <i>Litoria xanthomera</i>	Каэрин 1.6	HIV	GLFSVLGAVAKHVL PHVVPVIAEK	31
Австралийская оранжевобедрая лягушка, <i>Litoria xanthomera</i>	Каэрин 1.7	HIV	GLFKVLGSAKHLL PHVAPVIAEK	32
Австралийская	Каэрин 1.9	HIV	GLFGVLGSIAKHVL	33

я древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>			PHVVPVIAEKL-NH2	
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>	Каэрин 1.10	HIV	GLLSVLGSAKHVL PHVVOVIAEKL-NH ₂	34
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>	Каэрин 1.19	HIV	GLFKVLGSAKHLL PHVAPIAEKL-NH ₂	35
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>	Каэрин 1.20	HIV	GLFGILGSAKHVL PHVIPVVAEHL-NH2	36
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria caerulea</i>	Каэрин 4.1	HIV	GLWQKIKSAAGDL ASGIVEGIKS	37
Мышь, <i>Mus musculus</i>	Бета-дефензин 1 мышцы (mBD-1)	HIV, IAV	DQYKCLQHGGFCL RSSCPSNTKLQGTC KPDKPNCKKS	38
Мышь, <i>Mus musculus</i>	Кателин- подобный антимикробный пептид мышцы (mCRAMP)	RSV	GLLRKGGEKIGEKL KKIGQKIKNFFQKL VPQPEQ	39
Человек, <i>Homo sapiens</i>	Бета-дефензин 3 человека (mBD-3)	HIV	GIINTLQKYYCRVR GGRCVLSCLPKEE QIGKCSTRGRKCCR RKK	40
Южная коричневая древесная	Эвингиин 2.1 (ранее называвшийся	HIV	GLLDMVTGLLGNL- NH2	41

лягушка, <i>Litoria ewingii</i>	каэридин 7.1)			
Австралийская древесная лягушка, <i>Litoria genimaculata</i>	Макулатин 1.1	HIV, PRV	GLFGVLAKVAAHV VPAIAEHF-NH2	42
Гибридный полосатый окунь, <i>Morone saxatilis</i> , <i>Morone chrysops</i>	Писцидин 1Н (Pis-1Н)	HIV	FFHHIFRGIVHVGKT IHRLVTG	43
Гибридный полосатый окунь, <i>Morone saxatilis</i> , <i>Morone chrysops</i>	Писцидин 1Н (Pis-1Н)	HIV	FFHHIFRGIVHVGKT IHRLVTG	44
Гибридный полосатый окунь, <i>Morone saxatilis</i> , <i>Morone chrysops</i>	Писцидин 2 (Pis- 2)	HIV	FFHHIFRGIVHVGKT IHKLVTG	45
Гибридный полосатый окунь, <i>Morone saxatilis</i> , <i>Morone chrysops</i>	Писцидин 3 (Pis- 3)	HIV	FIHHIFRGIVHAGRSI GRFLTG	46
Голубая мидия, <i>Mytilus edulis</i>	Митилин В	Вирус вирусной геморрагической септицемии (VHSV) VHSV,	SCASRCCKGHCRARR CGYYVSVLYRGRC YCKCLRC	47

		IPNV		
Средиземноморская мидия, <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Митилин С	VHSV, IPNV	SCASRCKSRCRARR CRYYSVRYGWFC YCRCLRC	48
Южноафриканский термит, <i>Pseudocanthotermes spiniger</i>	Спинигерин	HIV	HVDKKVADKVL KQLRIMRLRL	49
Североамериканская лягушка, <i>Rana catesbeiana</i>	Ранатерин 6	HIV	FISAIASMLGKFL	50
Североамериканская лягушка, <i>Rana catesbeiana</i>	Ранатерин 9	HIV	FLFPKITSFLSKVL	51
Макак-резус, <i>Macaca mulatta</i>	Тета-дефензин 1 макака-резуса (RTD-1)	HIV	GFCRCLCRRGVCRC ICTR	52
Человек, <i>Homo sapiens</i>	Бета-дефензин 1 человека (mBD-1)	HIV, HSV	DHYNCVSSGGQCL YSACPIFTKIQT RGKAKCK	53
Человек, <i>Homo sapiens</i>	hBD-2	HIV, HSV	GIGDPVTCLKSGAIC HPVFCPRRYKQIGT CGLPGTKCKKP	54
Штамм АА3891 <i>Streptomyces</i>	Сиамидин II	HIV	CLGIGSCNDFAGCG YAIVCFW	55
Североамериканская норковая лягушка, <i>Rana</i>	Пептид, родственник бревинину-2	HIV	GIWDTIKSMGKVFA GKILQNL	56

<i>septentrionalis</i>				
Морская свинка, <i>Cavia porcellus</i>	CAP11	IAV	GLRKKFRKTRKRIQ KLGRKIGKTGRKV WKAWREYGQIPYP CRI	57
Макак-резус, <i>Macaca mulatta</i>	RTD-2	HIV	GVCRCCLCRRGVCRC LCRR	58
Макак-резус, <i>Macaca mulatta</i>	RTD-3	HIV	GFCRCICTRGFCRCI CTR	59
Африканская когтистая лягушка, <i>Xenopus laevis</i>	Магайнин 1	HSV-1, HSV-2	GIGKFLHSAGKFGK AFVGEIMKS	60
Африканское травянистое растение, <i>Oldenlandia affinis</i>	Калата B1 (KB1)	HIV	GLPVCGETCVGGTC NTPGCTCSWPVCTR N	61
Курица, <i>Gallus gallus domestic</i> , утка, <i>Anas platyrhynchos</i>	Птичий бета-дефензин 6 курицы (AvBD-6)	IAV	SPIHACRYQRGVCIP GPCRWPYYRVGSC GSLKSCCVRNRW A	62
Курица, <i>Gallus gallus domestic</i>	AvBD-5	IAV	GLPQDCERRGGFCS HKSCPPGIGRIGLCS KEDFCCRSRWYS	63
Китайская краснобрюхая жаба, <i>Bombina orientalis</i>	Максимин H1	Вирус (NiV)	Нипах ILGPVISTIGGVLGG LLKNL	64
Сахарская лягушка,	Темпорин-Sha	HSV	FLSGIVGMLGKLF	65

<i>Pelophylax saharicus</i>				
<i>Leonia cytnosa</i>	Цикловиолин А	HIV	GVIPCGESCVFIPCIS AAIGCSCKNKVCYR N	66
<i>Leonia cytnosa</i>	Цикловиолин В	HIV	GTACGESCYVLP CF TVGCTCTSSQCFKN	67
<i>Leonia cytnosa</i>	Цикловиолин С	HIV	GIPCGESCVFIPCLTT VAGCSCKNKVCYR N	68
<i>Leonia cytnosa</i>	Цикловиолин D	HIV	GFPCGESCVFIPCISA AIGCSCKNKVCYRN	69
Европейская полевая фиалка, <i>Viola arvensis</i>	Пептид Varv E (Varv E)	HIV	GLPICGETCVGGTC NTPGCSCSWPVCTR N	70
Африканское травянистое растение, <i>Oldenlandia affinis</i>	KB8	HIV	GSVLNCGETCLLGT CYTTGCTCNKYRVC TKD	71
<i>Palicourea condensata</i>	Паликоуреин	HIV	GDPTFCGETCRVIPV CTYSAALGCTCDDR SDGLCKRN	72
Фиалка стрелкообразная, <i>Viola betonicifolia</i>	KB2	HIV	GLPVCGETCFGGTC NTPGCCTWPICTR D	73
Австралийская фиалка, <i>Viola hederacea</i>	Vhl-1	HIV	SISCGESCAMISFCF TEVIGCSCKNKVCY LN	74
Тропическое дерево,	Циркулин С	HIV	GIPCGESCVFIPCITS VAGCSCSKVCYR	75

<i>Chassalia parvifolia</i>			N	
Тропическое дерево, <i>Chassalia parvifolia</i>	Циркулин D	HIV	KIPCGESCVWIPCVT SIFNCKCKENKVCY HD	76
Тропическое дерево, <i>Chassalia parvifolia</i>	Циркулин E	HIV	KIPCGESCVWIPCLT SVFNCKCENKVCYH D	77
Тропическое дерево, <i>Chassalia parvifolia</i>	Циркулин F	HIV	KVCYRAIPCGESCV WIPCISAAIGCCKN	78
Тилапия, <i>Oreochromis mossambicus</i>	Гепцидин 1-5 (ТН1-5)	Вирус нервного некроза (NNV)	GIKCRFCCGCCTPGI CGVCCRF	79
Фиалка душистая, <i>Viola odorata</i>	Цикловиолацин O13	HIV	GIPCGESCVWIPCIS AAIGCCKSKVCYR N	80
Фиалка душистая, <i>Viola odorata</i>	Цикловиолацин O14	HIV	GSIPACGESCFKGGK YTPGCSCSKYPLCA KN	81
Фиалка душистая, <i>Viola odorata</i>	Цикловиолацин O24	HIV	GLPTCGETCFGGTC NTPGCTCDPWPVCT HN	82
Китайское травянистое растение, <i>Viola yedoensis</i>	Цикловиолацин Y1	HIV	GGTIFDCGETCFLGT CYTPGCSCGNYGFC YGTN	83
Китайское травянистое растение,	Цикловиолацин Y4	HIV	GVPCGESCVFIPCIT GVIGCSCSSNVCYL N	84

<i>Viola yedoensis</i>				
Китайское травянистое растение, <i>Viola yedoensis</i>	Цикловиолацин Y5	HIV	GIPCAESCVPCTV TALVGCSCSDKVCY N	85
Китайское травянистое растение, <i>Viola yedoensis</i>	Цикловиолацин VY1	IAV	CGESCVFIPCITTVL GCSCSIKVCYKNGSI P	86
Штамм AA6532 <i>Streptomyces</i>	Сиамицин I	HIV	CLGVGSCNDFAGCG YAVVCFW	87
Штамм AA6532 <i>Streptomyces</i>	NP-06	HIV	CLGVGSCNDFAGCG YAIVCFW	88
Человек, <i>Homo sapiens</i>	Ретроцилин-1 (RC1)	HIV	GICRCICGRGICRCIC GR	89
Человек, <i>Homo sapiens</i>	RC2	HIV	GICRCICGRRICRCIC GR	90
Человек, <i>Homo sapiens</i>	RC3	HIV	RICRCICGRRICRCIC GR	91
Головастая морская черепаха, <i>Caretta caretta</i>	Белок белка яйца черепахи (TEWP)	Вирус Чандипура, рабдовирус	QKKCPGRCTLKCGK HERPTLPYNCGKYI CCVPVKVK	92
Средиземноморская мидия, <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Митицин С (Myc C)	VHSV	QEAQSVACTSYYS KFCGSAGCSLYGCY LLHPGKICYCLHCS R	93
Длинноногая	Френатин 2	Вирус желтой	GLLGTLGNLLNGLG	94

квакша, <i>Litoria infrafrenata</i>		лихорадки (YFV)	L	
Кокос, <i>Cocos nucifera</i>	Кокосовый противогрибковы й пептид	HIV	EQCREEEDDR	95
Человек, <i>Homo sapiens</i>	Ингибитор секреторной лейкоцитарной протеазы (SLPI)	HIV	SGKSFKAGVCPPKK SAQCLRYKKPECQS DWQCPGKKRCCPD TCGIKCLDPVDTPNP TRRKPGKCPVTYGG CLMLNPP	96
Цианобактери я, <i>Scytonema varium</i>	Противовирусный лектин сцитовирин (SVN)	HIV-1	GSGPTYCWNEANN PGGPNRCSNNKQCD GARTCSSSGFCQGT SRKPDPGPKGPTYC WDEAKNPGGPNRC SNSKQCD	97
Цианобактери я, <i>Nostoc ellipsosporum</i>	Циановирин-N (CVN)	HIV-1	LGKFSQTCYNIAIQ GSVLTSTCERTNGG YNTSSIDLNSVIENV DGSLKWQPSNFIET CRNTQLAGSSELAA ECKTRAQQF	98
Цианобактери я, <i>Microcystis viridis</i>	Лектин Microcystis viridis (MVL)	HIV-1	MASYKVNIPAGPLW SNAEAQQVGPKIAA AHQGNFTGQWTTV VESAMSVVEVELQV ENTGIHEFKTDVLA GPLWSND	99
Красные водоросли, <i>Griffithsia sp</i>	Гриффитсин (GRFT)	HIV-1	SLTHRKFSGSGGSP FSGLSSIAVRSGSYL DAIIDGVHHGGSGG NLSPTFTFGSGEYIS NMTIRSGDYIDNISF	100

			ETNMGRR	
Азиатский обыкновенный грязевой краб, <i>Scylla paramamosain</i>	Изоформа 1 антилиполисах аридного фактора <i>Scylla paramamosain</i> (Sp- ALF1)	Вирус синдрома белых пятен (WSSV)	YETLIASVLGKLTGL WHNNSVDFMGHTC HFRRRPKVRKFKLY HEGKFWCPGWAPF EGRSRTKSRSGSSRE AIKDFVRK	101
Азиатский обыкновенный грязевой краб, <i>Scylla paramamosain</i>	Sp-ALF2	WSSV	YEALVASILGKLSG LWHSDTVDFMGHT CHIRRRPKFRKFKL YHEGKFWCPGWTH LEGNSRTKSRSGSA RDAIKDFVYKA	102
Пекинская утка, <i>Anas platyrhynchos</i>	Apl-AvBD-16	Вирус гепатита уток (DHV)	FLLFLQGAAGNSV LCRIRGGRCHVGSC HFPERHIGRCSGFQA CCIRTWG	103
Азиатский лесной скорпион, <i>Heterometrus petersii</i>	Hp1090	Вирус гепатита С (HCV)	IFKAIWSGIKSLF	104
Красный болотный рак, <i>Procambarus clarkii</i>	Прокамбарин	WSSV	HRPYCGSKGGIGGG HGGGSGGFGGGGG FGGGGLGGGKPIGI GGGGGFGGGSFG GGVGLKPNVGGGG GFGGGGGGFGGGIG LKPNVGGGGGFGG GIGLKPNVGGGGGF GGGGGGFGGGGGG FGGGFGGKLIIGG IGWRRWWLCRKQR LRKVNHL	105
Скорпион,	Hp1036	HSV-1	ILGKIWEGIKSIF	106

<i>Heterometrus petersii</i>				
Скорпион, <i>Heterometrus petersii</i>	Hp1239	HSV-1	ILSYLWNGIKSIF	107
Мышь, <i>Mus musculus</i>	mBD-3	IAV	KINNPVSCLRKGGR CWNRCIGNTRQIGS CGVPFLKCCRK	108
Штамм 115 <i>Staphylococcus epidermidis</i> , штамм WS 2733 <i>Staphylococcus equorum</i>	Микрококцин P1 (MP1)	HCV	SCTTCVCTCSCCTT	109
Палтус, <i>Scophthalmus maximus</i>	Гепцидин-1 (SmHep1P) S. <i>maximus</i>	Мегалоцитивирус (MCV)	QSHISLCRWCCNCC KANKGCGFCCKF	110
Палтус, <i>Scophthalmus maximus</i>	SmHep2P	MCV	GMKCKFCCNCCNL NGCGVCCRF	111
DSM 6313 <i>Actinomadura namibiensis</i>	Лабиринтопептин A1 (LabyA1)	HIV, HSV, RSV, DENV, вирус Зика (ZIKV), HCV, вирус чикунгунья (CHIKV), KSHV, CMV	SNASVWECCSTGS WVPFTCC	112
<i>Actinomadura namibiensis</i>	LabyA2	HIV, HSV, RSV, DENV, ZIKV, HCV, CHIKV, KSHV, CMV	SDWSLWECCSTGSL FACC	113
Пятнистый аргус, <i>Scatophagus</i>	SA-гепцидин-2	Рабдовирус <i>Siniperca chuatsi</i> (SCRV), реовирус	NPAGCRFCCGCCPN MIGCGVCCRF	114

<i>argus</i>		<i>Micropterus salmoides</i> (MsReV)		
Гемолимфа, <i>Haemaphysalis longicornis</i>	Недефензин	Вирус лангат (LGTV)	EEESEVAHLRVRRG FGCPLNQGACHRHC RSIRRRGGYCSGIK QTCTCYRN	115
Скорпион, <i>Mesobuthus martensii</i> (Karsch)	BmKDfsin4	Вирус гепатита В (HBV)	GFGCPFNQGQCHKH CQSIRRRGGYCDGF LKTRCVCYR	116
Тигровая креветка, <i>Penaeus monodon</i>	Циклический антилипополисах аридный фактор креветок (cSALF)	NNV	ECKFTVKPYLKRFQ VYYKGRMWCP	117
Человек, <i>Homo sapiens</i>	Гепаринсвязываю щий EGF- подобный фактор роста (HB-EGF)	IAV	GKRKKKGKGLGKK RDPCLRKYK	118
Белок слияния S2 класса I коронавируса тяжелого острого респираторно го синдрома (SARS-CoV)	SARS _{ww-I}	SARS-CoV	MWKTPTLKYFGGF NFSQIL	119
Белок слияния S2 класса I SARS-CoV	SARS _{ww-II}	SARS-CoV	ATAGWTFGAGAAL QIPFAMQMAY	120
Белок слияния S2	SARS _{ww-III}	SARS-CoV	GYHLMSFPQAAPHG VVFLHVTW	121

класс I SARS-CoV				
Белок слияния S2 класс I SARS-CoV	SARS _{WW-IV}	SARS-CoV	GVFVFNQTSWFITQ RNFFS	122
Белок слияния S2 класс I SARS-CoV	SARS _{WW-Vb}	SARS-CoV	AACEVAKNLNESLI DLQELGKYEQYIKW	123
Белок слияния G _b класс III CMV	174-200	CMV	WEIHHINKFAQAYS SYSRVIGGTVFA	124
Белок слияния G _b класс III CMV	233-263	CMV	WHSRGSTWLLYRE TANLNAMLTITTAR SKYPY	125
Белок слияния G _b класс III CMV	264-291	CMV	HFFATSTGDVVYISP FYNGTNRNASYFG	126
Белок слияния G _b класс III CMV	297-315	CMV	FFIFPNYTIVSDFGRP NAA	127
Белок слияния G _n класс I вируса лихорадки долины Рифт (RFVY)	RVFY-6	RVFY	WNFFDWFSGLMWF GGPLK	128
Белок	RVFY-6	RVFY	WNFFDWFSGLMSW	129

слияния G _n класса I RFVY			FGGPLKTI	
Белок слияния G _n класса I RFVY	RFVY-6	RFVY	SWNFFDWFSGLMS WFGGPLK	130
Белок слияния G _n класса I RFVY	RFVY-6	RFVY	SGSWNFFDWFSGL MSWFGG	131
Белок слияния G _n класса I RFVY	RFVY-6	RFVY	SGSWNFFDWFSGL MSWFGGPLKPL	132
Белок слияния гемагглютини н (НА) класса I IAV	Остатки 84-99 из A/H1	IAV	VDDGFLDIWTYNAE LL	133
Белок слияния НА класса I IAV	Остатки 84-99 из A/H3, A/H4 и A/H14	IAV	VEDTKIDLWSYNAE LL	134
Белок слияния НА класса I IAV	Остатки 84-99 из A/H5	IAV	MEDGFLDVWTYNA ELL	135
Белок GP1 комплекса белков слияния вируса Пичинде	Пептид 4.6 (GP1 ₁₄₃₋₁₇₀)	Вирус Пичинде (PICV)	GHTLKWLLELHFNV LHVTRHIGARCKT	136
Белок GP1 комплекса	Пептид 5.0 (GP1 ₁₉₄₋₂₁₂)	PICV	HLIASLAQIIGDPKIA WVGK	137

белков слияния вируса Пичинде				
Белок GP1 комплекса белков слияния вируса Пичинде	Пептид 6.0 (GP1 ₂₃₃₋₂₅₁)	PICV	HYNFLIIQNTTWEN HCTYT	138
Белок GP2 комплекса белков слияния вируса Пичинде	Пептид 7.0 (GP2 ₂₉₁₋₃₀₇)	PICV	PGGYCLEQWAIWA GIKCF	139
Белок GP2 комплекса белков слияния вируса Пичинде	Пептид 8.0 (GP2 ₃₄₈₋₃₆₆)	PICV	LNLFKKTINGLISDS LVIR	140
Белок слияния E1 HCV	E1 ₁₉₇₋₂₁₄	HCV	VSGIYHVTNDCSNS SIVY	141
Белок слияния E2 HCV	E2 ₄₀₇₋₄₂₄	HCV	PSQKIQLVNTNGSW HINR	142
Белок слияния E2 HCV	E2 ₆₁₀₋₆₂₇	HCV	DYPYRLWHYPCTV NFTVF	143
Белок слияния E2 HCV	E2 ₇₀₁₋₇₁₈	HCV	YLYGIGSAVVSFAIK WEY	144

Человек, <i>Homo sapiens</i> (сигнальная последователь- ность фактора 4 роста фибробластов)	EB	HSV, IAV, вирус коровьей оспы	RRKKA AVALLPAVL LALLAP	145
Человек, <i>Homo sapiens</i>	FluPep 1 (FP1), Tkip	IAV	WLVFFVIFYFFR	146
Человек, <i>Homo sapiens</i>	FP2	IAV	WLVFFVIAYFAR	147
Человек, <i>Homo sapiens</i>	FP3	IAV	WLVFFVIFYFFRRR KK	148
Человек, <i>Homo sapiens</i>	FP4	IAV	RRKKWLVFFVIFYF FR	149
Человек, <i>Homo sapiens</i>	FP7	IAV	RRKKIFYFFR	150
Человек, <i>Homo sapiens</i>	FP8	IAV	WLVFFVRRKK	151
Человек, <i>Homo sapiens</i>	FP9	IAV	FFVIFYRRKK	152
ГТФаза RhoA человека, <i>Homo sapiens</i>	RhoA	RSV, HIV	ILMCFSIDSPDSLEN	153
Белок слияния G _b HSV	gB64	HSV	TTPKFTVAWDWVP KR	154
Белок слияния G _b HSV	gB94	HSV	KTTSSIEFARLQFTY	155
Белок слияния G _b HSV	gB122	HSV	GHRRYFTFGGGYV YF	156

Белок слияния G _b HSV	gB131	HSV	HEVVPLEVYTRHEI K	157
Неструктурны й белок NS5A HCV	C5A	HCV	SWLRDIWDWICEVL SDFK	158
Клаудин 1 человека, <i>Homo sapiens</i>	CL-58	HCV	MANAGLQLLGFILA FLGW	159
Клаудин 1 человека, <i>Homo sapiens</i>	CL-59	HCV	AFLGWIGAIVSTALP QWR	160
Библиотека фагового дисплея сDNA мозга мышы	P1	Вирус Западного Нила (WNV)	DTRACDVIALLLCHL NT	161
Библиотека фагового дисплея сDNA мозга мышы	P9	WNV	CDVIALLACHLNT	162
Поверхностн ый гликопротеин E2 вируса С GB (GBV-C)	P4-7	HIV	WDRGNVTLLCDCP NGPWVWV	163
Поверхностн ый гликопротеин E2 GBV-C	P6-2	HIV	LCDCPNPWWVWP AFCQAVG	164
Человек, <i>Homo sapiens</i>	P5	SARS-CoV-2	GGGYSKAQKAQAK QAK QAQKAQKAQAKQA	165

			KQ	
Человек, <i>Homo sapiens</i>	P5+14	SARS-CoV-2	GGGYSKAQKAQAK QAK QAQKAQKAQAKQA KQA QKAQKAQAKQAKQ	166
Человек, <i>Homo sapiens</i>	(P5R) _D	SARS-CoV-2	GGGYSRAQRAQAR QAR QAQRAQRAQARQA RQ	167
Человек, <i>Homo sapiens</i> , и домашняя корова, <i>Bos</i> <i>taurus</i>	Лактоферрицин	CMV, HIV, HSV, HPV	KCFQWQRNMRKVR GPPVSCIKRDS	168
Человек, <i>Homo sapiens</i> , и домашняя корова, <i>Bos</i> <i>taurus</i>	Лактоферрин	CMV, HIV, HSV, HPV	MKLVFLVLLFLGAL GLCLAGRRRRSVQ WCAVSQPEATKCFQ WQRNMRKVRGPPV SCIKRDSPIQCIQAIA ENRADA VTLDGGFI YEAGLAPYKLRPVA AEVYGTERQPRTHY YAVAVVKKGGSFQ LNELQGLKSCHTGL RRTAGWNVPIGTLR PFLNWTGPPEPIEAA VARFFSASCVPGAD KGQFPNLCRLCAGT GENKCAFSSQEPYF SYSGAFKCLR DGAG DVAFIRESTV	169
Человек, <i>Homo sapiens</i>	CAP37	HSV-1, аденовирус	GRHFCGGALIHARF VMTAASCFQ	170
HIV-1	Tat HIV-1	HIV-1	GRKKRRQRRR	171

HIV	C46	HIV	WMEWDREINNYTS LIHSLIEESQNQKEK NEQELLELDKWASL WNWF	172
HIV	C46mutGlyco	HIV	WMEWDREINNYAS LIHSLIEESQNQKEK NEQELLELDKWASL WNWF	173
HIV	C34	HIV	WMEWDREINNYTS LIHSLIEESQNQKEK NEQELL	174
HIV	C36	HIV	YTSLIHSLIEESQNNQ QEKNEQELLELDK WASLWNWF	175
HIV	T-1249	HIV	WQEWQKITALLEQ AQIQQEKNEYELQK LDKWASLWEWF	176
HIV	T-649	HIV	WMEWDREINNYTS LIHSLIEESQNQKEK NEQELLEL	177
HIV	SC35EK	HIV	WEEWDKKIEEYTK KIEELIKKSEEQKK NEELKK	178
HIV	T-2635	HIV	TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRAAQEQ QEKNEAALREL	179
HIV	HIV-2EHO-C46	HIV	WQQWERQVRFLDA NITKLLIEEAQIQQEK NMYELQELDKWAS LWNWF	180
HIV	Полученный из пептидной области gp41 аналог DP178 из	HIV	TNTIYTLLEESQNQQ EKNEQELLELDKW ASLWNWF	181

	изолята HIV-1 _{SF2}			
HIV	Полученный из пептидной области gp41 аналог DP178 из изолята HIV-1 _{RF}	HIV	YTGIIYNLLEESQNNQ QEKNEQELLELDK W ANLWNWF	182
HIV	Полученный из пептидной области gp41 аналог DP178 из изолята HIV-1 _{MN}	HIV	YTSLIYSLLEKSQIQ QEKNEQELLELDK WASLWNWF	183
HIV	Частичный пептид C34 (первоначально полученный из gp41)	HIV	WMEWDREINNYTS LIHSLIEESQNNQEK NEQELL	184
RSV	DP178 и/или аналог DP107	RSV	YTSVITIELSNIKENK CNGAKVKLIKQELD KYK	185
RSV	DP178 и/или аналог DP107	RSV	TSVITIELSNIKENKC NGAKVKLIKQELDK YKN	186
RSV	DP178 и/или аналог DP107	RSV	VITIELSNIKENKCN GAKVKLIKQELDKY KNAV	187
RSV	DP178 и/или аналог DP107	RSV	IALLSTNKAVVSLSN GVSVLTSKVLDLKN YIDK	188
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	VEAKQARSDIEKLLK EAIRD TNKAVQSVQ SSIGNLI	189
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	RSDIEKLKEAIRD TN KAVQSVQSSIGNLIV AIKSV	190

HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	NSVALDPIDISIELN KAKSDLEESKEWIR RSNQKL	191
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	ALDPIDISIELNKAK SDLEESKEWIRRSN QKLDSI	192
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	LDPIDISIELNKAKS DLEESKEWIRRSNQ KLDSIG	193
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	DPIDISIELNKAKSD LEESKEWIRRSNQK LDSIGN	194
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	PIDISIELNKAKSDLE ESKEWIRRSNQKLD SIGNW	195
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	IDISIELNKAKSDLEE SKEWIRRSNQKLSI GNWH	196
MeV	DP178 и/или аналог DP107	MeV	HRIDLGPPISLERLD VGTNLGNAIAKLEA KELLE	197
MeV	DP178 и/или аналог DP107	MeV	IDLGPPISLERLDVG TNLGNAIAKLEAKE LLESS	198
MeV	DP178 и/или аналог DP107	MeV	LGPPISLERLDVGTN LGNAIAKLEAKELL ESSDQ	199
MeV	DP178 и/или аналог DP107	MeV	PISLERLDVGTNLGN AIAKLEAKELLESSD QILR	200
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	WQEWERKVDFFLEE NITALLEEAQIQQEK NMYELQK	201
SIV	DP178 и/или	SIV	QEWERKVDFFLEENI	202

	аналог DP107		TALLEEAQIQQEK MYELQKL	
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	EWERKVDLFLEENIT ALLEEAQIQQEK MYELQKLN	203
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	WERKVDLFLEENITA LLEEAQIQQEK NMYELQKLN	204
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	ERKVDLFLEENITALL EEAQIQQEK NMYELQKLN	205
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	RKVDLFLEENITALLE EAQIQQEK NMYELQKLN	206
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	KVDLFLEENITALLEE AQIQQEK NMYELQKLN	207
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	VDFLEENITALLEEA QIQQEK NMYELQKLN	208
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	DFLEENITALLEEAQ IQQEK NMYELQKLN	209
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	FLEENITALLEEAQI QQEK NMYELQKLN	210
HIV	Пептид DP178 (AA 638-673 gp41 из изолята HIV- 1 _{LAI})	HIV	YTSLIHSLIEESQ NQ QEKNEQELLELDK WASLWNWF	211
HIV	Пептид DP107 (AA 558-595 gp41 из изолята HIV- 1 _{LAI})	HIV	NNLLRAIEAQQHLL QLTVWQIKQLQARI LAVERYLKDQ	212

HIV	Полученный из пептидной области gp41 аналог DP178 из HIV-1 _{SF2}	HIV	YTNTIYTLLEESQSQ QEKNEQELLELDK WASLWNWF	213
HIV	Полученный из пептидной области gp41 аналог DP178 из HIV-1 _{RF}	HIV	YTGIIYNLLEESQSQ QEKNEQELLELDK WANLWNWF	214
HIV	Полученный из пептидной области gp41 аналог DP178 из HIV-1 _{MN}	HIV	YTSLIYSLLEKSQIQ QEKNEQELLELDK WASLWNWF	215
RSV	DP178 и/или аналог DP107	RSV	YTSWITIELSNIKEN KCNQAKWKLKQEL LDKYK	216
RSV	DP178 и/или аналог DP107	RSV	TSWITIELSNIKENK CNGAKWKLKQEL DKYKN	217
RSV	DP178 и/или аналог DP107	RSV	WITIELSNIKENKCN GAKWKLKQELDK YKNAW	218
RSV	DP178 и/или аналог DP107	RSV	IALLSTNKAWWSLS NGWSWLTSTKWLDL KNYIDK	219
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	VEAKQARSDIEKLLK EAIRDITNKAVQSVQ SSIGNLI	220
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	RSDIEKLKEAIRDITN KAVQSVQSSIGNLIV AIKSV	221
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	NSVALDPIDISIELN	222

	аналог DP107		KAKSDLEESKEWIR RSNOKL	
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	ALDPIDISIELNKAK SDLEESKEWIRRSN QKLDSI	223
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	LDPIDISIELNKAKS DLEESKEWIRRSNO KLDSIG	224
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	DPIDISIELNKAKSD LEESKEWIRRSNOK LDSIGN	225
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	PIDISIELNKAKSDLE ESKEWIRRSNOKLD SIGNW	226
HPIV	DP178 и/или аналог DP107	HPIV	IDISIELNKAKSDLEE SKEWIRRSNQKLDSI GNWE	227
MeV	DP178 и/или аналог DP107	MeV	HRIDLGPPISLERLD WGTLGNIAIAKLEA KELLE	228
MeV	DP178 и/или аналог DP107	MeV	IDLGPPISLERLDWG TNLGNIAIAKLEAKE LLESS	229
MeV	DP178 и/или аналог DP107	MeV	LGPPISLERLDWGT NLGNIAIAKLEAKEL LESSDQ	230
MeV	DP178 и/или аналог DP107	MeV	PISLERLDWGTNLG NAIAKLEAKELLESS DQILR	231
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	WQEWERKVDFLEE NITALLEEAQIQQEK NMYELQK	232
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	QEWERKVDFLEENI TALLEEAQIQQEK N	233

			MYELQKL	
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	EWERKVDLFLEENIT ALLEEAQIQQEKNM YELQKLN	234
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	WERKVDLFLEENITA LLEEAQIQQEKNMY ELQKLS	235
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	ERKVDLFLEENITALL EEAQIQQEKNMYEL QKLNSW	236
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	RKVDLFLEENITALLE EAQIQQEKNMYELQ KLNSWD	237
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	KVDLFLEENITALLEE AQIQQEKNMYELQ KLNSWDV	238
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	WDFLEENITALLEE AQIQQEKNMYELQ KLNSWDVF	239
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	DFLEENITALLEEAQ IQQEKNMYELQKLN SWDVFG	240
SIV	DP178 и/или аналог DP107	SIV	FLEENITALLEEAQI QQEKNMYELQKLN SWDVFGN	241
HIV	Энфувиртид (Т- 1249)	HIV	YTSLIHSLIEESQSQ QEKNEQELLELNK WA SLWNWF	242
HIV		HIV	CLLLGTEVSEALGG AGLT	243
RSV		RSV	DEFDASISQVNEKIN QSLAFIRKSDELLHN VNAGK	244
Вирус		Вирус Хендра;	DITLNNVALDPIDI	245

Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		вирус парагриппа типа 3 человека	SIELNKA KSDLEESK EWIRRSNQKLDSIG N	
RSV		RSV	DPLVFP SDEFDASIS QVNEKINQSLAFIRK SDELL	246
HIV; грипп А		HIV; грипп А	DQYKCLQHGGFCL RSSCP SNTKLQGT KPKPNCKS	247
RSV		RSV	EFDASISQVNEKINQ SLAFIRKSDELLHNV NAGKS	248
RSV		RSV	FDASISQVNEKINQS LAFIRKSDELLHNV NAGKST	249
Вирус Чикунгунья; вирус денге		Вирус Чикунгунья; вирус денге	FLGAILKIGHALAKT VLPMTN AFKPKQ	250
RSV		RSV	FPSDEFDASISQVNE KINQSLAFIRKSDEL LHNVN	251
RSV		RSV	FYDPLVFP SDEFDAS ISQVNEKINQSLAFI RKSDE	252
Вирус гриппа В; вирус гепатита Е		Вирус гриппа В; вирус гепатита Е	GADDVV DSSKSFV MENFSSYHGTKPGY VDSIQKGIQKPKSGT QGN YDDD WKEFYS TDKNYDAAGYSVD NENPLSGKAGGVV KV TYPGLTKVLALK VDNAETIKKELGLS LTEPLMEQVGT	253

Вирус денге; вирус Зика		Вирус денге; вирус Зика	GFGCPLDQMQCHN HCQSVRYRGGYCT NFLKMTCKCY	254
HIV		HIV	GIFPKIIGKGIVNGIK SLAKGVGMKVFKA GLNNIGNTGCNNRD EC	255
HIV		HIV	HSLIEESQNQQEKN EQELLELDKWASL WNWFNITNW	256
RSV		RSV	IINFYDPLVFPSDEF DASISQVNEKINQSL AFIRK	257
HIV		HIV	IKKEIEAIKKEQEAI KKKIEAIEKEISGIVQ QQNNLLRAIEAQQH LLQLTVWGIKQLQA RIL	258
RSV		RSV	INFYDPLVFPSDEFD ASISQVNEKINQSLA FIRKS	259
Вирус Хендра: вирус Нипах		Вирус Хендра: вирус Нипах	KVDISSQISSMNQSL QQSKDYIKEAQRL DTVNPSL	260
HIV		HIV	LGTEVSEALGGAGL TGGF	261
Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека	LHRIDLGPPISLERL DVGTNLGNAIAKLE DAKELL	262
HIV		HIV	LNNCLLLGTEVSEA LGGA	263
RSV		RSV	LVFPSDEFDASISQV	264

			NEKINQSLAFIRKSD ELLHN	
HIV		HIV	MTWMEWDREINNY TSLIHSLEESQNQQ EKNEQELL	265
RSV		RSV	NFYDPLVFPSDEFD ASISQVNEKINQSLA FIRKSD	266
HIV		HIV	NNLLRAIEAQQHLL QLTVWGIKQLQARI LAVERYLKDQ	267
RSV		RSV	PLVFPSDEFDASISQ VNEKINQSLAFIRKS DELLH	268
Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека	PPVYTKDVDISSQIS SMNQLQSKDYIK EAQKILDTVNPSL	269
RSV		RSV	PSDEFDASISQVNEK INQSLAFIRKSDELL HNVNA	270
HIV		HIV	RFPFHRCGAGPKLT KDLE	271
HIV		HIV	RSQKEGLHYTCSSH FPYSQYQFWK	272
RSV		RSV	SDEFDASISQVNEKI NQSLAFIRKSDELLH NVNAG	273
HIV		HIV	SGIVQQQNNLLRAIE AQQHLLQLTVWGIK QLQARIL	274
Вирус Хендра; вирус		Вирус Хендра; вирус парагриппа	SIELNKAKSDLEESK EWIRRSNQKLDISI	275

парагриппа типа 3 человека		типа 3 человека		
HIV		HIV	TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRAAQEQ QEKLEAALREL	276
Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека	VALDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRR	277
Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека	VALDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRS NQLDSD	278
Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека	VALDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRS NQLDSI	278
Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека	VANDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRS NQLDSD	280
Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека	VANDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRS NQLDSI	281
RSV		RSV	VFPSDEFDASISQVN EKINQSLAFIRKSDE LLHNV	282

Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека		Вирус Хендра; вирус парагриппа типа 3 человека	VYTDKVDISSQISSM NQLQSKDYIKEA QKILDTV	283
HCV		HCV	WVAVTPTVATRDG KLPTT	284
RSV		RSV	YDPLVFPSDEFDASI SQVNEKINQSLAFIR KSDEL	285
HIV		HIV	YTSLIHSLIEESQNN QEKNEQQLLELDK WASLWNWF	286
HIV-1, gp41	Альбувиритид	HIV	Ac- WEEWDREINNYT(M pa)LIHELIEESQNNQ EKNEQELL-CONH ₂ (Mpa=3- малеимидопропионов ая кислота)	287
CoV-OC43	EK1	CoV	SLDQINVTFLDLEYE MKKLEEAIKKLEES YIDLKEL	288
CoV-OC43	OC43-HR2P	CoV	SLDYINVTFLDLQD EMNRLQEAIKVLNQ SYINLKDI	289
SARS-CoV-2	HR1 Wuhan-Hu-1	CoV	NVLYENQKLIANQF NSAIGKIQDSLSTA SALGKLQDVVNQN AQALNTLVKQLSSN FGAISSVLNDILSRL DKVEAEVQIDRLIT GRLQSLQTYVTQQL IRAAEIRASAN	290

SARS-CoV-2	HR1 Альфа	CoV	NVLYENQKLIANQF NSAIGKIQDSLSTA SALGKLQDVVNQN AQALNTLVKQLSSN FGAISSVLNDILARL DKVEAEVQIDRLIT GRLQSLQTYVTQQL IRAAEIRASAN	291
SARS-CoV-2	HR1 Бета	CoV	NVLYENQKLIANQF NSAIGKIQDSLSTA SALGKLQDVVNQN AQALNTLVKQLSSN FGAISSVLNDILSRL DKVEAEVQIDRLIT GRLQSLQTYVTQQL IRAAEIRASAN	292
SARS-CoV-2	HR1 Гамма	CoV	NVLYENQKLIANQF NSAIGKIQDSLSTA SALGKLQDVVNQN AQALNTLVKQLSSN FGAISSVLNDILSRL DKVEAEVQIDRLIT GRLQSLQTYVTQQL IRAAEIRASAN	293
SARS-CoV-2	HR1 Дельта	CoV	NVLYENQKLIANQF NSAIGKIQDSLSTA SALGKLQNVVNQN AQALNTLVKQLSSN FGAISSVLNDILSRL DKVEAEVQIDRLIT GRLQSLQTYVTQQL IRAAEIRASAN	294
SARS-CoV-2	HR1 Омикрон	CoV	NVLYENQKLIANQF NSAIGKIQDSLSTA SALGKLQDVVNHN	295

			AQALNTLVKQLSSK FGAISSVLNDIFSRL DKVEAEVQIDRLIT GRLQSLQTYVTQQL IRAAEIRASAN	
SARS-CoV-1	HR1 SARS-CoV1	CoV	NVLYENQKQIANQF NKAISQIQESLTTTS TALGKLQDVVNQN AQALNTLVKQLSSN FGAISSVLNDILSRL DKVEAEVQIDRLIT GRLQSLQTYVTQQL IRAAEIRASAN	296
MERS	HR1 MERS	CoV	QVLSNQKLIANKF NQALGAMQTGFTT TNEAFQKVQDAVN NNAQALSKLASELS NTFGAISASIGDIIQR LDVLEQDAQIDRLI NGRLTTLNAFVAQQ LVRSESAALSAQ	297
SARS-CoV-2	HR2 Wuhan-Hu-1	CoV	VVIGIVNNTVYDPL QPELDSFKEELDKY FKNHTSPDVDLGDI SGINASVVNIQKEID RLNEVAKNLNESLI DLQEL	298
SARS-CoV-2	HR2 Альфа	CoV	VVIGIVNNTVYDPL QPELDSFKEELDKY FKNHTSPDVDLGDI SGINASVVNIQKEID RLNEVAKNLNESLI DLQEL	299
SARS-CoV-2	HR2 Бета	CoV	VVIGIVNNTVYDPL QPELDSFKEELDKY	300

			FKNHTSPDVDLGDI SGINASVVNIQKEID RLNEVAKNLNESLI DLQEL	
SARS-CoV-2	HR2 Гамма	CoV	VVIGIVNNTVYDPL QPELDSFKEELDKY FKNHTSPDVDLGDI SGINASVNIQKEID RLNEVAKNLNESLI DLQEL	301
SARS-CoV-2	HR2 Дельта	CoV	VVIGIVNNTVYDPL QPELDSFKEELDKY FKNHTSPDVDLGDI SGINASVVNIQKEID RLNEVAKNLNESLI DLQEL	302
SARS-CoV-2	HR2 Омикрон	CoV	VVIGIVNNTVYDPL QPELDSFKEELDKY FKNHTSPDVDLGDI SGINASVVNIQKEID RLNEVAKNLNESLI DLQEL	303
SARS-CoV-1	HR2 SARS-CoV1	CoV	VVIGIINNTVYDPLQ PELDSFKEELDKYF KNHTSPDVDLGDIS GINASVVNIQKEIDR LNEVAKNLNESLID LQEL	304
MERS	HR2 MERS	CoV	VTYQNISTNLPPPL GNSTGIDFQDELDEF FKNVSTSIPNFGSLT QINTLLDLTYEML SLQQVVKALNESYI DLKEL	305
SARS-CoV-2	HR2A	CoV	DISGINASVVNIQKE	306

			IDRLNEVAKNLNES LIDLQEL	
SARS-CoV-2	HR2B	CoV	VVIGIVNNTVYDPL QPELDSFKEELDKY FKNHTSPD	307
SARS-CoV-2	HR2C	CoV	FKNHTSPDVDLGD SGINASVVNIQKEID RLNEVAK	308
SARS-CoV-2	Полноразмерный HR2	CoV	GIVNNTVYDPLQPE LDSFKEELDKYFKN HTSPDVDLGD ASVVNIQKEIDRLNE VAKNLNESLIDLQ L	309
SARS-CoV-2	Продукт слияния полноразмерного Fc и HR2	CoV	MGWSCILFLVATA TGVHS GIVNNTVYDPLQPE LDSFKEELDKYFKN HTSPDVDLGD ASVVNIQKEIDRLNE VAKNLNESLIDLQ LGGGGSGGGGGGG GSAESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVVSQEDP EVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCL VKGFPYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPP	310

			VLDSGDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYT QKSLSLSLG	
SARS-CoV-2	Продукт слияния полноразмерного Fc и HR2 без сигнального пептида	CoV	GIVNNTVYDPLQPE LDSFKEELDKYFKN HTSPDVDLGDISGIN ASVVNIQKEIDRLNE VAKNLNESLIDLQE LGGGGSGGGGSGG GGS AESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCL VKG FYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYT QKSLSLSLG	311
HIV	HIV_CHR	HIV	TTWMEWDREINNY TSLIHSLIEESQNQQ EKNEQELLELDKW ASLWNWF	312
HIV	T20	HIV	YTSLIHSLIEESQNQ QEKNEQELLELDK WASLWNWF	313
HIV	T2410	HIV	MTWMEWDREINNY	314

			TSLIHSLIEESQNQQ EKNEQELLEL	
HIV	T2410_2.0	HIV	MTWMEWDREINNY TSLIHSLIEESQNQQ EKNEQELLELDKW ASLWNWF	315
HIV	T1144	HIV	TTWEAWDRAIAEY AARIEALLRALQEQ QEKNEAALREL	316
HIV	T144_2.0	HIV	TTWEAWDRAIAEY AARIEALLRALQEQ QEKNEAALRELDK WASLWNWF	317
HIV	T1249	HIV	WQEWQKITALLEQ AQIQQEKNEYELQK LDKWASLWEWF	318
HIV	T1249_2.0	HIV	TTWQEWQKITALL EQAQIQQEKNEYEL QKLDKWASLWEWF	319
HIV	T2635	HIV	TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRAAQEQ QEKNEAALREL	320
HIV	T2635_2.0	HIV	TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRAAQEQ QEKNEAALRELDK WASLWNWF	321
HIV	T2635_3.0	HIV	MTWEAWDRAIAEY AARIEALIRAAQEQ QEKNEAALRELDK WASLWNWF	322
HIV	T290676	HIV	TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRASQEQQ EKNEAELREL	323
HIV	T290676_2.0	HIV	TTWEAWDRAIAEY	324

			AARIEALIRASQEQQ EKNEAELRELDKW ASLWNWF	
--	--	--	---------------------------------------------	--

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус иммунодефицита человека (HIV) (например, антифузогенный полипептид подавляет проникновение вируса HIV). В некоторых вариантах осуществления HIV представляет собой HIV-1. В некоторых вариантах осуществления HIV представляет собой штамм HIV-1 (например, HIV-1_{HE}, HIV-1_{IBV}, HIV-1_{MN}, HIV-1_{NDK}, HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{RF} или HIV-1_{SF2}). В некоторых вариантах осуществления HIV представляет собой HIV-2. В некоторых вариантах осуществления HIV представляет собой штамм HIV-2 (например, HIV-2_{ЕНО} или HIV-2_{ROD}). В некоторых вариантах осуществления HIV представляет собой псевдовирин HIV. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид обеспечивает предупреждение слияния вируса HIV путем специфического связывания с гликопротеином 120 (gp120) HIV. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид обеспечивает предупреждение связывания gp120 с корецептором кластера дифференцировки 4 (CD4). В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид снижает аффинность gp120 к корецептору (например, хемокиновому рецептору типа 5 С-С (CCR5) и хемокиновому рецептору типа 4 С-Х-С (CXCR4)). В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид обеспечивает предупреждение связывания gp120 с корецептором (например, CCR5 и CXCR4). В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид обеспечивает предупреждение слияния вируса HIV путем специфического связывания с гликопротеином 41 HIV (gp41). В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид подавляет проникновение вирусного кора HIV в клетку. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид (например, полипептид, который подавляет проникновение вируса HIV) под любым из SEQ ID NOs: 1, 5, 11, 13-18, 22-38, 40-46, 49-56, 58, 59, 61, 66-78, 80-85, 87-91, 95-100, 112, 113, 153, 163, 64, 168, 169, 171-184, 211-215, 242, 243, 247, 255, 256, 258, 261, 261, 265, 267, 271, 272, 274, 276, 286, 287, или 312-324. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с полипептидом под любым из SEQ ID NOs: 1, 5, 11, 13-18, 22-38, 40-46, 49-56, 58, 59, 61, 66-78, 80-85, 87-91, 95-100, 112, 113, 153, 163, 64, 168, 169, 171-184, 211-215, 242, 243, 247, 255, 256, 258, 261, 261, 265, 267, 271, 272, 274, 276, 286, 287, или 312-324.

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус гепатита (например, антифузогенный полипептид подавляет проникновение вируса гепатита). В некоторых вариантах осуществления вирус гепатита представляет собой вирус гепатита А

(HAV). В некоторых вариантах осуществления вирус гепатита представляет собой вирус гепатита В (HBV). В некоторых вариантах осуществления вирус гепатита представляет собой вирус гепатита С (HCV). В некоторых вариантах осуществления вирус гепатита представляет собой вирус гепатита D (HDV). В некоторых вариантах осуществления вирус гепатита представляет собой вирус гепатита Е (HEV). В некоторых вариантах осуществления вирус гепатита представляет собой вирус гепатита уток (DHV). В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид (например, полипептид, который подавляет проникновение вируса гепатита, такого как HCV) под любым из SEQ ID NO: 104, 109, 112, 113, 141-145, 158-160 или 284. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99%, или 100%) идентичностью последовательности с полипептидом по любым из SEQ ID NO: 104, 109, 112, 113, 141-145, 158-160 или 284.

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой коронавирус, такой как бетакоронавирус (например, антифузогенный полипептид подавляет проникновение коронавируса). В некоторых вариантах осуществления бетакоронавирус представляет собой SARS-CoV типа 1 (SARS-CoV-1). В некоторых вариантах осуществления бетакоронавирус представляет собой SARS-CoV типа 2 (SARS-CoV-2). В некоторых вариантах осуществления бетакоронавирус представляет собой псевдотипированный вирус, экспрессирующий шиповидный белок SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид (например, полипептид, который подавляет проникновение бетакоронавируса, такого как SARS-CoV-1 или SARS-CoV-2) под любым из SEQ ID NO: 6-9, 119-123, 165-167 или 288-311. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99%, или 100%) идентичностью последовательности с полипептидом по любым из SEQ ID NO: 6-9, 119-123, 165-167 или 288-311.

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой респираторно-синцитиальный вирус (RSV) (например, антифузогенный полипептид подавляет проникновение вируса RSV). В некоторых вариантах осуществления RSV представляет собой RSV подтипа А (RSVA). В некоторых вариантах осуществления RSV представляет собой RSV подтипа В (RSVB). В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид (например, полипептид, который подавляет проникновение вируса RSV) под любым из SEQ ID NO: 11, 13, 39, 112, 113, 153, 185-188, 216-219, 244, 246, 247-249, 251, 252, 257, 259, 264, 266, 268, 270, 273, 282 или 285. В некоторых

вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с полипептидом под любым из SEQ ID NOs: 11, 13, 39, 112, 113, 153, 185-188, 216-219, 244, 246, 247-249, 251, 252, 257, 259, 264, 266, 268, 270, 273, 282, или 285.

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус гриппа (например, сезонного гриппа, пандемического гриппа, гриппа А, гриппа подтипа H1N1, гриппа В, гриппа С, гриппа D). В некоторых вариантах осуществления грипп представляет собой грипп А. В некоторых вариантах осуществления грипп представляет собой грипп В. В некоторых вариантах осуществления грипп представляет собой грипп С. В некоторых вариантах осуществления грипп представляет собой грипп D. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид (например, полипептид, который подавляет проникновение вируса гриппа) под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 11, 245, 247, 253, 262, 269, 275, 277, 278, 279, 280, 281 или 283. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с полипептидом под любым из SEQ ID NOs: 1, 4, 11, 245, 247, 253, 262, 269, 275, 277, 278, 279, 280, 281, или 283.

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус гриппа (например, антифузогенный полипептид подавляет проникновение вируса гриппа). В некоторых вариантах осуществления вирус гриппа представляет собой вирус гриппа А (IAV). В некоторых вариантах осуществления вирус гриппа представляет собой вирус гриппа В (IBV). В некоторых вариантах осуществления вирус гриппа представляет собой вирус гриппа, экспрессирующий гемагглютинин (HA).

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус простого герпеса (HSV) (например, антифузогенный полипептид подавляет проникновение вируса HSV). В некоторых вариантах осуществления HSV представляет собой HSV-1. В некоторых вариантах осуществления HSV представляет собой HSV-2.

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус папилломы человека (HPV) (например, антифузогенный полипептид подавляет проникновение вируса HPV). В некоторых вариантах осуществления HPV представляет собой штамм HPV с высоким риском (например, HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 45, HPV 52 или HPV 58). В некоторых вариантах осуществления HPV представляет собой штамм HPV с низким риском (например, HPV 6, HPV 11, HPV 42, HPV 43, HPV или 44).

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой любой вирус, приведенный в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления содержание GC в последовательности

нуклеиновой кислоты, кодирующей антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, относится к содержанию GC в экспрессионной последовательности, которая кодирует исключительно антифузогенный полипептид без каких-либо других кодирующих областей, которые кодируют полипептиды, отличные от антифузогенного полипептида. Аналогичным образом, содержание уридина или тимидина в экспрессионной последовательности, кодирующей антифузогенный полипептид, относится к содержанию уридина в экспрессионной последовательности, которая кодирует исключительно антифузогенный полипептид без каких-либо других кодирующих областей, которые кодируют полипептиды, отличные от антифузогенного полипептида. В некоторых вариантах осуществления при расчете содержания GC или содержания уридина (или тимидина) в экспрессионной последовательности, кодирующей антифузогенный полипептид, учитывается только непрерывная последовательность нуклеиновой кислоты, которая начинается в направлении от 5' к 3' от первого нуклеотида старт-кодона открытой рамки считывания, которая кодирует антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, учитывается только непрерывная последовательность нуклеиновой кислоты, которая начинается в направлении от 5' к 3' от первого нуклеотида кодона, который

кодирует N-концевой аминокислотный остаток антифузогенного полипептида, до последнего нуклеозида кодона, который кодирует C-концевой аминокислотный остаток антифузогенного полипептида.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антифузогенный полипептид, характеризуется содержанием уридина, составляющим более 20%. В некоторых вариантах осуществления содержание уридина в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, 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 антифузогенный полипептид, характеризуется содержанием уридина, составляющим от 20% до 28%.

Несколько антифузогенных полипептидов

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует несколько экспрессионных последовательностей, каждая из которых кодирует антифузогенный полипептид (например, две или более, как, например, от 2 до 100, от 2 до 50, от 2 до 20, от 2 до 10, от 5 до 100, от 5 до 50, от 5 до 20, или от 5 до 10 экспрессионных последовательностей).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует две или более (например, от 2 до 100, от 2 до 50, от 2 до 20, от 2 до 10, от 5 до 100, от 5 до 50, от 5 до 20 или от 5 до 10) копий одного и того же антифузогенного полипептида.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10) различных (например, характеризующихся менее чем 100% идентичностью последовательности) антифузогенных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления каждый из двух или более различных антифузогенных полипептидов выбран из антифузогенного полипептида из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления каждый из двух или более различных антифузогенных полипептидов подавляет разный вирус. Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать первый антифузогенный полипептид, который подавляет вирус гриппа, и второй антифузогенный полипептид, который подавляет RSV. Кольцевой полирибонуклеотид может включать первый антифузогенный полипептид, который подавляет вирус гриппа, и второй антифузогенный полипептид, который подавляет SARS-CoV-2. Кольцевой полирибонуклеотид может включать первый антифузогенный полипептид, который подавляет HIV, и второй антифузогенный

полипептид, который подавляет SARS-CoV-2. Кольцевой полирибонуклеотид может включать первый антифузогенный полипептид, который подавляет HIV, и второй антифузогенный полипептид, который подавляет HCV. Если либо первый, либо второй антифузогенный полипептид подавляет множество вирусов, первый и второй антифузогенные полипептиды могут характеризоваться разной вирусной специфичностью.

Если кольцевой полирибонуклеотид кодирует два или более антифузогенных полипептидов, антифузогенные полипептиды могут кодироваться в одной открытой рамке считывания или в нескольких открытых рамках считывания.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий открытую рамку считывания (например, открытую рамку считывания, функционально связанную с IRES), которая содержит две или более экспрессионных последовательностей, где каждая экспрессионная последовательность кодирует антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления трансляция открытой рамки считывания обеспечивает получение продукта слияния полипептидов, включающего два или более антифузогенных полипептидов. Антифузогенные полипептиды могут быть связаны, например, с помощью линкера, описанного в данном документе (например, пептидного линкера, кодируемого открытой рамкой считывания, такого как глицин-сериновый линкер, описанный ниже в отношении продуктов слияния пептид-Fc). В некоторых вариантах осуществления антифузогенные полипептиды могут быть разделены доменом расщепления (например, сдвигающей последовательностью), например, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий первую открытую рамку считывания, кодирующую первый антифузогенный полипептид (например, функционально связанную с первым IRES), и вторую открытую рамку считывания, кодирующую второй антифузогенный полипептид (например, функционально связанную со вторым IRES).

Продукты слияния антифузогенный полипептид-Fc

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит экспрессионную последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит антифузогенный полипептид, слитый с Fc-доменом (например, одной цепью Fc-домена) иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид выбран из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит экспрессионную последовательность, кодирующую более одного слитого белка, содержащего антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит экспрессионную последовательность, кодирующую более одного антифузогенного полипептида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий более одного слитого белка, снижает вероятность уклонения вируса.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG2 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG2a или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG2b или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG3 или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления С-концевой аминокислотный остаток антифузогенного полипептида слит с N-концевым аминокислотным остатком Fc-домена, необязательно посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления N-концевой аминокислотный остаток антифузогенного полипептида слит с С-концевым аминокислотным остатком Fc-домена, необязательно посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер между антифузогенным полипептидом и Fc-доменом содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка (например, 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 крайней мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20 аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер между антифузогенным полипептидом и Fc-доменом содержит 2-200 аминокислотных остатков (например, 2-200, 2-180, 2-160, 2-140, 2-120, 2-100, 2-90, 2-80, 2-70, 2-60, 2-50, 2-45, 2-40, 2-35, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 4-200, 5-200, 6-200, 7-200, 8-200, 9-200, 10-200, 15-200, 20-200, 25-200, 30-200, 35-200, 40-200, 45-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, или 180-200 аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер состоит из остатков глицина (Gly) и серина (Ser). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность с любым из $(GS)_x$, $(GGS)_x$, $(GGGS)_x$, $(GGSG)_x$ или $(SGGG)_x$, где x представляет собой целое число от 1 до 50 (например, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10 или 1-5). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность с любым из $(GS)_x$, $(GGS)_x$, $(GGGS)_x$, $(GGSG)_x$ или $(SGGG)_x$, где x представляет собой целое число от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит от 6 до 36 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит от 21 до 31 аминокислоты.

Полирибонуклеотидный груз

Полирибонуклеотидный груз, описанный в данном документе, предусматривает любую последовательность, содержащую по меньшей мере один полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, некодирующую последовательность или экспрессионную последовательность и некодирующую последовательность. В некоторых

вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит IRES, функционально связанный с экспрессионной последовательностью, кодирующей антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, которая кодирует антифузогенный полипептид, который оказывает биологический эффект на субъекта.

Полирибонуклеотидный груз может, например, содержать 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 полирибонуклеотидный груз содержит 1-20000 нуклеотидов, 1-10000 нуклеотидов, 1-5000 нуклеотидов, 100-20000 нуклеотидов, 100-10000 нуклеотидов, 100-5000 нуклеотидов, 500-20000 нуклеотидов, 500-10000 нуклеотидов, 500-5000 нуклеотидов, 1000-20000 нуклеотидов, 1000-10000 нуклеотидов или 1000-5000 нуклеотидов.

В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит одну или несколько экспрессионных (или кодирующих) последовательностей, где каждая экспрессионная (или кодирующая) последовательность кодирует полипептид (например, антифузогенный полипептид). В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит одну или несколько не кодирующих последовательностей. В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз состоит полностью из не кодирующей(не кодирующих) последовательности(последовательностей). В вариантах осуществления полирибонуклеотидный груз содержит комбинацию экспрессионных (или кодирующих) и не кодирующих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления 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.

Экспрессирующие полипептид последовательности

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе (например, полирибонуклеотидный груз кольцевого полирибонуклеотида), содержит одну или несколько экспрессионных (или кодирующих) последовательностей, где каждая экспрессионная последовательность кодирует антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше экспрессионных (или кодирующих) последовательностей.

Каждый кодируемый полипептид может быть линейным или разветвленным. В различных вариантах осуществления полипептид имеет длину, составляющую от приблизительно 5 до приблизительно 40000 аминокислот, от приблизительно 15 до приблизительно 35000 аминокислот, от приблизительно 20 до приблизительно 30000 аминокислот, от приблизительно 25 до приблизительно 25000 аминокислот, от приблизительно 50 до приблизительно 20000 аминокислот, от приблизительно 100 до приблизительно 15000 аминокислот, от приблизительно 200 до приблизительно 10000 аминокислот, от приблизительно 500 до приблизительно 5000 аминокислот, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500 аминокислот или находящуюся в любом диапазоне между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий длину, составляющую менее чем приблизительно 40000 аминокислот, менее чем приблизительно 35000 аминокислот, менее чем приблизительно 30000 аминокислот, менее чем приблизительно 25000 аминокислот, менее чем приблизительно 20000 аминокислот, менее чем приблизительно 15000 аминокислот, менее чем приблизительно 10000 аминокислот, менее чем приблизительно 9000 аминокислот, менее чем приблизительно 8000 аминокислот, менее чем приблизительно 7000 аминокислот, менее чем приблизительно 6000 аминокислот, менее чем приблизительно 5000 аминокислот, менее чем приблизительно 4000 аминокислот, менее чем приблизительно 3000 аминокислот, менее чем приблизительно 2500 аминокислот, менее чем приблизительно 2000 аминокислот, менее чем приблизительно 1500 аминокислот, менее чем приблизительно 1000 аминокислот, менее чем приблизительно 900 аминокислот, менее чем приблизительно 800 аминокислот, менее чем приблизительно 700 аминокислот, менее чем приблизительно 600 аминокислот, менее чем приблизительно 500 аминокислот, менее чем приблизительно 400 аминокислот, менее чем приблизительно 300 аминокислот или меньше, может быть применимым.

Полипептиды, включенные в данный документ, могут предусматривать встречающиеся в природе полипептиды или не встречающиеся в природе полипептиды. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой функциональный фрагмент или вариант эталонного полипептида (например, биологически активный фрагмент или вариант антифузогенного полипептида) или содержит его. Например, полипептид может представлять собой функционально активный вариант любого из полипептидов, описанных в данном документе, характеризующийся по меньшей мере

70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью, например, в пределах определенной области или в пределах всей последовательности, с последовательностью полипептида, описанного в данном документе, или встречающегося в природе полипептида. В некоторых случаях полипептид может характеризоваться по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% или более высокой) идентичностью с представляющим интерес белком.

В вариантах осуществления полипептиды предусматривают несколько полипептидов, например, несколько копий одной полипептидной последовательности или несколько разных полипептидных последовательностей. В вариантах осуществления несколько полипептидов связаны с помощью линкерных аминокислот или спейсерных аминокислот.

В вариантах осуществления полинуклеотидный груз содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Было описано множество последовательностей сигнальных пептидов, например сигнальная последовательность Tat (транслокация Twin-аргинин) как правило представляет собой N-концевую пептидную последовательность, содержащую консенсусный мотив SRRxFLK "twin-аргинин", который служит для транслокации свернутого белка, содержащего такой сигнальный пептид Tat, через липидный бислой. См. также, например, базу данных сигнальных пептидов, общедоступную по адресу: [www\[dot\]signalpeptide\[dot\]de](http://www[dot]signalpeptide[dot]de). Сигнальные пептиды также применимы для направления белка к конкретным органеллам; см., например, экспериментально определенные и предсказанные с применением вычислительных методов сигнальные пептиды, раскрытые в базе данных сигнальных пептидов Spdb, общедоступной по адресу: proline.bic.nus.edu.sg/spdb.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная (или кодирующая) последовательность содержит последовательность поли(A) (например, на 3'-конце экспрессионной последовательности). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(A) составляет более 10 нуклеотидов. В одном варианте осуществления длина последовательности поли(A) составляет более чем 15 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более чем приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500, и 3.000 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 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(A) (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 имеет 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.

Участки 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). В вариантах осуществления IRES расположен между гетерологичным промотором и 5'-концом кодирующей последовательности.

Элемент IRES, подходящий для включения в полирибонуклеотид, содержит последовательность РНК, способную соединяться с эукариотической рибосомой. 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 в себя без ограничения ген *Antennapedia* из *Drosophila melanogaster*.

В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES представляет собой последовательность IRES вируса синдрома Таура, вируса насекомых из семейства *Triatoma*, 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 2 человека (HRV-2), вируса 1 *Homalodisca coagulata*, вируса иммунодефицита человека типа 1, вируса 1 *Homalodisca coagulata*, вируса *Himetobi P*, 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 дрозифилы, 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, гена *antennapedia* дрозифилы, AQP4 человека, AT1R человека, BAG-1 человека, BCL2 человека, BiP человека, с-IAP1 человека, с-мус человека, eIF4G человека, NDST4L мыши, LEF1 человека, HIF1-альфа мыши, n-мус человека, Gtx мышей, p27kip1 человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, гена "reaper" дрозифилы, гена "scamper" псовых, Ubx дрозифилы, UNR человека, UtrA мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, саливируса, косавируса, парэховируса, гена "hairless" дрозифилы, 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 иметь модифицированную последовательность 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:

```

TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCCCATTTGGGCGCTAGCAC
TCTGGTATCACGGTACSTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCTCCCCAACTGTAACSTT
AGAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCA
AGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGA
AAGCGTTCGTTATCCGGCCAACSTACTTCGAAAAACSTAGTAACACCGTGGAAGTTGC
AGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTC
CCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCAT
GGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTC
CGGCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGG
CAGTGTGTTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTT
TCATTTTATTCSTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAG
CTATTGGATTGGCCATCCGGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCSTTTGTTGGGTTT

```

ATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAAC (SEQ ID NO: 325).

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:

ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGGAAACCTGGCCCCGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGCCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATA (SEQ ID NO: 326).

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 образующихся в результате пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов). Например, полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может содержать первый IRES, функционально связанный с первой экспрессионной последовательностью, и второй IRES, функционально связанный со второй экспрессионной последовательностью.

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):4300-18, 2021; Jopling et al. ONCOGENE 20:2664-70, 2001; Baranick et al. PNAS 105(12):4733-38, 2008; Lang et al. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL 13(5):1792-1801, 2002; Dorokhov et al. PNAS 99(8):5301-06, 2002; Wang et al. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 33(7):2248-58, 2005; Petz et al. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 35(8):2473-82, 2007; 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 антифузогенный полипептид, экспрессируемый из кольцевого полирибонуклеотида, раскрытого в данном документе, включает секретлируемый белок, например, белок, который в природе содержит сигнальную последовательность, или белок, который обычно не кодирует сигнальную последовательность, но модифицирован таким образом, чтобы он содержал ее. В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом, содержит сигнал секреции. Например, сигнал секреции может представлять собой кодируемый в естественных условиях сигнал секреции для секретлируемого белка. В другом примере, сигнал секреции может представлять собой модифицированный сигнал секреции для секретлируемого белка. В других вариантах осуществления антифузогенный полипептид, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом, не содержит сигнал секреции.

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность выбрана из SecSP38 (MWRLWLLLLLLLLLWPMVWA; SEQ ID NO: 327); SecD4 (MWWLLLLLLLLLWPMVWA; SEQ ID NO: 328), gLuc (MGVKVLFALICIAVAEAK; SEQ ID NO: 329); INHC1 (MASRLTLLTLLLLLAGDRASS; SEQ ID NO: 330); Ero (MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLG; SEQ ID NO: 331) и IL-2 (MYRMQLLSCIALSLALVTNS; SEQ ID NO: 332).

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

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность дикого типа, которая присутствует на N-конце соответствующего антифузогенного полипептида дикого типа, например, при эндогенной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность является гетерологичной по отношению к антифузогенному полипептиду, например, отсутствует при эндогенной экспрессии антифузогенного полипептида дикого типа. Полирибонуклеотидная последовательность, кодирующая антифузогенный полипептид, может быть модифицирована с обеспечением удаления

нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность дикого типа, и/или добавления последовательности, кодирующей гетерологичную сигнальную последовательность.

Полипептид, кодируемый полирибонуклеотидом (например, антифузогенный полипептид), может содержать сигнальную последовательность, которая направляет антифузогенный полипептид по секреторному пути. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность может направлять антифузогенный полипептид в месторасположение в определенных органеллах (например, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи или эндосомы). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность направляет антифузогенный полипептид 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 сигнал секреции представляет собой сигнал секреции интерлейкина-2 (IL-2) человека. В некоторых вариантах осуществления сигнал секреции IL-2 имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с MYRMQLLSICIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 332). В некоторых вариантах осуществления сигнал секреции IL-2 имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 332. В некоторых вариантах осуществления сигнал секреции IL-2 имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 332. В некоторых вариантах осуществления сигнал секреции IL-2 имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 332.

В некоторых вариантах осуществления сигнал секреции представляет собой сигнал секреции люциферазы *Gaussia*. В некоторых вариантах осуществления сигнал секреции люциферазы *Gaussia* имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с MGVKVLFALICIAVAEAK (SEQ ID NO: 329). В некоторых вариантах осуществления сигнал секреции люциферазы *Gaussia* имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 329. В некоторых вариантах осуществления сигнал секреции люциферазы *Gaussia* имеет аминокислотную

последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 329. В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции люциферазы *Gaussia* имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 329.

В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции представляет собой сигнал секретиции EPO (например, EPO человека). В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции EPO имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с MGVNECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGA (SEQ ID NO: 333). В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции EPO имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 333. В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции EPO имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 333. В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции EPO имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 333.

В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции представляет собой сигнал секретиции SARS-CoV-2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции SARS-CoV-2 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с MFVFLVLLPLVSS (SEQ ID NO: 334). В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции SARS-CoV-2 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 334. В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции SARS-CoV-2 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 334. В некоторых вариантах осуществления сигнал секретиции SARS-CoV-2 дикого типа имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 334.

В некоторых вариантах осуществления антифузогенный полипептид, кодируемый полирибонуклеотидом, содержит либо сигнальную последовательность секретиции, либо сигнальную последовательность вставки в трансмембранном пространстве, либо не содержит сигнальную последовательность.

Регуляторные элементы

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе (например, полирибонуклеотидный груз полирибонуклеотида), содержит один или несколько регуляторных элементов. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит регуляторный элемент, например последовательность, которая модифицирует экспрессию экспрессионной последовательности в пределах полирибонуклеотида.

Регуляторный элемент может предусматривать последовательность, которая расположена рядом с экспрессионной последовательностью, кодирующей продукт экспрессии. Регуляторный элемент может быть функционально связан с соседней последовательностью. Регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества экспрессируемого продукта по сравнению с количеством экспрессируемого продукта в отсутствие регуляторного элемента. Кроме того, один регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества продуктов, экспрессируемых из нескольких экспрессионных последовательностей, соединенных в тандем. Следовательно, один регуляторный элемент может обеспечивать усиление экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей. Многочисленные регуляторные элементы хорошо известны специалистам средней квалификации в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент является модулятором трансляции. Модулятор трансляции может модулировать трансляцию экспрессионной последовательности в полирибонуклеотиде. Модулятор трансляции может являться энхансером или супрессором трансляции. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один модулятор трансляции рядом с по меньшей мере одной экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит модулятор трансляции рядом с каждой экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления модулятор трансляции присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии, например, пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов).

В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент представляет собой микроРНК (miRNA) или сайт связывания miRNA.

Дополнительные примеры регулирующих элементов описаны, например, 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: 335). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент может предусматривать химический компонент, такой как глицерин, линкерный

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

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент. Во избежание выработки непрерывного продукта экспрессии, например пептида или полипептида, при сохранении трансляции по типу "катящегося кольца" можно включить сдвигающий элемент для индукции 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: 336) (элемент, представляющий собой цис-действующую гидролазу). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент кодирует последовательность с С-концевой консенсусной последовательностью, которая представляет собой $X_1X_2X_3EX_5NPGP$ (SEQ ID NO: 337), 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. 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 (SEQ ID NO: 338), где x представляет собой любую аминокислоту. Некоторые неограничивающие примеры сдвигающих элементов включают GDVESNPGP (SEQ ID NO: 339), GDIEENPGP (SEQ ID NO: 340), VEPNPGP (SEQ ID NO: 341), IETNPGP (SEQ ID NO: 342), GDIESNPGP (SEQ ID NO: 343), GDVELNPGP (SEQ ID NO: 344), GDIETNPGP (SEQ ID NO: 345), GDVENPGP (SEQ ID NO: 346), GDVEENPGP (SEQ ID NO: 347), GDVEQNPGP (SEQ ID NO: 348), IESNPGP (SEQ ID NO: 349), GDIELNPGP (SEQ ID NO: 350), HDIETNPGP (SEQ ID NO: 351), HDVETNPGP (SEQ ID NO: 352), HDVEMNPGP (SEQ ID NO: 353), GDMESNPGP (SEQ ID NO: 354), GDVETNPGP (SEQ ID NO: 355), GDIEQNPGP (SEQ ID NO: 356), и DSEFNPGP (SEQ ID NO: 357).

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(пептидов) и/или полипептида(полипептидов) 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.

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 антифузогенных полипептидов, кодируемых кольцевым рибонуклеотидом, могут быть разделены посредством IRES, находящегося между каждыми двумя антифузогенными полипептидами (например, каждый антифузогенный полипептид 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 антифузогенных полипептидов. IRES может отличаться для отличающихся антифузогенных полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления множество антифузогенных полипептидов

может быть разделено посредством саморасщепляющегося пептида 2A. Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый антифузогенный полипептид, 2A и второй антифузогенный полипептид.

В некоторых вариантах осуществления множество антифузогенных полипептидов могут быть разделены сайтом расщепления протеазой (например, сайтом расщепления фурином). Например, кольцевой полирибонуклеотид может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый антифузогенный полипептид, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином) и второй антифузогенный полипептид.

В некоторых вариантах осуществления множество антифузогенных полипептидов могут быть разделены 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 антифузогенный полипептид, 2A, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином) и второй антифузогенный полипептид. Кольцевой полирибонуклеотид также может кодировать IRES, функционально связанный с открытой рамкой считывания, кодирующей первый антифузогенный полипептид, сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления фурином), 2A и второй антифузогенный полипептид. Тандем 2A и сайт расщепления фурином может называться фурином-2A (который включает фурин-2A или 2A-фурин, расположенный в любой ориентации).

Более того, множество антифузогенных полипептидов, кодируемых кольцевым рибонуклеотидом, могут быть разделены как последовательностями IRES, так и последовательностями 2A. Например, IRES может находиться между первым антифузогенным полипептидом и вторым антифузогенным полипептидом, тогда как пептид 2A может находиться между вторым антифузогенным полипептидом и третьим антифузогенным полипептидом. Выбор конкретного IRES или саморасщепляющегося пептида 2A можно применять для контроля уровня экспрессии антифузогенного полипептида под контролем последовательности IRES или 2A. Например, в зависимости от выбранного IRES и/или пептида 2A уровень экспрессии полипептида может быть выше или ниже.

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, которая 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 аминокотрансферазную 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 более антифузогенных полипептидов, например, при этом два или более антифузогенных полипептидов кодируются одной открытой рамкой считывания (ORF). Например, два или более антифузогенных полипептидов могут кодироваться одной открытой рамкой считывания, экспрессия с которой контролируется с помощью IRES. В некоторых вариантах осуществления ORF дополнительно кодирует полипептидный линкер, например, в результате чего продукт экспрессии ORF кодирует два или более антифузогенных полипептидов, 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 более антифузогенных полипептидов, расщепляется при экспрессии, так что после экспрессии два или более антифузогенных полипептидов являются разделенными. 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 полирибонуклеотид, описанный в данном документе (например, полирибонуклеотидный груз полирибонуклеотида), содержит по меньшей мере одну последовательность инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит последовательность инициации трансляции, функционально связанную с экспрессионной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует полипептид и может содержать последовательность инициации трансляции, например старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции

предусматривает последовательность Козак или Шайна-Дальгарно. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит последовательность инициации трансляции, например последовательность Козак, расположенную рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции представляет собой некодирующий старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность инициации трансляции, расположенную рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции обеспечивает конформационную гибкость полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции расположена в пределах по сути однонитевой области 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.

Полирибонуклеотид может содержать более 1 старт-кодона, как, 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 инициироваться в первом старт-кодоне или может инициироваться ниже первого старт-кодона.

В некоторых вариантах осуществления трансляция полирибонуклеотида может инициироваться в кодоне, который не является первым стартовым кодоном, например AUG. Трансляция полирибонуклеотида может инициироваться в альтернативной последовательности инициации трансляции, такой как без ограничения ACG, AGG, AAG, CTG/CUG, GTG/GUG, ATA/AUA, ATT/AUU, TTG/UUG. В некоторых вариантах осуществления трансляция начинается с альтернативной последовательности инициации трансляции в избирательных условиях, например в условиях, индуцированных стрессом. В качестве неограничивающего примера, трансляция полирибонуклеотида может начинаться с альтернативной последовательности инициации трансляции, такой как ACG. В качестве другого неограничивающего примера, трансляция полирибонуклеотида может начинаться с альтернативной последовательности инициации трансляции CTG/CUG. В качестве другого неограничивающего примера, трансляция полирибонуклеотида может начинаться с альтернативной последовательности инициации трансляции GTG/GUG. В

качестве другого неограничивающего примера, трансляция полирибонуклеотида может начинаться с отличной от AUG последовательности, ассоциированной с повторами (RAN), такой как альтернативная последовательность инициации трансляции, которая содержит короткие повторяющиеся отрезки РНК, например, CGG, GGGGCC, CAG, CTG.

Терминирующие элементы

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид, описанный в данном документе (например, полирибонуклеотидный груз полирибонуклеотида) 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 иметь или не иметь 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 иметь или не иметь 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 при этом 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. В общем, 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 внерамочные элементы или элементы в сдвинутых на -1 и +1 рамках считывания (например, скрытый стоп-кодон), 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 мРНК, что часто является пагубным для клетки. В некоторых вариантах осуществления терминирующий элемент представляет собой стоп-кодон.

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.

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. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой

интрон человека. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой полноразмерный интрон человека, например ZKSCAN1.

Иллюстративные нетранслируемые области описаны в 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 полиА. Иллюстративные последовательности полиА описаны в абзацах [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 полиА.

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 являться 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 из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность полиА, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует терминирующий элемент, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует участок внутренней посадки рибосомы, и он

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

Последовательности связывания белка

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания белка, которые делают возможным связывание белка, например, рибосомы, с внутренним сайтом в последовательности РНК. Благодаря

встраиванию в кольцевой полирибонуклеотид сайтов связывания белков, например сайтов связывания рибосом, кольцевой полирибонуклеотид может ускользать от выявления или характеризоваться сниженным выявлением иммунной системой хозяина, характеризоваться модулированным разрушением или модулированной трансляцией, посредством маскирования кольцевого полирибонуклеотида от компонентов иммунной системы хозяина.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сайт связывания иммунного белка, например, для ускользания от иммунных ответов, например ответов с участием CTL (цитотоксических Т-лимфоцитов). В некоторых вариантах осуществления сайт связывания иммунного белка представляет собой нуклеотидную последовательность, которая связывается с иммунным белком и способствует маскированию кольцевого полирибонуклеотида, который является экзогенным. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания иммунного белка представляет собой нуклеотидную последовательность, которая связывается с иммунным белком и способствует скрыванию кольцевого полирибонуклеотида, который является экзогенным или чужеродным.

Традиционные механизмы приведения рибосом в контакт с линейной РНК включают связывание рибосом с кэпированным 5'-концом РНК. От 5'-конца рибосома перемещается к инициаторному кодону, где образуется первая пептидная связь. Согласно настоящему изобретению для внутренней (т. е. кэп-независимой) инициации трансляции кольцевого полирибонуклеотида не требуется свободный конец или кэпированный конец. Точнее говоря, рибосома связывается с некэпированным внутренним сайтом, в результате чего рибосома начинает удлинение полипептида в инициаторном кодоне. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько последовательностей РНК, содержащих сайт связывания с рибосомой, например, инициаторный кодон.

Природные 5'-UTR обладают признаками, которые играют роль в инициации трансляции. Они содержат такие сигнатуры, как последовательности Козак, которые, как широко известно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома иницирует трансляцию многих генов. Последовательности Козак содержат консенсусную последовательность CCR(A/G)CCAUGG (SEQ ID NO: 358), где R представляет собой пурин (аденин или гуанин), расположенный на три основания выше старт-кодона (AUG), за которым расположен еще один "G". Также известно, что 5'-UTR образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует последовательность связывания белка, которая связывается с белком. В некоторых вариантах осуществления последовательность, связывающая белок, нацеливает кольцевой полирибонуклеотид на конкретную мишень или обеспечивает его локализацию около нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность связывания с белком специфично связывается с областью белка, богатой аргинином.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с белком предусматривает без ограничения сайт связывания с белком, таким как ACIN1, AGO, APOBEC3F, APOBEC3G, ATXN2, AUN, BCCIP, CAPRIN1, CELF2, CPSF1, CPSF2, CPSF6, CPSF7, CSTF2, CSTF2T, CTCF, DDX21, DDX3, DDX3X, DDX42, DGCR8, EIF3A, EIF4A3, EIF4G2, ELAVL1, ELAVL3, FAM120A, FBL, FIP1L1, FKBP4, FMR1, FUS, FXR1, FXR2, GNL3, GTF2F1, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, HNRNPUL1, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, ILF3, KHDRBS1, LARP7, LIN28A, LIN28B, m6A, MBNL2, METTL3, MOV10, MSI1, MSI2, NONO, NONO-, NOP58, NPM1, NUDT21, PCBP2, POLR2A, PRPF8, PTBP1, RBFOX2, RBM10, RBM22, RBM27, RBM47, RNPS1, SAFB2, SBDS, SF3A3, SF3B4, SIRT7, SLBP, SLTM, SMNDC1, SND1, SRRM4, SRSF1, SRSF3, SRSF7, SRSF9, TAF15, TARDBP, TIA1, TNRC6A, TOP3B, TRA2A, TRA2B, U2AF1, U2AF2, UNK, UPF1, WDR33, XRN2, YBX1, YTHDC1, YTHDF1, YTHDF2, YWHAG, ZC3H7B, PDK1, AKT1, и любым другим белком, который связывает РНК.

Спейсерные последовательности

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.

Например, где нуклеиновая кислота содержит любые два или больше из следующих элементов: (A) 3'-фрагмента каталитического интрона; (B) 3'-сайта сплайсинга; (C) 3'-фрагмента экзона; (D) полирибонуклеотидного груза; (E) 5'-фрагмента экзона; (F) 5'-сайта сплайсинга и (G) 5'-фрагмента каталитического интрона; спейсерная область может находиться между любым одним или несколькими из данных элементов. Любой из элементы (A), (B), (C), (D), (E), (F) или (G) может быть отделен спейсерной последовательностью, описанной в данном документе. Например, спейсер может находиться между (A) и (B), между (B) и (C), между (C) и (D), между (D) и (E), между (E) и (F) или между (F) и (G).

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид дополнительно содержит первую спейсерную область между 5'-фрагментом экзона из (C) и полирибонуклеотидным грузом из (D). 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 полирибонуклеотид дополнительно содержит вторую спейсерную область между полирибонуклеотидным грузом из (D) и 5'-фрагментом экзона из (E).

Спейсерные последовательности могут применяться для отделения IRES от расположенных рядом структурных элементов для сохранения структуры и функции IRES

или смежного элемента. Спейсер может быть специфически сконструирован в зависимости от IRES. В некоторых вариантах осуществления компьютерное программное обеспечение для определения сворачивания РНК, такое как RNAFold, может использоваться для принятия решений в отношении конструирования различных элементов вектора, содержащего спейсеры.

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.

Спейсеры могут также находиться в пределах области нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Например, область полинуклеотидного груза может содержать один или несколько спейсеров. Спейсеры могут отделять области в пределах полинуклеотидного груза.

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(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.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит 5'-спейсерную последовательность (например, между 5'-областью отжига и полирибонуклеотидным грузом). В некоторых вариантах осуществления длина 5'-спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 10 нуклеотидов. В другом варианте осуществления длина 5'-спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов. В дополнительном варианте осуществления длина 5'-спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина 5'-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 5'-спейсерной последовательности составляет не более 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина 5'-спейсерной последовательности составляет от 20 до 50 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина 5'-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. В одном варианте осуществления 5'-спейсерная последовательность представляет собой последовательность поли(A). В другом варианте осуществления 5'-спейсерная последовательность представляет собой последовательность поли(A-C). В некоторых вариантах осуществления 5'-спейсерная последовательность содержит последовательность поли(A-G). В некоторых вариантах осуществления 5'-спейсерная последовательность содержит последовательность поли(A-T). В некоторых вариантах осуществления 5'-спейсерная последовательность содержит случайную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид содержит 3'-спейсерную последовательность (например, между 3'-областью отжига и полирибонуклеотидным грузом). В некоторых вариантах осуществления длина 3'-спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 10 нуклеотидов. В другом варианте осуществления длина 3'-спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов. В дополнительном варианте осуществления длина 3'-спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина 3'-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 3'-спейсерной последовательности составляет не более 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина 3'-

спейсерной последовательности составляет от 20 до 50 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина 3'-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. В одном варианте осуществления 3'-спейсерная последовательность представляет собой последовательность поли(А). В другом варианте осуществления 5'-спейсерная последовательность представляет собой последовательность поли(А-С). В некоторых вариантах осуществления 5'-спейсерная последовательность содержит последовательность поли(А-Г). В некоторых вариантах осуществления 5'-спейсерная последовательность содержит последовательность поли(А-Т). В некоторых вариантах осуществления 5'-спейсерная последовательность содержит случайную последовательность.

В одном варианте осуществления полирибонуклеотид содержит 5'-спейсерную последовательность, но не 3'-спейсерную последовательность. В другом варианте осуществления полирибонуклеотид содержит 3'-спейсерную последовательность, но не 5'-спейсерную последовательность. В другом варианте осуществления полирибонуклеотид не содержит ни 5'-спейсерную последовательность, ни 3'-спейсерную последовательность. В другом варианте осуществления полирибонуклеотид не содержит последовательность IRES. В дополнительном варианте осуществления полирибонуклеотид не содержит последовательность IRES, 5'-спейсерную последовательность или 3'-спейсерную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит по меньшей мере 3 рибонуклеотида, по меньшей мере 4 рибонуклеотида, по меньшей мере 5 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 8 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 10 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 12 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 15 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 20 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 25 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 30 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 40 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 50 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 60 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 70 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 80 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 90 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 100 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 120 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 150 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 200 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 250 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 300 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 400 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 500 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 600 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 700 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 800 рибонуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 900 рибонуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 1000 рибонуклеотидов.

Модификации

Полинуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид), описанный в данном документе, 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 полиА, 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.

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 полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну N(6)-метиладенозиновую (m6A) модификацию 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 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 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 фосфотиоатного 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 (а-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-бета-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 флударабина фосфат, N4-бегеноил-1-бета-D-арабинофуранозилцитозин, N4-октадецил-1-бета-D-арабинофуранозилцитозин, N4-пальмитоил-1-(2-С-циано-2-дезоксид-бета-D-арабинопентофуранозил)цитозин и P-4055 (сложный эфир цитарабина и 5'-элаидиновой кислоты).

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, пурин или пиримидин 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 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%).

Способы циркуляризации

В настоящем изобретении предусмотрены способы получения кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1), включая, например, рекомбинантную технологию или химический синтез. Например, молекула ДНК, применяемая для получения кольцевой РНК, может содержать последовательность ДНК со встречающейся в природе исходной последовательностью 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.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации может быть подвергнут циклизации или конкатемеризации. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации может быть

подвергнут циклизации *in vitro* перед составлением и/или доставкой. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может находиться в смеси с линейными полирибонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды имеют ту же последовательность нуклеиновой кислоты, что и кольцевые полирибонуклеотиды.

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

В некоторых вариантах осуществления применяют ДНК- или РНК-лигазу для ферментативного связывания 5'-фосфорилированной молекулы нуклеиновой кислоты (например, линейного полирибонуклеотида для циркуляризации) с 3'-гидроксильной группой нуклеиновой кислоты (например, линейной нуклеиновой кислоты) с образованием новой фосфодиэфирной связи. В приводимой в качестве примера реакции линейный полирибонуклеотид для циркуляризации инкубируют при 37°C в течение 1 часа с 1-10 единицами РНК-лигазы Т4 (New England Biolabs, Ипсвич, штат Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя. Реакция лигирования может происходить в присутствии линейной нуклеиновой кислоты, способной к образованию пар оснований как с 5'-, так и с 3'-областями, расположенными рядом друг с другом, для содействия реакции ферментативного лигирования. В некоторых вариантах осуществления лигирование представляет собой лигирование с помощью шунта. Например, для лигирования с помощью шунта можно применять лигазу для шунта, такую как лигаза SplintR®, РНК-лигазу II, РНК-лигазу Т4 или ДНК-лигазу Т4. Для лигирования с помощью шунта можно сконструировать одонитевой полинуклеотид (шунт), такой как одонитевая РНК, 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 кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления при синтезе кольцевых полинуклеотидов применяется ДНК- или РНК-лигаза. В некоторых вариантах осуществления 5'- либо 3'-конец линейного полирибонуклеотида для циркуляризации может кодировать

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

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации подвергают циклизации или конкатемеризации с использованием по меньшей мере одного компонента, отличного от нуклеиновой кислоты. В одном аспекте по меньшей мере один компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может вступать в реакцию с областями или элементами вблизи 5'-конца и/или вблизи 3'-конца линейного полирибонуклеотида для циркуляризации с целью обеспечения циклизации или конкатемеризации линейного полирибонуклеотида для циркуляризации. В другом аспекте по меньшей мере один компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может быть расположен на 5'-конце и/или 3'-конце линейного полирибонуклеотида для циркуляризации, или быть соединенным с ним, или находиться вблизи него. Рассматриваемые компоненты, отличные от нуклеиновой кислоты, могут быть гомологичными или гетерологичными. В качестве неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой связь, такую как гидрофобная связь, ионная связь, биоразрушаемая связь и/или расщепляемая связь. В качестве другого неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, представляет собой лигирующий компонент. В качестве еще одного неограничивающего примера, компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой олигонуклеотидный или пептидный компонент, такой как аптамер или линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, описанный в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации синтезируют с использованием IVT и РНК-полимеразы, где смесь нуклеотидов, применяемая для IVT, может содержать избыток гуанозинмонофосфата по сравнению с гуанозинтрифосфатом для преимущественного получения РНК с 5'-монофосфатом; очищенный продукт IVT может быть подвергнут циркуляризации с использованием ДНК для шунтирования.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации 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 для циркуляризации, находящимися вблизи них или соединенными с ними. В качестве неограничивающего примера, один или несколько линейных

полирибонуклеотидов для циркуляризации могут быть подвергнуты циклизации или конкатемеризации благодаря межмолекулярным силам или внутримолекулярным силам. Неограничивающие примеры межмолекулярных сил включают силы взаимодействия диполь-диполь, силы взаимодействия диполь-индуцированный диполь, силы взаимодействия индуцированный диполь-индуцированный диполь, ван-дер-ваальсовы силы и лондоновские дисперсионные силы. Неограничивающие примеры внутримолекулярных сил включают ковалентные связи, металлические связи, ионные связи, резонансные связи, агостические связи, диполярные связи, конъюгацию, гиперконъюгацию и антисвязывание.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации может содержать последовательность РНК-рибозима вблизи 5'-конца и вблизи 3'-конца. Последовательность РНК-рибозима может образовывать ковалентную связь с пептидом, когда его последовательность подвергается воздействию остальной части рибозима. В одном аспекте пептиды, ковалентно связанные с последовательностью РНК-рибозима вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут ассоциироваться друг с другом, обеспечивая циклизацию или конкатемеризацию линейного полирибонуклеотида для циркуляризации. В другом аспекте пептиды, ковалентно связанные с РНК-рибозимом вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут обеспечивать циклизацию или конкатемеризацию линейной первичной конструкции или линейной мРНК после их лигирования с помощью различных способов, известных из уровня техники, таких как без ограничения лигирование белков. Неограничивающие примеры рибозимов для использования в линейных первичных конструкциях или линейных РНК по настоящему изобретению или неисчерпывающий перечень способов включения и/или ковалентного связывания пептидов описаны в заявке на патент США № US20030082768, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации может содержать 5'-трифосфат нуклеиновой кислоты, превращенный в 5'-монофосфат, например, путем приведения 5'-трифосфата в контакт с РНК-5'-пирофосфогидролазой (RppH) или АТР-дифосфогидролазой (апиразой). В некоторых вариантах осуществления 5'-конец по меньшей мере части линейных полирибонуклеотидов содержит монофосфатный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления популяцию полирибонуклеотидов, содержащую кольцевые и линейные полирибонуклеотиды, приводят в контакт с RppH перед расщеплением по меньшей мере части линейных полирибонуклеотидов 5'-экзонуклеазой и/или 3'-экзонуклеазой. В качестве альтернативы превращение 5'-трифосфата линейного полирибонуклеотида для циркуляризации в 5'-монофосфат может происходить посредством двухстадийной реакции, включающей: (а) приведение 5'-нуклеотида линейного полирибонуклеотида для циркуляризации в контакт с фосфатазой (например, антарктической фосфатазой, щелочной фосфатазой креветки или кишечной фосфатазой теленка) для удаления всех трех фосфатных остатков; и (b) приведение 5'-нуклеотида после стадии (а) в контакт с

киназой (например, полинуклеотидкиназой), которая обеспечивает добавление одного фосфатного остатка.

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит внутренний сплайсинговый элемент, который при репликации соединяет сплайсированные концы друг с другом. Некоторые примеры могут включать миниатюрные интроны (<100 нт) с последовательностями сайтов сплайсинга и короткими инвертированными повторами (30-40 нт), такими как *AluSq2*, *AluJg* и *AluSz*, инвертированные последовательности во фланкирующих интронах, *Alu*-элементы во фланкирующих интронах и мотивы, обнаруживаемые (обогащенные мотивы из дополнительной таблицы 4) в цис-элементах последовательностей, проксимальных по отношению к местам событий обратного сплайсинга, таких как последовательности в пределах 200 п. о., предшествующих сайту обратного сплайсинга с фланкирующими экзонами (расположенных выше него) или следующих за ним (расположенных ниже него). В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну повторяющуюся нуклеотидную последовательность, описанную в другом месте в данном документе, в качестве внутреннего сплайсингового элемента. В таких вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность может

включать в себя повторяющиеся последовательности интронов из семейства Alu. В некоторых вариантах осуществления рибосомосвязывающий белок, связанный со сплайсингом, может регулировать биогенез кольцевого полирибонуклеотида (например, как факторы сплайсинга Muscleblind и Quaking (QKI)).

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид может содержать последовательность, которая опосредует самолигирование. В одном варианте осуществления линейный полирибонуклеотид может содержать последовательность HDV, например, последовательность консервативного репликативного домена HDV, GGCUCAUCUCGACAAGAGGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUCUGUAAAG AGGAGACUGCUGGACUCGCCGCCCAAGUUCGAGCAUGAGCC (Beeharry et al 2004) (SEQ ID NO: 359) или GGCUAGAGGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUCUGUAAAGAGGAGACUCUGGACUCGCCGCCGAGCC (SEQ ID NO: 360), для самолигирования. В одном варианте осуществления линейный полирибонуклеотид может содержать последовательность петли E (например, в PSTVd) для самолигирования. В другом варианте осуществления линейный полирибонуклеотид может содержать самоциркуляризирующийся интрон, например, 5'- и 3'-границы сплайсинга, или самоциркуляризирующийся каталитический интрон, такой как интроны I группы, II группы или III группы. Неограничивающие примеры последовательностей самосплайсирующихся интронов группы I могут включать самосплайсирующиеся последовательности с циклическими перестановками интронов и экзонов, полученные из гена td бактериофага T4, и вставочные последовательности (IVS) рРНК Tetrahymena.

В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды для циркуляризации могут содержать комплементарные последовательности, в том числе

повторяющиеся либо неповторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты в отдельных интронах или среди фланкирующих интронов. Повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты представляют собой последовательности, которые встречаются в сегменте линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность содержит последовательности поли(СА) или поли(UG). В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте линейного полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит от 1 до 10 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10) повторяющихся последовательностей нуклеиновой кислоты, которые гибридизируются с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте линейного полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит 2 повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты, которые гибридизируются с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте линейного полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты и комплементарные повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты из двух отдельных линейных полирибонуклеотидов гибридизируются с образованием одного кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированные сегменты образуют внутренние двойные нити. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности находятся на 5'- и 3'-концах линейных полирибонуклеотидов для циркуляризации. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности содержат приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, или больше пар нуклеотидов.

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

В некоторых вариантах осуществления для обеспечения образования кольцевого

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

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

Кольцевой полирибонуклеотид может кодировать последовательность и/или мотив, применимый для репликации. Иллюстративные репликативные элементы описаны в параграфах [0280] - [0286] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды могут содержать комплементарные последовательности, в том числе либо повторяющиеся, либо неповторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты в отдельных интронах или среди фланкирующих интронов. Повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты представляют собой последовательности, которые встречаются в сегменте кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность содержит последовательности поли(CA) или поли(UG). В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте линейного полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты и комплементарные повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты из двух отдельных линейных полирибонуклеотидов гибридизируются с образованием одного кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированные сегменты образуют внутренние двойные нити. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности находятся на 5'- и 3'-концах линейных полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности содержат приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, или больше пар нуклеотидов.

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

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); Muller and Appel, из *RNA Biol*, 2017, 14(8):1018-1027; и Egli & Herdewijn, *Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids*, (первое издание), Wiley-VCH (2012). Другие способы получения кольцевых полирибонуклеотидов описаны, например, в международной публикации № WO2022/247943, патенте США № US11000547, международной публикации № 2018/191722, международной публикации № WO2019/236673, международной публикации № WO2020/023595, международной публикации № WO2022/204460, международной публикации № WO2022/204464 и международной публикации № WO2022/204466.

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.

Способы получения

Способы получения в бесклеточной системе

В настоящем изобретении также предусмотрены способы получения кольцевой РНК. Например, дезоксирибонуклеотидная матрица может транскрибироваться 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 кольцевой полирибонуклеотид.

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 Mg²⁺ 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 Mn²⁺ или их соли, такой как MnCl₂ (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 (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, составляющую 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 сDNA. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается транскрипция линейного полирибонуклеотида с дезоксирибонуклеиновой кислоты путем транскрипции в бесклеточной системе (например, транскрипции *in vitro*).

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ В КЛЕТКЕ

В настоящем изобретении также предусмотрены способы получения кольцевой РНК 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 из экзогенной рекомбинантной молекулы ДНК, транзистентно доставленной в клетку. В некоторых вариантах осуществления экзогенная молекула ДНК не интегрируется в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид транскрибируется в клетке из 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, *Haloferox volcanii*), *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.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка, содержащая полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, 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 другие представители *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 каллюса 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 одноклеточной эукариотической водоросли, представляющей интерес, включают *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Neochloris oleoabundans* и другие представители *Neochloris* spp., *Protosiphon botryoides*, *Botryococcus braunii*, *Cryptococcus* spp., *Chlamydomonas reinhardtii* и другие представители *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), Paleognathae (например, страусы, эму), Columbiformes (например, голуби, горлицы) или Psittaciformes (например, попугаи). В вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку членистоногого (например, насекомых, арахнид, 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.

Способы очистки

Одна или несколько стадий очистки могут быть включены в способы, описанные в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид является фактически обогащенным или чистым (например, очищенным) до осуществления самосплайсинга линейного полирибонуклеотида. В других вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид не очищают до осуществления самосплайсинга линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления полученная кольцевая РНК является очищенной.

Очистка может включать отделение требуемого продукта реакции от одного или нескольких нежелательных компонентов, таких как любой непрореагировавший исходный материал, побочные продукты, ферменты или другие компоненты реакции, или его обогащение. Например, очистка линейного полирибонуклеотида после транскрипции в бесклеточной системе (например, транскрипции *in vitro*) может включать отделение от ДНК-матрицы или обогащение до осуществления самосплайсинга линейного полирибонуклеотида. Очистка продукта кольцевой РНК после сплайсинга может быть

применена для отделения кольцевой РНК от ее соответствующей линейной РНК или ее обогащения. Способы очистки РНК известны специалистам в данной области техники и включают ферментативную очистку или очистку посредством хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления способы очистки обеспечивают получение кольцевого полирибонуклеотида, который содержит менее 50% (например, менее 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) линейных полирибонуклеотидов.

Биореакторы

В некоторых вариантах осуществления любой способ получения кольцевого полирибонуклеотида, описанный в данном документе, может быть осуществлен в биореакторе. Биореактор относится к любому сосуду, в котором осуществляют химический или биологический процесс, в котором участвуют организмы или биохимически активные вещества, полученные из таких организмов. Биореакторы могут быть совместимыми с бесклеточными способами получения кольцевой РНК, описанными в данном документе. Сосуд для биореактора может предусматривать колбу для культивирования, чашу или мешок, которые могут быть предназначенными для одноразового применения (одноразовыми), пригодными для автоклавирования или стерилизации. Биореактор может быть сделан из стекла, или он может быть на полимерной основе, или он может быть сделан из других материалов.

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, составляющем 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, составляющем 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 по меньшей мере 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 или 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 на час или на 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 применения

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1), применяют для лечения или предупреждения вирусной инфекции (например, вызываемой HIV, SARS-CoV-2, HCV, вирусом гриппа или RSV).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полинуклеотид, кодирующий антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1), применяют для снижения проникновения вируса.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полинуклеотид, кодирующий антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1), можно вводить субъекту для снижения риска развития вирусной инфекции (например, вызываемой HIV, SARS-CoV-2, HCV, вирусом гриппа или RSV).

Например, кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может быть введен субъекту (например, в фармацевтической композиции). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой позвоночное животное (например, млекопитающее, птицу, рыбу, рептилию или амфибию). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее. В одних вариантах осуществления субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как отличный от человека примат (например, нечеловекообразные обезьяны, человекообразные обезьяны), копытное животное (например, крупный рогатый скот, буйвол, овца, коза, свинья, верблюд, лама, альпака, олень, лошади, ослы), хищное млекопитающее (например, собака, кошка), грызун (например, крыса, мышь) или зайцеобразное (например, кролик). В вариантах осуществления субъект представляет собой птицу, такую как представитель таких таксонов птиц, как Galliformes (например, куры, индейки, фазаны, перепела), Anseriformes (например, утки, гуси), Paleognathae (например, страусы, эму), Columbiformes (например, голуби, горлицы) или Psittaciformes (например, попугаи). В вариантах осуществления субъект представляет собой беспозвоночное, такое как членистоногое (например, насекомые, арахниды, ракообразные), нематода, аннелида, гельминт или моллюск.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен

способ модификации субъекта путем доставки в организм субъекта композиции или состава, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав представляют собой молекулу нуклеиновой кислоты (например, молекулу ДНК или молекулу РНК, описанные в данном документе) или содержат ее, и полинуклеотид доставляется в организм эукариотического субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав представляют собой или содержит эукариотическую или прокариотическую клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта путем доставки в организм субъекта композиции или состава, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав представляют собой молекулу нуклеиновой кислоты (например, молекулу ДНК или молекулу РНК, описанные в данном документе) или содержат ее, и полинуклеотид доставляется в организм эукариотического субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиция или состав представляют собой или содержат эукариотическую или прокариотическую клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид предоставляют в количестве и в течение срока, достаточных для лечения вирусной инфекции у субъекта, например, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления способ можно применять для лечения или предупреждения HIV. Например, в некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует антифузогенный полипептид, который нацеливается на HIV, и данную композицию можно применять для лечения или предупреждения HIV.

В некоторых вариантах осуществления способ можно применять для лечения или предупреждения SARS-CoV-2. Например, в некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует антифузогенный полипептид, который нацеливается на SARS-CoV-2, и данную композицию можно применять для лечения или предупреждения SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления способ можно применять для лечения или предупреждения HCV. Например, в некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует антифузогенный полипептид, который нацеливается на HCV, и данную композицию можно применять для лечения или предупреждения HCV.

В некоторых вариантах осуществления способ можно применять для лечения или предупреждения RSV. Например, в некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует антифузогенный полипептид, который нацеливается на RSV, и данную композицию можно применять для лечения или предупреждения RSV.

Способы введения доз

В данном документе раскрыт способ введения доз для получения определенного уровня кольцевого полирибонуклеотида, кодирующего антифузогенный полипептид

(например, полипептид из таблицы 1), или экспрессии определенного уровня антифузогенного полипептида (например, полипептида из таблицы 1) в клетке после обеспечения по отношению к клетке по меньшей мере двух доз кольцевого полирибонуклеотида или композиций на его основе. В данном документе раскрыт способ введения доз для получения определенного уровня кольцевого полирибонуклеотида или экспрессии определенного уровня антифузогенного полипептида (например, полипептида из таблицы 1, например, полипептида из любой из таблиц 2-4) у субъекта (например, млекопитающего, например, человека) после обеспечения (например, введения) по отношению к субъекту по меньшей мере двух доз кольцевого полирибонуклеотида или композиций на его основе. Композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий антифузогенный полипептид, описанный в данном документе. Способ введения доз может включать введение двух или более доз композиции на основе кольцевых полирибонуклеотидов, например, в течение короткого периода или в течение длительного периода времени. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Кольцевой полирибонуклеотид кодирует антифузогенный полипептид, который может экспрессироваться в клетке, например, после введения.

Описанный в данном документе способ может включать введение первой дозы фармацевтической композиции в количестве, достаточном для получения концентрации в сыворотке крови, составляющей по меньшей мере 500 нг/мл (например, по меньшей мере 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл, 1000 нг/мл, 1100 нг/мл, 1200 нг/мл, 1300 нг/мл, 1400 нг/мл, 1500 нг/мл, 1600 нг/мл, 1700 нг/мл, 1800 нг/мл, 1900 нг/мл, 2000 нг/мл, 2100 нг/мл, 2200 нг/мл, 2300 нг/мл, 2400 нг/мл, 2500 нг/мл, 2600 нг/мл, 2700 нг/мл, 2800 нг/мл, 2900 нг/мл, 3000 нг/мл или больше) антифузогенного полипептида у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать введение второй дозы фармацевтической композиции. Способ может дополнительно включать введение третьей, четвертой, пятой, шестой, седьмой, восьмой, девятой, десятой или более доз фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления последующая доза помогает поддерживать концентрацию в сыворотке крови, составляющую по меньшей мере 500 нг/мл (например, по меньшей мере 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл, 1000 нг/мл, 1100 нг/мл, 1200 нг/мл, 1300 нг/мл, 1400 нг/мл, 1500 нг/мл, 1600 нг/мл, 1700 нг/мл, 1800 нг/мл, 1900 нг/мл, 2000 нг/мл, 2100 нг/мл, 2200 нг/мл, 2300 нг/мл, 2400 нг/мл, 2500 нг/мл, 2600 нг/мл, 2700 нг/мл, 2800 нг/мл, 2900 нг/мл, 3000 нг/мл или больше) антифузогенного полипептида у субъекта. В некоторых вариантах осуществления последующую дозу вводят до того, как концентрация антифузогенного полипептида в сыворотке крови у субъекта упадет ниже 500 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрено несколько доз для получения определенного уровня композиции или экспрессии определенного уровня антифузогенного полипептида в клетке, ткани или у субъекта. В некоторых вариантах

осуществления предусмотрено несколько доз для получения или поддержания определенного уровня композиции или для получения или поддержания определения уровня антифузогенного полипептида в клетке, ткани или у субъекта в течение периода времени, например, по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 21 или 24 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят через по меньшей мере один час (например, по меньшей мере через два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть часов, семь часов, восемь часов, девять часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев, один год или дольше) после первой дозы фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят в период от 1 часа до 1 года (например, от 1 часа до 1 дня, например, один час, два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть часов, семь часов, восемь часов, девять часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа или один день, например, от одного дня до одной недели, например, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней или одна неделя, например, от одной недели до одного месяца, например, две недели, три недели или один месяц, например, от одного месяца до одного года, например, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев или один год) после первой дозы фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят в период от 1 дня до 180 дней (например, от 1 дня до 90 дней, от 1 дня до 45 дней, от одного дня до 30 дней, от 1 дня до 14 дней, от 1 дня до 7 дней, от 2 дней до 45 дней, от 2 дней до 30 дней, от 2 дней до 14 дней, от 2 дней до 7 дней, от 3 дней до 90 дней, от 3 дней до 45 дней, от 3 дней до 30 дней, от 3 дней до 14 дней, от 3 дней до 7 дней, от 4 дней до 90 дней, от 4 дней до 45 дней, от 4 дней до 30 дней, от 4 дней до 14 дней, от 4 дней до 7 дней, от 5 дней до 90 дней, от 5 дней до 45 дней, от 5 дней до 30 дней, от 5 дней до 14 дней, от 5 дней до 7 дней, от 6 дней до 90 дней, от 6 дней до 45 дней, от 6 дней до 30 дней, от 6 дней до 14 дней, от 6 дней до 7 дней, от 7 дней до 90 дней, от 7 дней до 45 дней, от 7 дней до 30 дней, от 7 дней до 14 дней, от 14 дней до 90 дней, от 14 дней до 45 дней, от 14 дней до 30 дней, от 21 дня до 90 дней, от 21 дня до 60 дней, от 21 дня до 45 дней, от 21 дня до 30 дней, от 30 дней до 90 дней, от 30 дней до 60 дней, от 30 дней до 45 дней, от 45 до 180 дней, от 45 до 120 дней, от 45 до 100 дней, от 45 до 90 дней, от 45 до 60 дней, от 60 до 180 дней, от 60 до 120 дней, от 60 до 100 дней, от 60 до 90 дней, от 90 до 100 дней, от 90 до 120 дней или от 90 до 180 дней) после первой дозы фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления третью дозу вводят через по меньшей мере

один час (например, по меньшей мере через два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть часов, семь часов, восемь часов, девять часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев, один год или дольше) после второй дозы фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления третью дозу вводят в период от 1 часа до 1 года (например, от 1 часа до 1 дня, например, один час, два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть часов, семь часов, восемь часов, девять часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа или один день, например, от одного дня до одной недели, например, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней или одна неделя, например, от одной недели до одного месяца, например, две недели, три недели или один месяц, например, от одного месяца до одного года, например, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев или один год) после второй дозы фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления третью дозу вводят в период от 1 дня до 180 дней (например, от 1 дня до 90 дней, от 1 дня до 45 дней, от одного дня до 30 дней, от 1 дня до 14 дней, от 1 дня до 7 дней, от 2 дней до 45 дней, от 2 дней до 30 дней, от 2 дней до 14 дней, от 2 дней до 7 дней, от 3 дней до 90 дней, от 3 дней до 45 дней, от 3 дней до 30 дней, от 3 дней до 14 дней, от 3 дней до 7 дней, от 4 дней до 90 дней, от 4 дней до 45 дней, от 4 дней до 30 дней, от 4 дней до 14 дней, от 4 дней до 7 дней, от 5 дней до 90 дней, от 5 дней до 45 дней, от 5 дней до 30 дней, от 5 дней до 14 дней, от 5 дней до 7 дней, от 6 дней до 90 дней, от 6 дней до 45 дней, от 6 дней до 30 дней, от 6 дней до 14 дней, от 6 дней до 7 дней, от 7 дней до 90 дней, от 7 дней до 45 дней, от 7 дней до 30 дней, от 7 дней до 14 дней, от 14 дней до 90 дней, от 14 дней до 45 дней, от 14 дней до 30 дней, от 21 дня до 90 дней, от 21 дня до 60 дней, от 21 дня до 45 дней, от 21 дня до 30 дней, от 30 дней до 90 дней, от 30 дней до 60 дней, от 30 дней до 45 дней, от 45 до 180 дней, от 45 до 120 дней, от 45 до 100 дней, от 45 до 90 дней, от 45 до 60 дней, от 60 до 180 дней, от 60 до 120 дней, от 60 до 100 дней, от 60 до 90 дней, от 90 до 100 дней, от 90 до 120 дней или от 90 до 180 дней) после второй дозы фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления вторую дозу вводят до того, как концентрация антифузогенного полипептида в сыворотке крови субъекта становится менее приблизительно 500 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает поддержание концентрации в сыворотке крови, составляющей по меньшей мере 500 нг/мл (например, по меньшей мере 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл, 1000 нг/мл, 1100 нг/мл, 1200 нг/мл, 1300 нг/мл, 1400 нг/мл, 1500 нг/мл, 1600 нг/мл, 1700 нг/мл, 1800 нг/мл, 1900 нг/мл, 2000 нг/мл, 2100 нг/ мл, 2200 нг/мл, 2300 нг/мл, 2400 нг/мл, 2500 нг/мл, 2600 нг/мл, 2700

нг/мл, 2800 нг/мл, 2900 нг/мл, 3000 нг/мл или более), антифузогенного полипептида у субъекта, например, в течение по меньшей мере одного часа (например, по меньшей мере двух часов, трех часов, четырех часов, пяти часов, шести часов, семи часов, восьми часов, девяти 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, 23 часов, один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев, один год или дольше).

Способ введения нескольких доз композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе (например, кольцевого полирибонуклеотида), включает обеспечение двух или более композиций в течение определенного периода времени по отношению к клетке, ткани или субъекту (например, млекопитающему). Согласно определенным вариантам осуществления, несколько доз композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида, кольцевого полидезоксирибонуклеотида, линейного полидезоксирибонуклеотида) (например, в фармацевтической или ветеринарной композиции). Используемый в данном документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, вводят субъекту в разный момент времени, например, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы, которые включают последовательное введение субъекту одной начальной дозы композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, с последующим введением одной или нескольких вторичных доз композиции и необязательно с последующим введением одной или нескольких третичных доз композиции.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения, "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы, а "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все из начальной, вторичной и третичной доз могут содержать одинаковое количество композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, а в некоторых вариантах осуществления они могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. В определенных вариантах осуществления количество композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, содержащееся в начальной,

вторичной и/или третичной дозах, варьирует друг относительно друга (например, скорректировано в большую или меньшую сторону по мере необходимости) в ходе курса лечения. В определенных вариантах осуществления одну или несколько доз (например, 2, 3, 4 или 5) вводят в начале режима лечения в качестве "нагрузочных доз" с последующим введением последующих доз, которые вводят не так часто (например, "поддерживающих доз").

В определенных вариантах осуществления каждую вторичную и/или третичную дозу вводят после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, в последовательности нескольких введений означает дозу композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, которую вводят субъекту перед введением непосредственно следующей дозы в последовательности без промежуточных доз. В определенных вариантах осуществления каждую вторичную и/или третичную дозу вводят каждый день, каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней после непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления каждую вторичную и/или третичную дозу вводят каждые 0,5 недели, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели после непосредственно предшествующей дозы.

Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения могут включать введение субъекту любого количества вторичных и/или третичных доз композиции на основе молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Например, в определенных вариантах осуществления субъекту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления субъекту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом в определенных вариантах осуществления субъекту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления субъекту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В определенных вариантах осуществления частота, с которой субъекту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьировать в ходе режима лечения. Частоту введения также можно корректировать во время курса лечения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение (например, введение) по меньшей мере первой композиции и второй композиции по отношению к клеткам, ткани или субъекту (например, млекопитающему, например, человеку). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает доставку (например, введение) третьей композиции, четвертой композиции, пятой композиции, шестой композиции, седьмой композиции, восьмой композиции, девятой композиции, десятой композиции или больше. В некоторых вариантах осуществления дополнительные композиции обеспечивают на протяжении всей жизни клетки. В некоторых вариантах осуществления дополнительные композиции обеспечивают (например, вводят) до тех пор, пока клетка, ткань или субъект получают положительный результат от композиции.

В некоторых вариантах осуществления первая композиция в режиме введения

(например, кольцевого полирибонуклеотида) первой композиции. Например, первая композиция содержит 1-кратное количество молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), вторая композиция содержит 5-кратное количество молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида) по сравнению с первой композицией, а третья композиция содержит 0,2-кратное количество молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида) по сравнению с первой композицией. В некоторых вариантах осуществления вторая композиция содержит по меньшей мере 5-кратное количество молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида) по сравнению с количеством молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида) первой композиции.

В некоторых вариантах осуществления первая композиция содержит большее количество молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), чем вторая композиция. В некоторых вариантах осуществления первая композиция содержит большее количество молекул нуклеиновой кислоты (например, кольцевых полирибонуклеотидов), чем третья, четвертая, пятая, шестая, седьмая, восьмая, девятая или десятая композиция.

В некоторых вариантах осуществления множество (например, две или более) композиций на основе молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), кодирующей антифузогенный полипептид, которые вводят в режиме введения нескольких доз, как описано в данном документе, являются одними и теми же композициями. В некоторых вариантах осуществления множество (например, две или более) композиций на основе молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), кодирующей антифузогенный полипептид, которые вводят в режиме введения нескольких доз, как описано в данном документе, являются различными композициями. В некоторых вариантах осуществления одни и те же композиции содержат молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевые полирибонуклеотиды), кодирующие один и тот же антифузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления разные композиции содержат молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевые полирибонуклеотиды), кодирующие разные антифузогенные полипептиды, или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления в режиме введения нескольких доз способ введения молекулы нуклеиновой кислоты (например, кольцевого полирибонуклеотида), представленной в данном документе, включает введение нуждающемуся в этом субъекту молекулы нуклеиновой кислоты несколько раз (нескольких доз), например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 150, 200 или 500 раз с интервалом, составляющим от 1 дня до 56 дней, таким как приблизительно 49 дней, 42 дня, 35 дней, 28 дней, 21 день, 14 дней или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления в режиме введения нескольких доз способ, представленный в данном документе, включает введение молекулы нуклеиновой кислоты нуждающемуся в этом субъекту по меньшей мере 3 раза с

интервалом, составляющим приблизительно 7 дней. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, который получает введение нескольких доз молекулы нуклеиновой кислоты (например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 доз), представленной в данном документе, уровень антифузогенного полипептида (например, антифузогенного полипептида в плазме крови) поддерживается на уровне с варьированием менее 50%, 40%, 30%, 20% или 10% в течение периода более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18 или 20 недель после последней дозы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, который получает введение нескольких доз молекулы нуклеиновой кислоты (например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 доз), представленной в данном документе, уровень антифузогенного полипептида (например, уровень антифузогенного полипептида в плазме крови) поддерживается на первом уровне в течение периода более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19 или 20 недель после второй, третьей, четвертой, пятой, шестой, седьмой, восьмой или последней дозы, при этом первый уровень превышает уровень антифузогенного полипептида, измеренный вскоре после первой дозы (например, измеренный через приблизительно 12, 24, 36 или 48 часов после первой дозы). В некоторых вариантах осуществления у субъекта, который получает введение нескольких доз молекулы нуклеиновой кислоты (например, по меньшей мере 3 доз), представленной в данном документе, с интервалом, составляющим приблизительно 7 дней, уровень антифузогенного полипептида (например, уровень антифузогенного полипептида в плазме крови) поддерживается на первом уровне в течение периода более 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 недель после второй, третьей, четвертой, пятой, шестой, седьмой, восьмой или последней дозы, при этом первый уровень превышает уровень антифузогенного полипептида, измеренный вскоре после первой дозы (например, измеренный через приблизительно 12, 24, 36 или 48 часов после первой дозы).

Способы доставки

Кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1), 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 без ковалентной модификации, который связывается с компонентом, способствующим доставке в клетку, может представлять собой полирибонуклеотид, который 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-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 HCl), дигептадециламидоглицилспермидина (DOGS), бромида N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромида N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопroteина низкой плотности (LDL), липопroteина высокой плотности (HDL) или глобулина.

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 солубилизации РНК, буфер или изотоническое средство. Примеры средства для солубилизации РНК включают воду, этанол, метанол, ацетон, формамид и 2-пропанол. Примеры буфера включают 2-(N-морфолино)этансульфовую кислоту (MES), бис-Tris, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)-(карбоксиметил)амино]уксусную кислоту (ADA), N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфовую кислоту (ACES), пиперазин-N, N'-бис(2-этансульфовая кислота) (PIPES), 2-[[1,3-дигидрокси-2-(гидроксиметил)пропан-2-ил]амино]этансульфовую кислоту (TES), 3-(N-морфолино)пропансульфовую кислоту (MOPS), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфовую 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 гидроксипропилцеллюлозы. 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, интратрахеально, 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 кольцевой полирибонуклеотид, описанный 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 кольцевой полирибонуклеотид составлен в виде фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, адъювант или их комбинацию. В конкретном варианте осуществления композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и носитель или разбавитель, не содержащий какого-либо носителя. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид с разбавителем, не содержащим какого-либо носителя, применяется для доставки в "голом" виде 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 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 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 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 односторонним 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 односторонним разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества совокупных молекул полирибонуклеотидов с односторонним 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 односторонним 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 протамин или соль протамина (например, сульфат протамина).

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, 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; гистиридиновый 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 включать 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-этандиольных) 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 композиция по настоящему изобретению содержит кольцевой полирибонуклеотид и разбавитель. В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению содержит линейный полирибонуклеотид и разбавитель.

Разбавитель может представлять собой вспомогательное вещество, отличное от носителя. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, служит в качестве среды-носителя или среды для композиции, такой как композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида, описанная в данном документе. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, служит в качестве среды-носителя или среды для композиции, такой как композиция на основе линейного полирибонуклеотида, описанная в данном документе. Неограничивающие примеры вспомогательного вещества, отличного от носителя, включают растворители, водные растворители, неводные растворители, дисперсионные среды, разбавители, дисперсии, суспендирующие средства, поверхностно-активные средства, изотонические средства, загустители, эмульгаторы, консерванты, полимеры, пептиды, белки, клетки, гиалуронидазы, диспергирующие средства, гранулирующие средства, средства для улучшения распадаемости, связывающие средства, буферные средства (например, фосфатно-солевой буфер (PBS)), смазывающие средства, масла и их смеси. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой любой из неактивных ингредиентов, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством продуктов и лекарственных средств (FDA) Соединенных Штатов Америки и перечисленных в Базе данных неактивных ингредиентов, который не демонстрирует эффекта 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 фосфотиоата, фосфоселенатов, боранофосфатов, боранофосфатных сложных эфиров, гидрофосфонатов, фосфорамидатов, фосфодиамидатов, 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-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 3 β -[N(N\N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HCl), дигептадециламидоглицилспермидина (DOGS), бромида N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромида N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопротейна низкой плотности (LDL), липопротейна 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)этансульфовую кислоту (MES), бис-Tris, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)-(карбоксиметил)амино]уксусную кислоту (ADA), N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфовую кислоту (ACES), пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфовая кислота) (PIPES), 2-[[1,3-дигидрокси-2-(гидроксиметил)пропан-2-ил]амино]этансульфовую кислоту (TES), 3-(N-морфолино)пропансульфовую кислоту (MOPS), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфовую кислоту (HEPES), Tris, трицин, Gly-Gly, бидин или фосфат. Примеры изотонического средства включают глицерин, маннит, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, трегалозу или сахарозу.

Носители

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

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

В других вариантах осуществления композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в клетке, везикуле или другом носителе на основе мембран, или такой кольцевой полирибонуклеотид обеспечивается с их помощью. В других вариантах осуществления композиция содержит линейный полирибонуклеотид в клетке, везикуле или другом носителе на основе мембран, или такой линейный полирибонуклеотид обеспечивается с их помощью. В одном варианте осуществления композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в липосомах или других сходных везикулах. В одном варианте осуществления композиция содержит линейный 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) (см., например, для обзора Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, том 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 использованием гомогенизатора, соникатора или экструзионного аппарата (обзор см., например, в Spuch and Navarro, *Journal of Drug Delivery*, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679). Экструдированные липиды можно получать посредством экструзии через фильтры с уменьшающимся размером пор, как описано в работе Templeton et al., *Nature Biotech*, 15:647-652, 1997, идеи которой, относящиеся к получению экструдированных липидов, включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению содержит кольцевой полирибонуклеотид и липидные наночастицы, например липидные наночастицы, описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению содержит линейный полирибонуклеотид и липидные наночастицы. Липидные наночастицы представляют собой другой пример носителя, который обеспечивает биосовместимую и биоразлагаемую систему доставки для молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Липидные наночастицы представляют собой другой пример носителя, который обеспечивает биосовместимую и биоразлагаемую систему доставки для молекулы линейного полирибонуклеотида, 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 работе Li et al. 2017, *Nanomaterials* 7, 122; doi:10.3390/nano7060122.

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

Экзосомы также могут применяться в качестве сред-носителей для доставки лекарственных средств для композиции или препарата на основе кольцевой РНК, описанных в данном документе. Экзосомы могут применять в качестве сред-носителей для доставки лекарственных средств для композиции или препарата на основе полирибонуклеотида, 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; 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. Дифференцированные *ex vivo* эритроциты также можно применять в качестве носителя для композиции или препарата на основе линейного полирибонуклеотида, 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. Композиции на основе фузосом, например, описанные в WO2018/208728, также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы линейного полирибонуклеотида, описанной в данном документе.

Виросомы и вирусоподобные частицы (VLP) также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе, к целевым клеткам. Виросомы и вирусоподобные частицы (VLP) также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы линейного 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. Нановезикулы растений и пакеты-мессенджеры растений (PMP) также могут применяться в качестве носителей для доставки композиции или препарата на основе линейного полирибонуклеотида, описанных в данном документе.

Микропузырьки также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Микропузырьки также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы линейного 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 из WO2019051289 (включенного посредством ссылки), а также комбинаций вышеперечисленного.

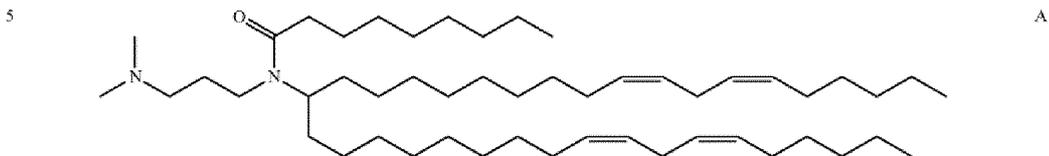
В некоторых вариантах осуществления стерина, которые могут быть включены в

липидные наночастицы, включают одно или несколько из холестерина или производных холестерина, например, таких, как в документах WO2009/127060 или US2010/0130588, которые включены посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные стеринны включают фитостеринны, в том числе описанные в работе Eygeris et al. (2020), [dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386), включенной в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит ионизируемый 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.

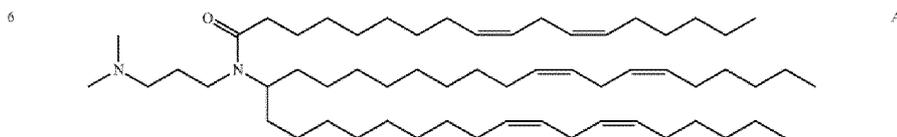
В некоторых вариантах осуществления изобретения отношение липидов к нуклеиновой кислоте (отношение масса/масса; отношение вес/вес) может находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от приблизительно 10:1 до приблизительно 14:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от 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 общем, 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



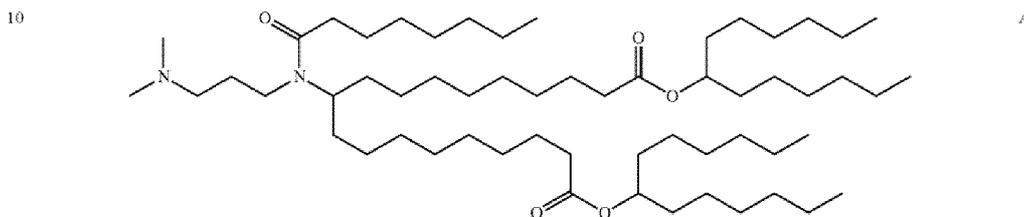
(i).

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.



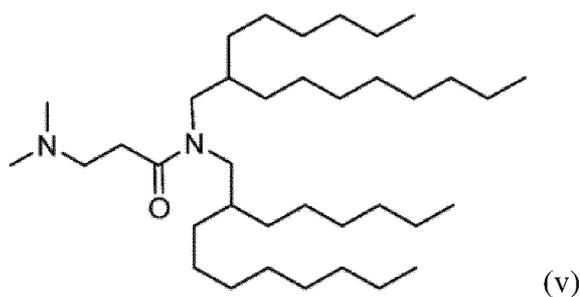
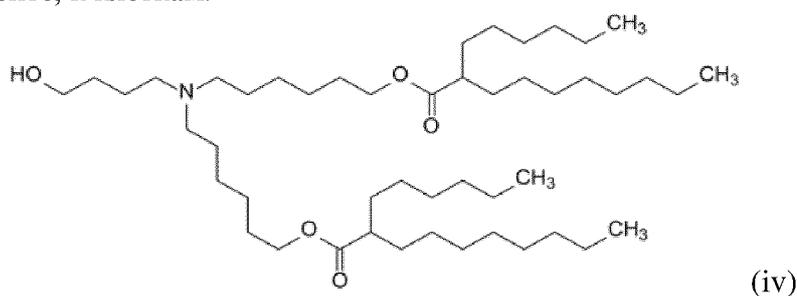
(ii)

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.



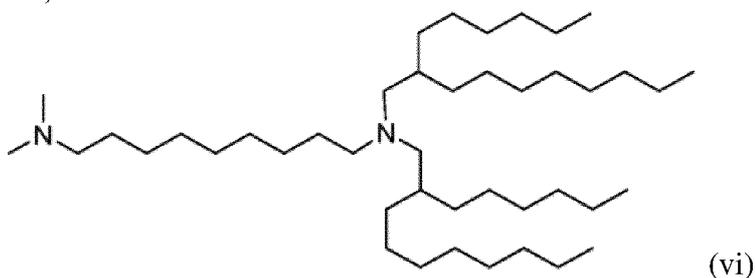
(iii)

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.

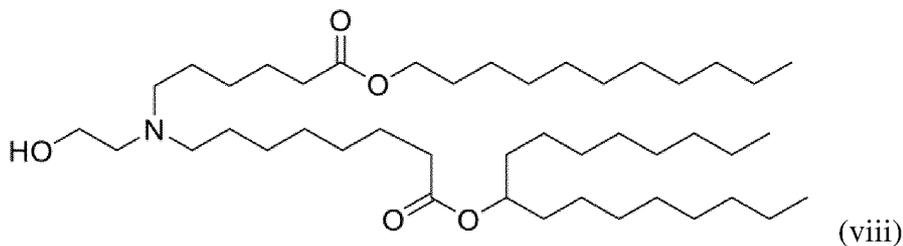
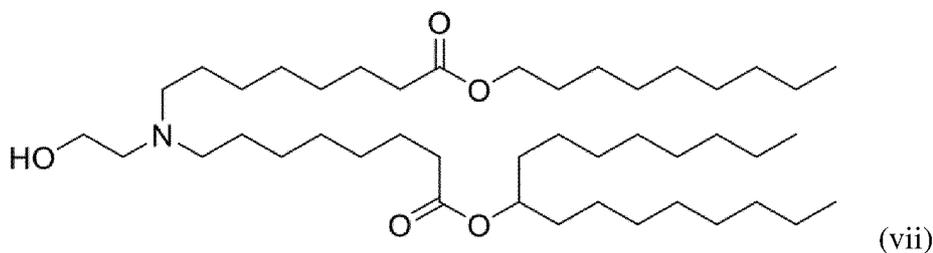


В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (v),

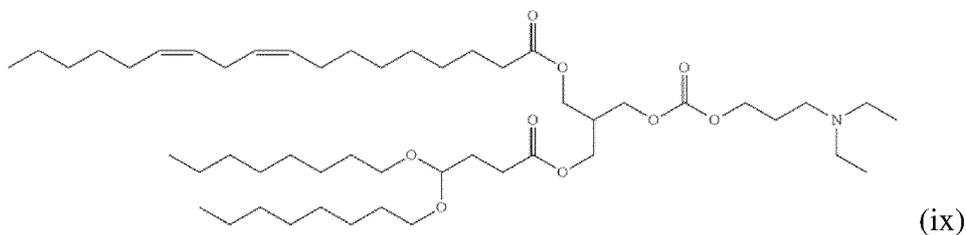
применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



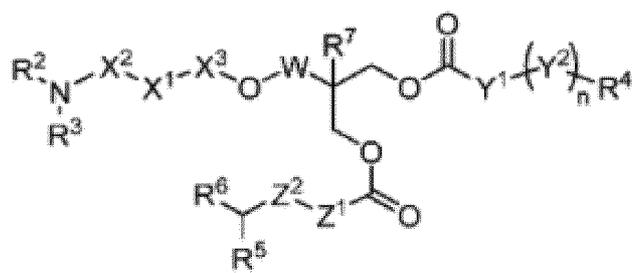
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (vi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



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.



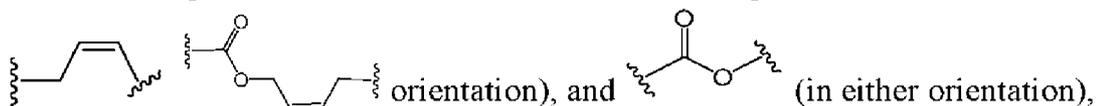
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (ix), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



(x),

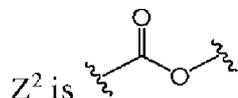
где

X^1 представляет собой O, NR^1 или прямую связь, X^2 представляет собой C2-алкилен, X^3 представляет собой C(=O) или прямую связь, R^1 представляет собой H или Me, R^3 представляет собой C1-алкил, R^2 представляет собой C1-алкил, 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



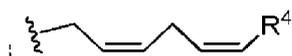
(в любой ориентации), (в любой ориентации), (в любой ориентации),

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



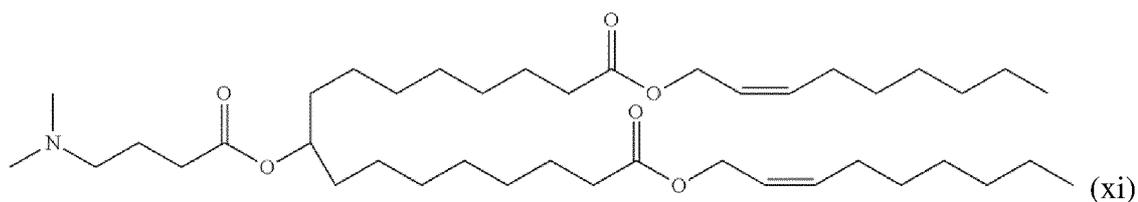
(в любой ориентации) или отсутствует, при условии, что если Z^1 представляет собой прямую связь, то Z^2 отсутствует;

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

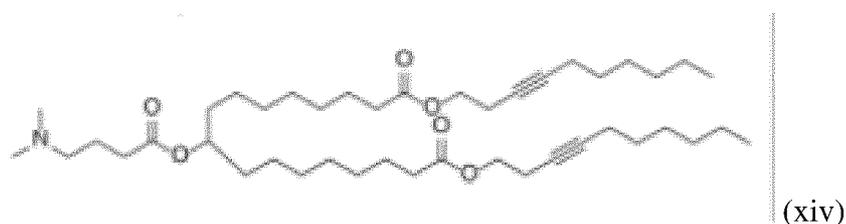
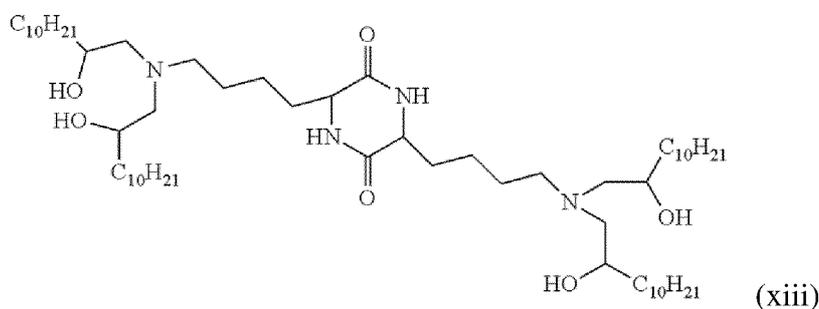
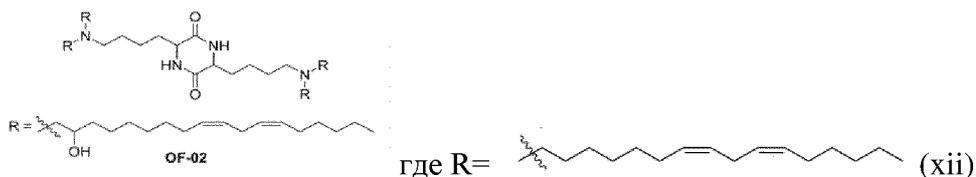


, R^4 представляет собой линейный C5-алкил, Z^1 представляет собой C2-алкилен, Z^2 отсутствует, W представляет собой метилен, и R^7 представляет собой H, то R^5 и R^6 не представляют собой C x -алкокси.

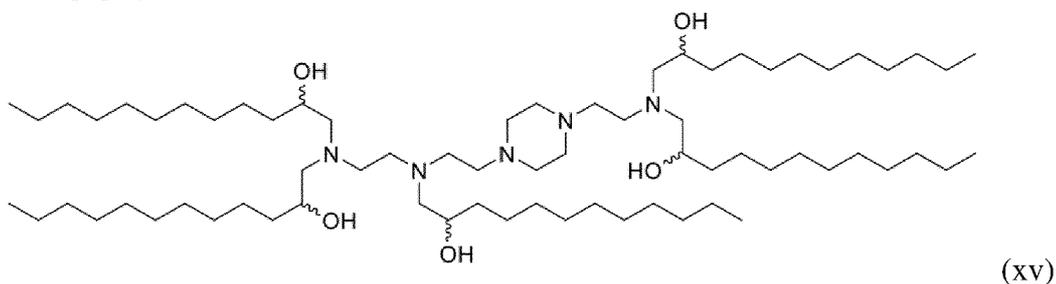
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



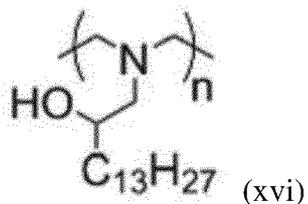
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



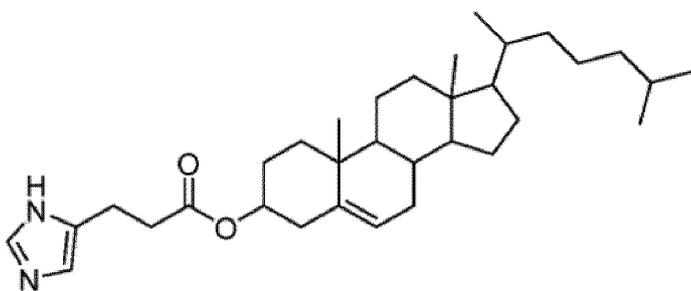
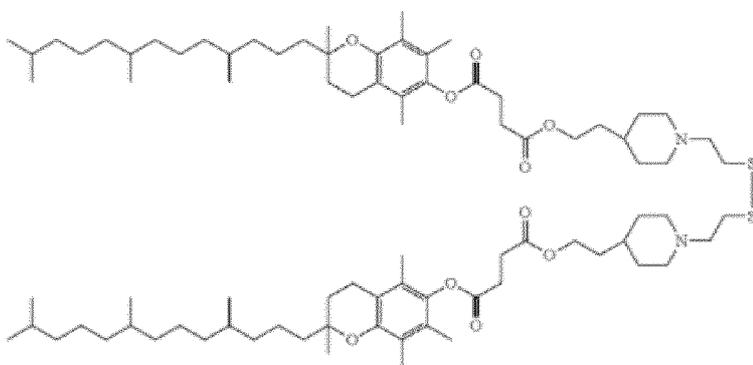
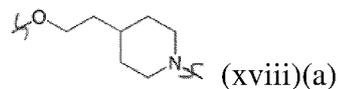
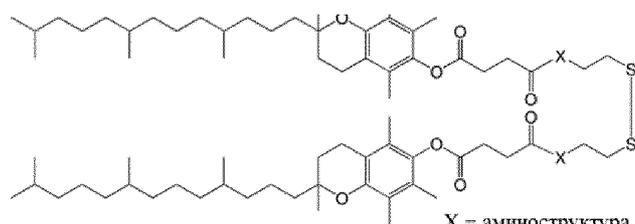
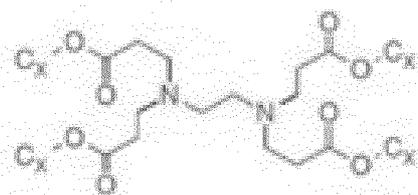
В некоторых вариантах осуществления LNP содержит соединение формулы (xiii) и соединение формулы (xiv).



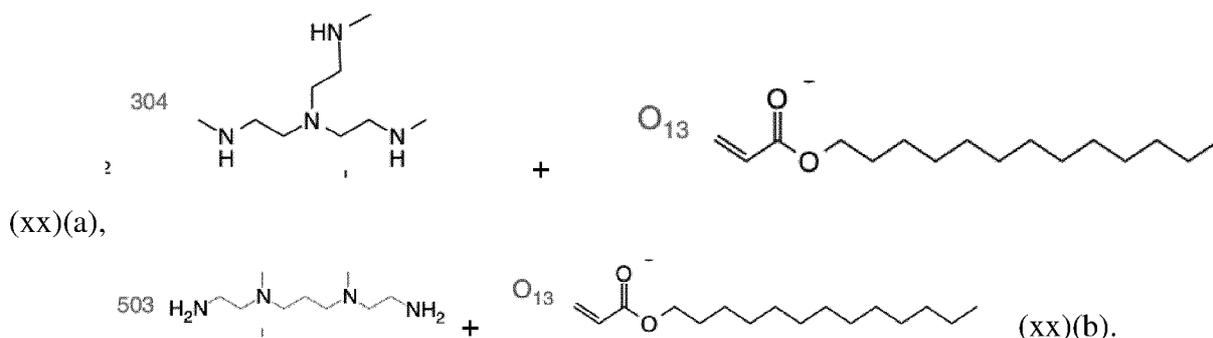
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xv), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.

Сердцевина PEI₆₀₀

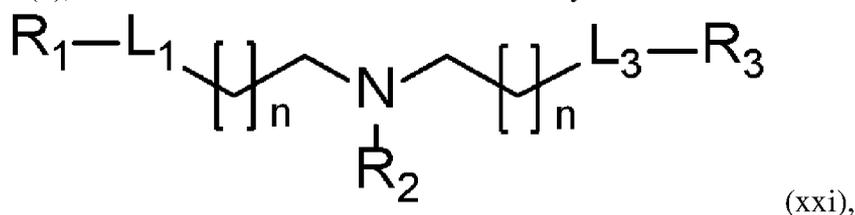
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xvi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



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 с помощью 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 документе WO2021113777 (например, липид формулы (1), такой как липид из таблицы 1 в документе WO 2021113777).

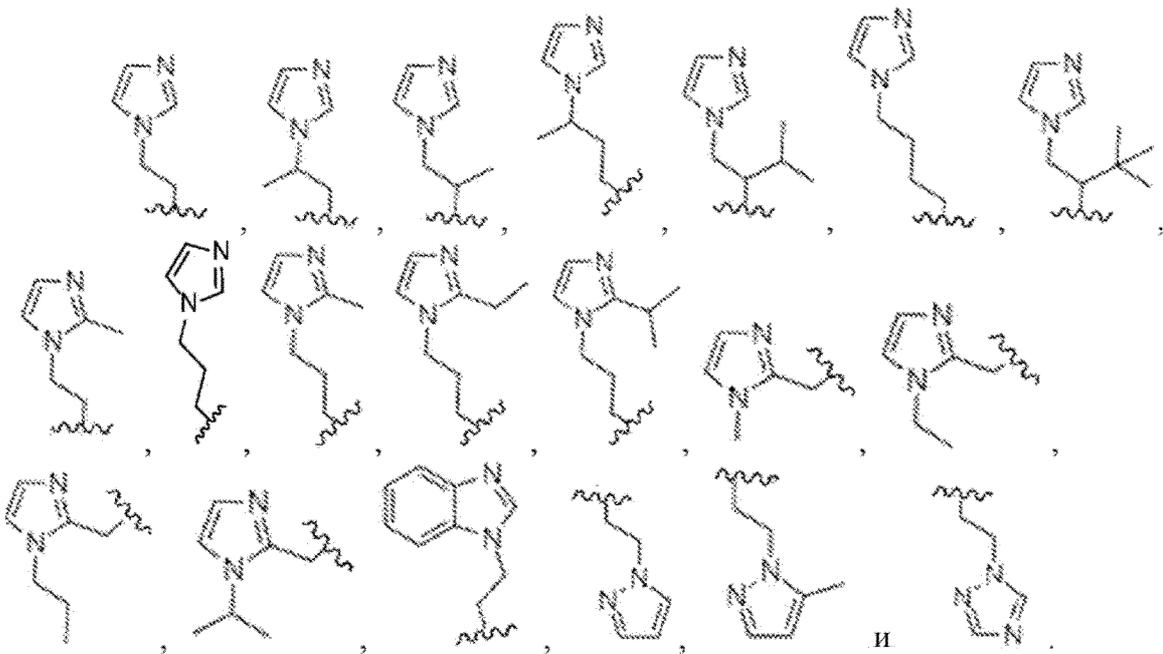


где

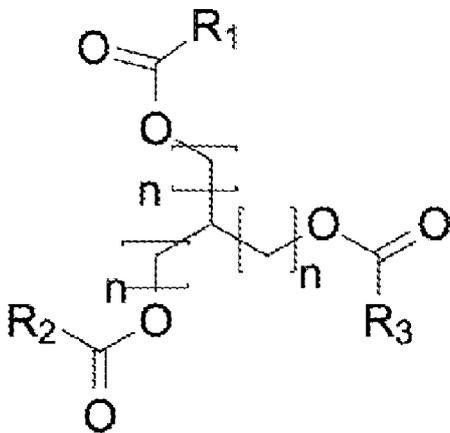
каждый n независимо представляет собой целое число от 2 до 15; каждый из L_1 и L_3 независимо представляют собой $-OC(O)-^*$ или $-C(O)O-^*$, где "*" указывает точку присоединения к R_1 или R_3 ;

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, гидроксид, циано, алкила, алкенила, альдегида, гетероциклического алкила, гидроксиалкила, дигидроксиалкила, гидроксиалкиламиноалкила, аминоалкила, алкиламиноалкила, диалкиламиноалкила, (гетероциклический)алкиламиноалкила, гетероциклического алкила, гетероарила, алкилгетероарила, алкинила, алкокси, амино, диалкиламино, аминоалкилкарбониламино, аминокарбонилалкиламино, (аминокарбонилалкил)алкиламино, алкенилкарбониламино, гидроксикарбонила, алкилоксикарбонила, аминокарбонила, аминоалкиламинокарбонила, алкиламиноалкиламинокарбонила, диалкиламиноалкиламинокарбонила, гетероциклического алкиламинокарбонила, (алкиламиноалкил)алкиламинокарбонила, алкиламиноалкилкарбонила, диалкиламиноалкилкарбонила, гетероциклического алкилкарбонила, 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 документе WO2021113777 (например, липид формулы (2), такой как липид из таблицы 2 в документе WO 2021113777).

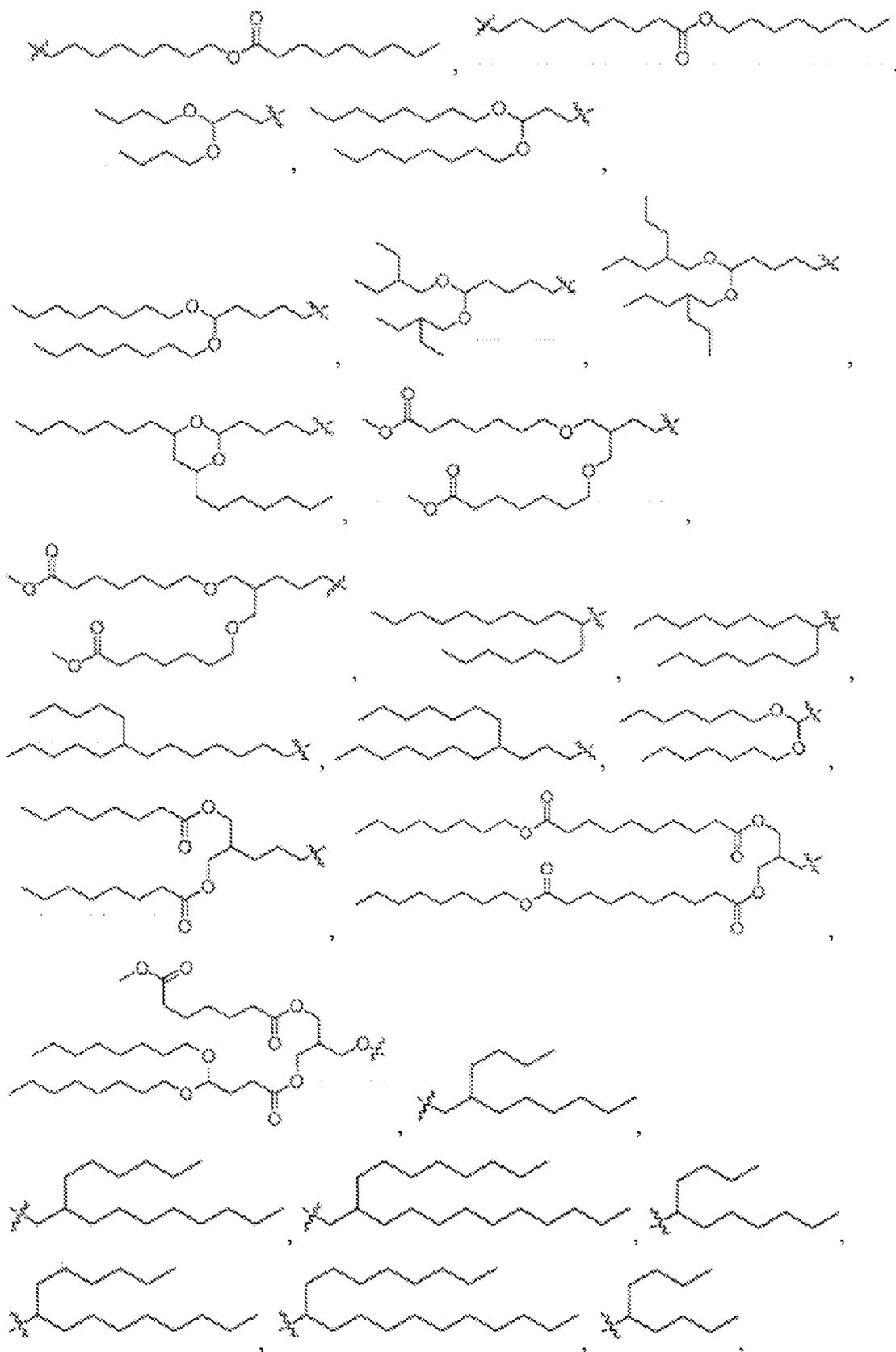


(xxii),

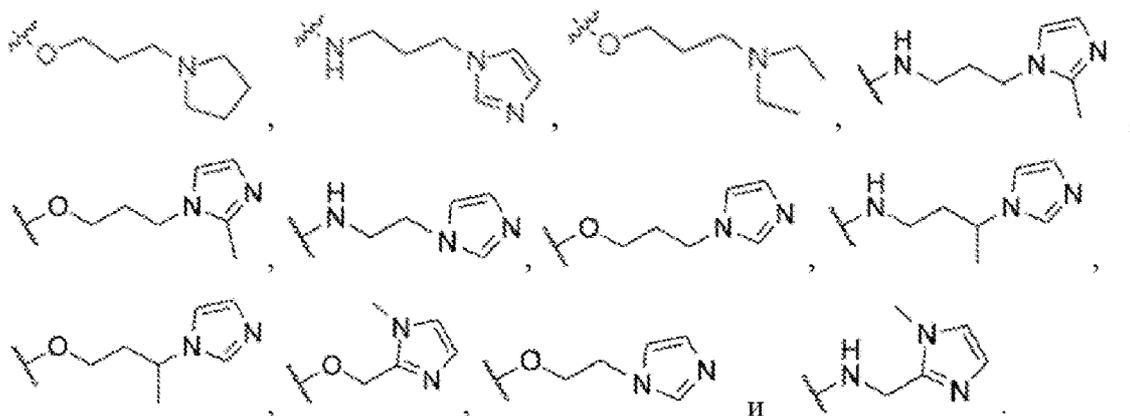
где

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

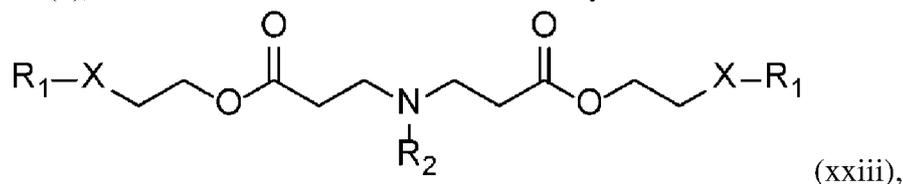
Каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из



R₃ выбран из группы, состоящей из



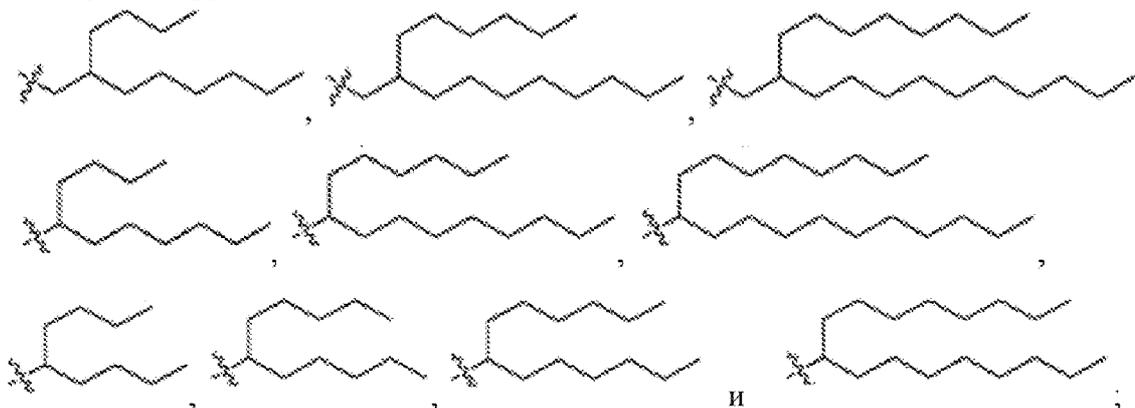
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxiii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxiii) представляет собой LNP, описанную в документе WO2021113777 (например, липид формулы (3), такой как липид из таблицы 3 в документе WO 2021113777).



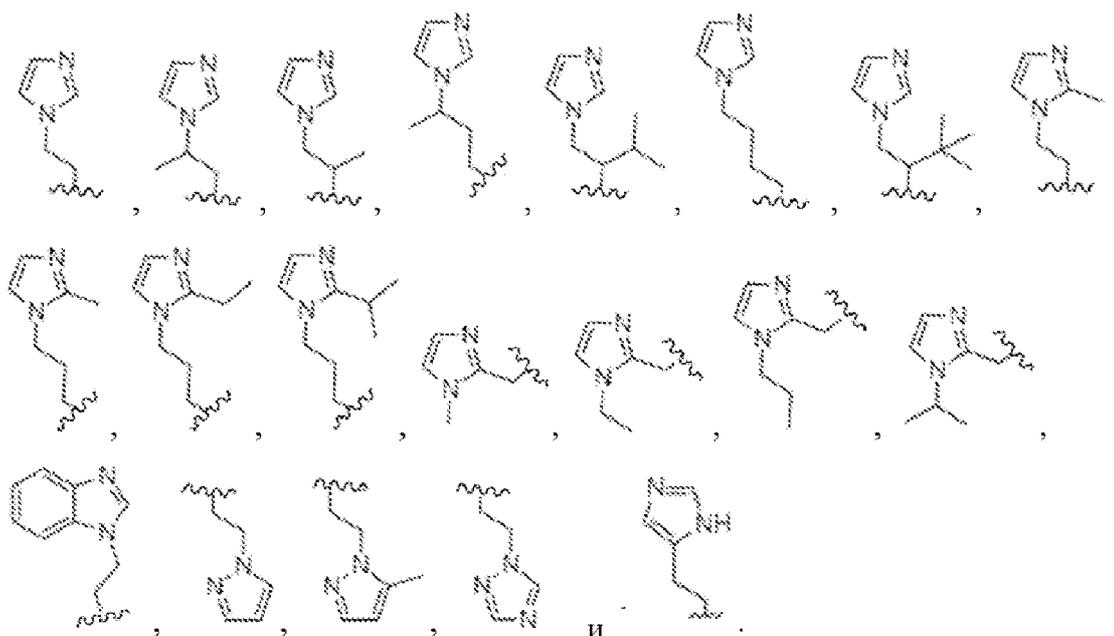
где

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)пропилоктадека-9,12-диеноат (LP01), например, синтезированный в примере 13 из документа WO2015/095340 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)-9-(((4-диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L319), например, синтезированный в примерах 7, 8 или 9 документа US2012/0027803 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления 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 аминокислотосодержащий 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 аминокислотных групп, которые несут положительный заряд. В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит катионный липид в составе с одним или несколькими нейтральными липидами, ионизируемыми аминокислотосодержащими 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 документа US2016/0311759; I из документа US20150376115 или из документа US2016/0376224; I, II или III из документа US20160151284; I, IA, II или IIA из документа US20170210967; I-с из документа US20150140070; A из документа US2013/0178541; I из документа US2013/0303587 или документа US2013/0123338; I из документа US2015/0141678; II, III, IV или V из документа US2015/0239926; I из документа US2017/0119904; I или II из документа WO2017/117528; A из документа US2012/0149894; A из документа US2015/0057373; A из документа WO2013/116126; A из документа US2013/0090372; A из документа US2013/0274523; A из документа US2013/0274504; A из документа US2013/0053572; A из документа WO2013/016058; A из документа WO2012/162210; I из документа US2008/042973; I, II, III или IV из документа US2012/01287670; I или II из документа US2014/0200257; I, II или III из документа US2015/0203446; I или III из документа US2015/0005363; I, IA, IB, IC, ID, II, IIA, IIB, IIC, IID или III-XXIV из документа US2014/0308304; из документа US2013/0338210; I, II, III или IV из документа WO2009/132131; A из документа US2012/01011478; I или XXXV из документа US2012/0027796; XIV или XVII из документа US2012/0058144; из документа US2013/0323269; I из документа US2011/0117125; I, II или III из документа US2011/0256175; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII из документа US2012/0202871; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV или XVI из документа US2011/0076335; I или II из документа US2006/008378; I из документа US2013/0123338; I или X-A-Y-Z из документа US2015/0064242; XVI, XVII или XVIII из документа US2013/0022649; I, II или III из документа US2013/0116307; I, II или III из документа US2013/0116307; I или II из документа US2010/0062967; I-X из документа US2013/0189351; I из документа US2014/0039032; V из документа US2018/0028664; I из документа US2016/0317458; I из документа US2013/0195920; 5, 6 или 10 из документа US10221127; III-3 из документа WO2018/081480; I-5 или I-8 из документа WO2020/081938; 18 или 25 из документа US9867888; A из документа US2019/0136231; II из документа WO2020/219876; 1 из документа US2012/0027803; OF-02 из документа US2019/0240349; 23 из документа US10086013; сКК-E12/A6 из публикации Miao et al. (2020); C12-200 из документа WO2010/053572; 7C1 из публикации Dahlman et al. (2017); 304-O13 или 503-O13 из публикации Whitehead et al.; TS-P4C2 из документа US9708628; I из документа WO2020/106946; I из документа WO2020/106946 и (1), (2), (3), или (4) из документа WO2021/113777. Иллюстративные липиды дополнительно предусматривают липид, указанный в любой из таблиц 1-16 из документа WO2021/113777.

В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой MC3 (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (DLin-MC3-DMA или MC3), например, описанный в примере 9 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет

собой липид АТХ-002, например, описанный в примере 10 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой (13Z,16Z)-А,А-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин (соединение 32), например, описанное в примере 11 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение 6 или соединение 22, например, описанные в примере 12 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Иллюстративные некатيونные липиды включают без ограничения дистеароил-sn-глицерофосфоэтаноламин, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), 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 липиды растений, которые, как было обнаружено, обеспечивают улучшение трансфекции с использованием мРНК в печени (например, DGTS).

Другие примеры некатюнных липидов, пригодных для применения в липидных

наночастицах, включают без ограничения липиды, не содержащие фосфор, такие как, например, стеариламин, додециламин, гексадециламин, ацетилпальмитат, глицеринрицинолеат, гексадецилстеарат, 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 отношение ионизируемых липидов к нейтральным липидам 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.

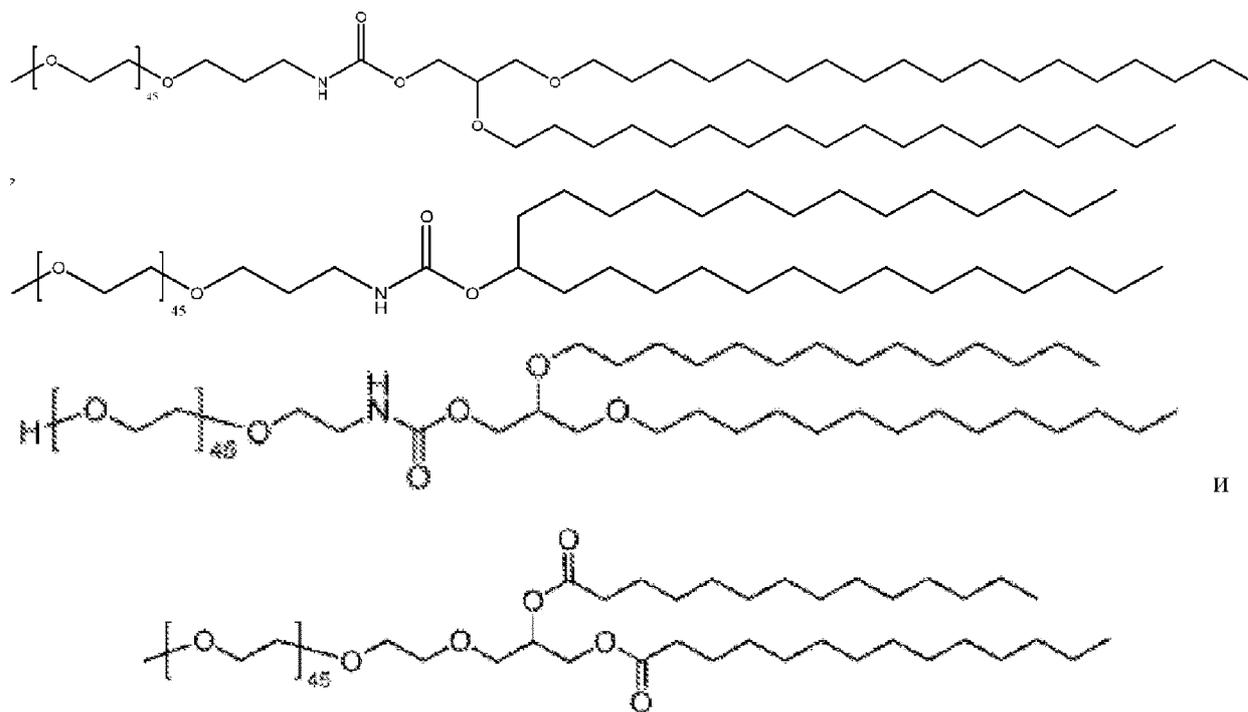
В некоторых аспектах липидная наночастица может дополнительно содержать компонент, такой как стерин, для обеспечения целостности мембраны. Одним иллюстративным стеринном, который можно применять в липидной наночастице, является холестерин и его производные. Неограничивающие примеры производных холестерина включают полярные аналоги, такие как 5 α -холестанол, 5 β -копростанол, холестерил(2'-гидрокси)этиловый эфир, холестерил-(4'-гидрокси)-бутиловый эфир и 6-кетохолестанол; неполярные аналоги, такие как 5 α -холестан, холестенон, 5 α -холестанон, 5 β -холестанон и холестерилдеканоат и их смеси. В некоторых вариантах осуществления производное холестерина представляет собой полярный аналог, например, холестерил(4'-гидрокси)бутиловый эфир. Иллюстративные производные холестерина описаны в публикации согласно PCT WO2009/127060 и публикации заявки на патент США US2010/0130588, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во 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 (метоксиполиэтиленгликоль)-конъюгированный липид.

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-фосфоэтаноламина или их смесь. Дополнительные иллюстративные конъюгаты PEG-липид описаны, например, в US5885613, US6287591, 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-1, III-a-2, III-b-1, III-b-2 или V из документа US2018/0028664, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы II из документов US20150376115 или US2016/0376224, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил, PEG-димиристилоксипропил, PEG-дипальмитилоксипропил или PEG-дистеарилоксипропил. PEG-липид может представлять собой один или несколько из PEG-DMG, PEG-дилаурилглицерина, PEG-дипальмитоилглицерина, PEG-дистерилглицерина, PEG-дилаурилгликамида, PEG-димиристилгликамида, PEG-дипальмитоилгликамида, PEG-дистерилгликамида, PEG-холестерин-(1-[8'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диоксоктанил]карбамоил-[омега]-метилполи(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:



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, неcatiонного 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% неcatiонного 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% неcatiонного 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% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, и 1-10% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции. Композиция может содержать 60-70% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 25-35% холестерина по молям или от общего веса композиции и 5-10% некатионного липида по молям или от общего веса композиции. Композиция может также содержать до 90% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции и 2-15% некатионного липида по молям или от общего веса композиции. Состав также может представлять собой состав на основе липидных наночастиц, например, содержащий 8-30% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 5-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции и 0-20% холестерина по молям или от общего веса композиции; 4-25% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 4-25% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, 2-25% холестерина по молям или от общего веса композиции, 10-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 5% холестерина по молям или от общего веса композиции; или 2-30% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 2-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, 1-15% холестерина по молям или от общего веса композиции, 2-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 1-20% холестерина по молям или от общего веса композиции, или даже 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, составляющем 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 до нескольких 100 нм, например, как измерено с помощью динамического светорассеяния (DLS). В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 40 нм до приблизительно 150 нм, например приблизительно 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм. В некоторых вариантах осуществления 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 до приблизительно 100 нм, от приблизительно 80 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 мкм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 200 мкм, от приблизительно 10 мкм до приблизительно 100 мкм, от приблизительно 20 мкм до приблизительно 80 мкм, от приблизительно 25 мкм до приблизительно 60 мкм, от приблизительно 30 мкм до приблизительно 55 мкм, от приблизительно 35 мкм до приблизительно 50 мкм или от приблизительно 38 мкм до приблизительно 42 мкм.

В некоторых случаях LNP может быть относительно однородной. Индекс полидисперсности может применяться для указания однородности LNP, например, распределения липидных наночастиц по размерам. Небольшой (например, менее 0,3) индекс полидисперсности обычно указывает на узкое распределение частиц по размерам. LNP может характеризоваться индексом полидисперсности 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 в LNP или иным образом ассоциировано с ней после получения, относительно предоставленного исходного количества. Требуется, чтобы эффективность инкапсуляции была высокой (например, близкой к 100%). Эффективность инкапсуляции можно измерить, например, путем сравнения количества белка или нуклеиновой кислоты в растворе, содержащем липидную наночастицу, до и после разрушения липидной наночастицы с помощью одного или нескольких органических растворителей или детергентов. Анионообменную смолу можно 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 и WO2021/113777, 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, которая включена 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 липофекцию 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 некоторых вариантах осуществления LNP составлены с использованием 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA) или дилинолеилметил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA или MC3), состав и применение которых *in vivo* описаны в работе Jayaraman et al. *Angew Chem*

Int Ed Engl 51(34):8529-8533 (2012), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

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) белка 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. 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 (РНК). В некоторых вариантах осуществления доза антигенной 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.

Наборы

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает набор. В некоторых вариантах осуществления набор содержит (a) кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий антифузогенный полипептид (например, полипептид из таблицы 1), или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, и необязательно (b) информационный материал. 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 приведены для того, чтобы предоставить специалистам средней квалификации в данной области техники описание того, как композиции и способы, описанные в данном документе, могут быть использованы, изготовлены и

оценены, и предназначены исключительно для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением.

Пример 1. Экспрессия антифузогенных полипептидов из РНК в клетках млекопитающих

В данном примере продемонстрирована экспрессия одной или нескольких открытых рамок считывания (ORF), кодирующих один или несколько пептидов ОС43-HR2P и ЕК1, в клетках Huh-7.

В данном примере сконструированы кольцевые РНК, кодирующие один пептид ОС43-HR2P (SEQ ID NO: 289), один пептид ЕК1 (SEQ ID NO: 288), несколько пептидов ОС43-HR2P, несколько пептидов ЕК1 и комбинацию пептидов ОС43-HR2P, аналогов пептидов и пептидов ЕК1. Кольцевые РНК конструируют таким образом, чтобы они включали IRES, сигнал секреции, фуриновый сайт, один или нескольких пептидов ОС43-HR2P, аналогов и/или последовательностей ЕК1 и спейсерный элемент. Кольцевые РНК вводят трансфекцией в клетки Huh-7 с использованием липофектамина MessengerMax (Invitrogen, LMRNA001) в соответствии с инструкциями производителя.

В одном исследовании экспрессию пептидов отслеживают *in vitro* с течением времени.

Пример 2. Подавление слияния клетка-клетка, опосредованного S-белком MERS-CoV

Для определения подавления слияния MERS-CoV с клеткой-мишенью 293Т применяют анализ слияния клетка-клетка, опосредованного S-белком MERS-CoV. В данном примере используют клетки 293Т, которые трансфицированы плазмидой pAAV-IRES-EGFP, кодирующей EGFP (293Т/EGFP), или pAAV-IRES-MERS-EGFP, кодирующей S-белок MERS-CoV и EGFP (293Т/MERS/EGFP), и культивируют в DMEM, содержащей 10% FBS, при 37°C в течение 48 ч. Клетки Huh-7 (5×10^4), экспрессирующие рецептор DPP4 MERS-CoV, полученные в соответствии с примером 1, инкубируют в 96-луночных планшетах при 37°C в течение 5 ч с последующим добавлением 1×10^4 клеток 293Т/EGFP или 293Т/MERS/EGFP соответственно.

После совместного культивирования при 37°C в течение 4 ч клетки 293Т/MERS/EGFP (в качестве отрицательного контроля используют клетки 293Т/EGFP), слитые или неслитые с клетками Huh-7, подсчитывают под инвертированным флуоресцентным микроскопом (Nikon Eclipse Ti-S). Слитую клетку рассматривают как клетку, которая в 2 раза или более раз больше неслитой клетки, а различия в интенсивности флуоресценции слитой клетки сравнивают с интенсивностью флуоресценции неслитой клетки. Процент подавления слияния клетка-клетка можно рассчитать с применением следующей формулы: $(1 - (E - N) / (P - N)) \times 100$. 'E' представляет собой % слияния клетка-клетка в экспериментальной группе. 'P' представляет собой % слияния клетка-клетка в группе положительного контроля, к которой не была добавлена siRNA. 'N' представляет собой % слияния клетка-клетка в группе отрицательного

контроля, в которой клетки 293T/MERS/EGFP заменены на клетки 293T/EGFP. Концентрацию 50% подавления (IC_{50}) можно рассчитать с помощью программного обеспечения CalcuSyn. Совместное культивирование может продолжаться при 37°C в течение 48 ч, а также можно произвести измерения, например, образования синцития. Для измерения противовирусной активности через два дня после инфицирования вирусом можно адаптировать ELISA внутриклеточного S-белка.

Пример 3. Подавление инфицирования псевдотипированными SARS-CoV-2 и MERS-CoV

Псевдовиром SARS или MERS, несущий S-белок SARS-CoV-2 или MERS-CoV соответственно, и дефектный геном HIV-1, который экспрессирует люциферазу в качестве репортера, получают путем совместной трансфекции клеток 293T плазмидой pNL4-3.luc.RE (кодирующей дефектный по Env, экспрессирующий люциферазу HIV-1) и плазмиду pcDNA3.1-MERS-CoV-S. Для выявления подавляющей активности экспрессируемых пептидов при инфицировании псевдовиром SARS или MERS использовали трансфицированные посредством ACE2 клетки 293T (293T/ACE2) и клетки Huh-7 (10^4 на лунку в 96-луночных планшетах), которые были и не были трансфицированы посредством circRNA по настоящему изобретению и соответственно инфицированы псевдовиром SARS или MERS-CoV. После инфицирования культуру повторно подкармливают свежей средой через 12 ч после инфицирования и инкубируют в течение дополнительных 72 ч. Клетки промывают посредством PBS и лизируют с применением лизирующего реагента, входящего в набор для люциферазного анализа (Promega). Аликвоты клеточных лизатов переносят в 96-луночные плоскодонные люминометрические планшеты Costar (Corning Costar) с последующим добавлением люциферазного субстрата (Promega). Сразу после этого определяют относительные световые единицы в люминиметре Ultra 384 (Tecan, США).

Пример 4. Экспрессия антифузогенных полипептидов SARS-CoV-2

В данном примере продемонстрирована экспрессия антифузогенных полипептидов SARS-CoV-2 из кольцевых РНК.

Были сконструированы несколько антифузогенных полипептидов SARS-CoV-2 (фиг. 2 и 3) на основании области HR2, которая представлена на фиг. 1. Кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали IRES и нуклеотидную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид SARS-CoV-2. В данном примере конструкции ДНК конструировали таким образом, чтобы они содержали спейсерный элемент и полинуклеотидный груз. Конструкции конструировали таким образом, чтобы они содержали комбинацию IRES и ORF в качестве полинуклеотидного груза. ORF конструировали таким образом, чтобы она содержала сигнальную последовательность секреции IL-2, нуклеотидную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид SARS-CoV-2, и нуклеотидную последовательность, кодирующую метку HiBiT с пептидным линкером GGGGS. IRES представлял собой EMCV.

Ниже представлены аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для всех применяемых конструкций.

N-концевой сигнал секреции IL-2 показан заглавными буквами (20 AA или 60 нуклеотидов)

Жирным=фурин

Жирным и курсивом=метка HiBiT с пептидным линкером G4S

Полноразмерный HR2

ATGTATAGAATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTTTCTCTGGCTCTTGTGACT
AATTC**Tagactgaggagaggtattgtaataataactgtttacgatcctcttcagcctgaactgattctttaagaagaactggataaata**
tttaagaatcatacttctctgacgttgatctgggtgatattctggtattaacgcttctgttgtaatattcagaaagaattgatagactgaacga
agttgctaagaatctgaacgaatctcttattgatcttcaggaact**ggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatc**
agc (SEQ ID NO: 378)

MYRMQLLSCIALSLALVTNS**RLRR**GIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHT
SPDVDLGDIGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL**GGGGSVSGWRLF****FKKIS**
(SEQ ID NO: 379)

HR2A

ATGTATAGAATGCAGCTTCTTTCTTGTATTGCTCTTTCTCTTGCTCTGGTACT
AATTC**Tagactgaggagagatattctggtattaacgcttctgttgtaatattcagaaagaattgatagacttaacgaagttgctaaaa**
tctgaacgaatctctgattgatctgcaggaact**gggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc** (SEQ
ID NO: 380)

MYRMQLLSCIALSLALVTNS**RLRR**DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
GGGGSVSGWRLF**FKKIS** (SEQ ID NO: 381)

HR2C

ATGTATAGAATGCAGCTTCTGTCTTGTATTGCTCTGTCTCTTGCTCTTGTTACT
AATTC**Tagactgaggagatttaaaatcatacttctctgacgttgatctgggtgatattctggtattaacgcttctgttgtaatattcaga**
aagaattgatagactgaacgaagttgctaa**ggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc** (SEQ
ID NO: 382)

MYRMQLLSCIALSLALVTNS**RLRR**FKNHTSPDVDLGDIGINASVVNIQKEIDRLNEVAK
GGGGSVSGWRLF**FKKIS** (SEQ ID NO: 383)

HR2B

ATGTATAGAATGCAGCTTCTGTCTTGTATTGCTCTGTCTCTTGCTCTGGTACT
AATTC**Taggctgagaagagttgttattggtattgtaataataactgtttacgatcctcttcagcctgaactgattctttaaggaagaactg**
gataagttttaaaatcacacttctctgat**ggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc** (SEQ ID
NO: 384)

MYRMQLLSCIALSLALVTNS**RLRR**VVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKN
HTSPD**GGGGSVSGWRLF****FKKIS** (SEQ ID NO: 385)

EK1

ATGTATAGAATGCAGCTTCTTTCTTGTATTGCTCTGTCTCTGGCTCTTGTTACT

AATTCTagactgaggagatctcttgatcagattaacgttactttctggatctggaatacgaatgaaaagctggaagaagctattaa
 aagcttgaagaatcttatattgatctgaaagaactggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgtcaagaagatcage
 (SEQ ID NO: 386)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSRLRRSLDQINVTFLDLEYEMKKLEEAIKKLEESYI
 DLKELGGGGSVSGWRLFKKIS (SEQ ID NO: 387)

Кольцевые РНК получали путем самосплайсинга с помощью описанного в данном документе способа. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с применением РНК-полимеразы Т7 с ДНК-матрицы, содержащей перечисленные выше мотивы, в присутствии 7,5 мМ NTP. ДНК-матрицу удаляли путем обработки ДНКазой. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050). Самосплайсинг имел место во время транскрипции. Кольцевую РНК, кодирующую антифузогенный пептид, очищали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной (PAGE с мочевиной) или посредством колоночной хроматографии с обращенной фазой.

Для измерения экспрессии антифузогенных полипептидов SARS-CoV-2 в клетки HEK293 с помощью липофектамина доставляли 0,4 пмоль кольцевой РНК. Спустя 48 часов измеряли экспрессию. В клетках HEK293 экспрессировались различные полипептиды. Общая экспрессия (нг/мл и нМ) представлена в таблице 2.

Таблица 2. Экспрессия конструкции HR2

	Экспрессия (нг/мл)	Экспрессия (нМ)
Полноразмерный HR2	69,2	8,4
HR2A	5	1,3
HR2C	1,4	0,4
HR2B	0	0
EK1	0,1	0

Пример 5. Подавление инфицирования псевдотипированными SARS-CoV-2

В данном примере продемонстрировано подавление инфицирования псевдотипированным SARS-CoV2 с помощью антифузогенных полипептидов, экспрессируемых с кольцевых РНК.

Кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и нуклеотидную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид SARS-CoV-2. В данном примере конструкции ДНК конструировали таким образом, чтобы они содержали спейсерный элемент и комбинацию IRES EMCV и ORF в качестве полинуклеотидного груза. ORF конструировали таким образом, чтобы они содержали сигнальную последовательность секреции IL-2 и нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный антифузогенный полипептид HR2, а также нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку HiBiT. ORF также конструировали таким образом, чтобы они содержали сигнальную последовательность секреции IL-2 и нуклеотидную последовательность,

кодирующую полноразмерный антифузогенный полипептид HR2, без нуклеотидной последовательности, кодирующей пептидную метку HiBiT.

Кольцевые РНК получали путем самосплайсинга с помощью описанного в данном документе способа. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с применением РНК-полимеразы T7 с ДНК-матрицы, содержащей перечисленные выше мотивы, в присутствии 7,5 мМ NTP. ДНК-матрицу удаляли путем обработки ДНКазой. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050). Самосплайсинг имел место во время транскрипции. Кольцевую РНК, кодирующую полноразмерный антифузогенный полипептид HR2, очищали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной (PAGE с мочевиной) или посредством колоночной хроматографии с обращенной фазой.

Для выявления подавляющей активности экспрессируемых полипептидов при инфицировании псевдовиром SARS трансфицированные посредством ACE2 клетки 293T (293T/ACE2) (10^4 на лунку в 96-луночных планшетах), которые были и не были трансфицированы кольцевыми РНК, соответственно инфицировали псевдовиром SARS-CoV-2. В качестве контроля ("холостой пробы") использовали только реагент для трансфекции (без кольцевой РНК). После инфицирования культуру повторно подкармливали свежей средой через 12 часов после инфицирования и инкубировали в течение дополнительных 72 часов. Клетки промывали посредством PBS и лизировали с помощью лизирующего реагента, входящего в набор для люциферазного анализа (Promega). Аликвоты клеточных лизатов переносили в 96-луночные плоскодонные люминометрические планшеты Costar (Corning Costar) с последующим добавлением люциферазного субстрата (Promega). Сразу после этого определяли относительные световые единицы в люциметре Ultra 384 (Tecan, США).

Эффективность подавления слияния *in vitro* с применением псевдовирусов Омикрон и Дельта определяли с использованием кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих описанные в данном документе антифузогенные полипептиды. Было показано, что полноразмерный антифузогенный полипептид HR2, экспрессируемый в клетках (**фиг. 4А**), а также полноразмерный HR2 и полноразмерный HR2, конъюгированный с антифузогенными полипептидами с меткой HiBiT, подавляли слияние (**фиг. 4А**) штаммов Дельта и Омикрон. Не наблюдали никаких изменений в выживаемости клеток (по результатам измерения с помощью cellTiter glo) (**фиг. 4В**), что позволяло предположить, что снижение люциферазного сигнала (**фиг. 4А**) было обусловлено подавлением вирусного слияния.

Для измерения экспрессии полипептида *in vivo* мышам посредством внутривенной инъекции вводили 120 пмоль кольцевых РНК, составленных в липидных наночастицах. Экспрессию измеряли с помощью системы внеклеточной детекции Nano-Glo® HiBiT (№ N3030, Promega), 10% сыворотка крови. Экспрессия антифузогенного полипептида была высокой через 6 часов и значимо снижалась к 24 часам, как продемонстрировано в

таблице 3 и на **фиг. 5**.

Таблица 3. Экспрессия HR2

		6 часов (нг/мл)	24 часа (нг/мл)
Полноразмерный HR2	HiViT	24,8	0,2
Без HiViT		0,02	0,01

Пример 6. Подавление инфицирования псевдотипированными SARS-CoV-2

В данном примере продемонстрировано инфицирование псевдотипированным SARS-CoV2 с применением антифузогенных полипептидов.

Антифузогенные полипептиды SARS-CoV-2 получали на основе областей HR2, HR2A, HR2B и HR2C шиповидного полипептида SARS-CoV-2 и полипептида EK1 (**фиг. 2**).

Для измерения нейтрализации псевдовируса полипептидами EK-1 и HR2A проводили функциональный анализ *in vitro*. Полипептиды HR2A демонстрировали эффективность в отношении штаммов Wuhan и Омикрон (**фиг. 6A и 6B**).

Дополнительные эксперименты с полипептидами проводили с применением полноразмерных полипептидов HR2A-C и HR2. В качестве отрицательного контроля использовали IPB19, представляющий собой пептид HIV, а в качестве положительного контроля использовали ACE-Fc, представляющий собой антитело, которое напрямую связывается с рецептором. Полипептиды (начальное разведение 10 мкМ) получали с применением 4-кратных серийных разведений (8 разведений) и клеток ACE2 HEK293. Было продемонстрировано, что все полипептиды подавляют штаммы Омикрон и WT, значения IC50 представлены в таблице 4.

Таблица 4. Значения IC50

	IC50 (мкМ)		IC50 (нМ)		IC50 (нг/мл)	
	Омикрон	Дикий тип	Омикрон	Дикий тип	Омикрон	Дикий тип
Полноразмерный HR2	0,02625	0,1742	26,3	174,2	215,3	1428,4
HR2A	-	-	37,7	614,2	158,1	2579,6
EK-1	-	-	64,8	329,3	272,2	1383,1
HR2B	-	-	Отриц.	Отриц.	Отриц.	Отриц.
HR2C	-	-	Отриц.	Отриц.	Отриц.	Отриц.
IPB19	-	-	1046,0	Отриц.	4393,2	Отриц.
ACE-Fc	-	-	4,3	8,4		

Также были протестированы продукты слияния полноразмерного HR2 и Fc и было продемонстрировано, что они сохраняют подавляющую активность в отношении штаммов

Омикрон и Wuhan.

Было продемонстрировано, что полноразмерный полипептид HR2 (“HR2Complete”) успешно подавляет слияние штаммов Омикрон BA.4/BA.5, SARS CoV-1 и Wuhan (**фиг. 7A, 7B и 8A-8D**).

Пример 7. Экспрессия антифузогенных полипептидов HIV

В данном примере продемонстрирована экспрессия антифузогенных полипептидов HIV с кольцевых РНК.

Были сконструированы несколько антифузогенных полипептидов HIV (**фиг. 9**). Кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали IRES и нуклеотидную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид HIV. В данном примере конструкции ДНК конструировали таким образом, чтобы они содержали спейсерный элемент и полинуклеотидный груз (**фиг. 9**). Конструкции конструировали таким образом, чтобы они содержали комбинацию IRES и ORF в качестве полинуклеотидного груза. ORF конструировали таким образом, чтобы она содержала сигнальную последовательность секреции IL-2 (SEQ ID NO: 332), нуклеотидную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид HIV, и нуклеотидную последовательность, кодирующую метку HiBiT (с последовательностью VSGWRLFKKIS (SEQ ID NO: 362) с пептидным линкером GGS или GGGGS. IRES представлял собой либо EMCV, либо модифицированный CVB3.

Кольцевые РНК получали путем самосплайсинга с помощью описанного в данном документе способа. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с применением РНК-полимеразы T7 с ДНК-матрицы, содержащей перечисленные выше мотивы, в присутствии 7,5 мМ NTP. ДНК-матрицу удаляли путем обработки ДНКазой. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050). Самосплайсинг имел место во время транскрипции. Кольцевую РНК, кодирующую антифузогенный пептид, очищали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной (PAGE с мочевиной) или посредством колоночной хроматографии с обращенной фазой.

Для измерения экспрессии антифузогенных полипептидов HIV в клетки HEK293 с помощью липофектамина доставляли 0,4 пмоль кольцевой РНК. Спустя 48 часов измеряли экспрессию. Как показано на **фиг. 10A и 10B**, данные полипептиды экспрессировались в клетках HEK293. Как показано на **фиг. 11A и 11B**, экспрессия была сопоставимой среди плазмид на основе кольцевых РНК и ДНК. Общая экспрессия для различных полипептидов (нг/мл и нМ) показана на **фиг. 12**.

Полипептидные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот HIV

T20

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO: 313)

tatacttctctgatccactctctgatcgaggaatctcagaaccagcaggagaagaacgaacaggaactgctggaactggataagt
gggcttctctgtggaactggttc (с EMCV IRES) (SEQ ID NO: 363)

ИЛИ

tacaccagcctgatccacagcctgatcgaggaaagccagaaccagcaagagaagaacgagcaggagctgctggagctggac
aagtgggccagcctgtggaactggctc (с модифицированным CVB3 IRES) (SEQ ID NO: 364)

T1249

WQEWKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (SEQ ID NO: 318)

tggcaggagtgggaacagaagatcactgctctgctggaacaggctcagattcagcaggaagaacgaatacgaactgcaga
agctggataagtggccttctctgtgggagtggctc (с EMCV IRES) (SEQ ID NO: 365)

ИЛИ

tggcaggagtgggagcagaagatcaccgcctgctggagcaggcccagatccagcaagagaagaacgagtacgagctgca
gaagctggacaagtgggccagcctgtgggagtggctc (с модифицированным CVB3 IRES) (SEQ ID NO:
366)

T1144

TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (SEQ ID NO: 316)

actactgggaagctgggatagagctatcgctgaatacgtgctagaattgaagctctgctgagagctctgcaggaacagcag
gaaaagaacgaagctgctctgagagaactg (с EMCV IRES) (SEQ ID NO: 367)

ИЛИ

accactgggaggcctgggaccgggccatcgccgagtagccgctcgatcgaggccctgctgcccgcctgcaggagca
gcaagagaagaacgaggcccctgcccgggagctg (с модифицированным CVB3 IRES) (SEQ ID NO: 368)

1144-2-0

TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALRELDKWASLWNWF (SEQ
ID NO: 317)

accactgggaggcctgggaccgggccatcgccgagtagccgctcgatcgaggccctgctgcccgcctgcaggagca
gcaagagaagaacgaggcccctgcccgggagctggacaagtgggccagcctgtggaactggctc (с модифицированным
CVB3 IRES) (SEQ ID NO: 369)

T_2410

MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEL (SEQ ID NO: 314)

atgacctggatggagtgggaccgggagatcaacaattacaccagcctgatccacagcctgatcgaggaaagccagaaccagc
aagagaagaacgagcaggagctgctggagctg (с модифицированным CVB3 IRES) (SEQ ID NO: 370)

T_2410_2.0

MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ
ID NO: 315)

atgacctggatggagtgggaccgggagatcaacaattacaccagcctgatccacagcctgatcgaggaaagccagaaccagc
aagagaagaacgagcaggagctgctggagctggacaagtgggccagcctgtggaactggctc (с модифицированным
CVB3 IRES) (SEQ ID NO: 371)

1249_2.0

TTWQEWKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (SEQ ID NO: 319)

accactggcaggagtgggagcagaagatcaccgcctgctggagcaggcccagatccagcaagagaagaacgagtagca
gctgcagaagctggacaagtgggccagcctgtgggagtggctc (с модифицированным CVB3 IRES) (SEQ ID
NO: 372)

290676

TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRASQEQQEKNEAELREL (SEQ ID NO: 323)

accacctgggaggcctgggaccgggccatcgccgagtagccgctcgatcgaggccctgatccgggccagccaggagca
gcaagagaagaacgaggccgagctgcgggagctg (с модифицированным CVB3 IRES) (SEQ ID NO:
373)

290676-2-0

TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRASQEQQEKNEAELRELDKWASLWNWF (SEQ
ID NO: 324)

accacctgggaggcctgggaccgggccatcgccgagtagccgctcgatcgaggccctgatccgggccagccaggagca
gcaagagaagaacgaggccgagctgcgggagctggacaagtgggccagcctgtggaactggttc (с модифицированным
CVB3 IRES) (SEQ ID NO: 374)

2635

TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRAAQEQQEKNEAALREL (SEQ ID NO: 320)

accacctgggaggcctgggaccgggccatcgccgagtagccgctcgatcgaggccctgatccgggccagccaggagca
gcaagagaagaacgaggccgactgcgggagctg (с модифицированным CVB3 IRES) (SEQ ID NO: 375)

2635_2.0

TTWEAWDRAIAEY AARIEALIRAAQEQQEKNEAALRELDKWASLWNWF (SEQ
ID NO: 321)

accacctgggaggcctgggaccgggccatcgccgagtagccgctcgatcgaggccctgatccgggccagccaggagca
gcaagagaagaacgaggccgactgcgggagctggacaagtgggccagcctgtggaactggttc (с модифицированным
CVB3 IRES) (SEQ ID NO: 376)

2635_3.0

MTWEAWDRAIAEY AARIEALIRAAQEQQEKNEAALRELDKWASLWNWF (SEQ
ID NO: 322)

atgacctgggaggcctgggaccgggccatcgccgagtagccgctcgatcgaggccctgatccgggccagccaggagca
gcaagagaagaacgaggccgactgcgggagctggacaagtgggccagcctgtggaactggttc (SEQ ID NO: 377)

Другие варианты осуществления

Хотя настоящее изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, будет понятно, что оно допускает дополнительные модификации, и данная заявка предназначена для охвата любых вариаций, способов применения или адаптаций настоящего изобретения, следующих, в целом, принципам изобретения и включая такие отклонения от настоящего изобретения, которые входят в известную или общепринятую практику в уровне техники, к которой относится настоящее изобретение, и могут быть применены к существенным признакам, которые изложены выше в данном документе и входят в объем формулы изобретения. Другие варианты осуществления находятся в пределах формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий полирибонуклеотидный груз, кодирующий антифузогенный полипептид.
2. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 1, где полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид.
3. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 1 или п. 2, где кольцевой полирибонуклеотид содержит границу сплайсинга, соединяющую 5'-фрагмент экзона и 3'-фрагмент экзона.
4. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 2 или п. 3, где полирибонуклеотидный груз содержит IRES, функционально связанный с экспрессионной последовательностью, кодирующей антифузогенный полипептид.
5. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит спейсерную область между IRES и 3'-фрагментом экзона или 5'-фрагментом экзона.
6. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 5, где длина спейсерной области составляет по меньшей мере 5 рибонуклеотидов.
7. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 6, где длина спейсерной области составляет от 5 до 500 рибонуклеотидов.
8. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 5-7, где спейсерная область содержит последовательность поли(A), поли(A-C), поли(A-U) или поли(A-G).
9. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 1-8, где длина кольцевого полирибонуклеотида составляет по меньшей мере 500 рибонуклеотидов.
10. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 9, где длина кольцевого полирибонуклеотида составляет от 500 до 20000 рибонуклеотидов.
11. Линейный полирибонуклеотид, содержащий в направлении от 5' к 3': (A) 3'-фрагмент интрона; (B) 3'-сайт сплайсинга; (C) 3'-фрагмент экзона; (D) полирибонуклеотидный груз, кодирующий антифузогенный полипептид; (E) 5'-фрагмент экзона; (F) 5'-сайт сплайсинга и (G) 5'-фрагмент интрона.
12. Линейный полирибонуклеотид по п. 11, где полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионную последовательность, кодирующую антифузогенный полипептид.
13. Линейный полирибонуклеотид по п. 12, где полирибонуклеотидный груз содержит IRES, функционально связанный с экспрессионной последовательностью, кодирующей антифузогенный полипептид.
14. Линейный полирибонуклеотид по любому из пп. 11-13, где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит спейсерную область между одним или несколькими из (A), (B), (C), (D), (E), (F) и (G).
15. Линейный полирибонуклеотид по п. 14, где длина спейсерной области составляет по меньшей мере 5 рибонуклеотидов.

16. Линейный полирибонуклеотид по п. 15, где длина спейсерной области составляет от 5 до 500 рибонуклеотидов.

17. Линейный полирибонуклеотид по любому из пп. 14-16, где спейсерная область содержит последовательность поли(А), поли(А-С), поли(А-У) или поли(А-Г).

18. Линейный полирибонуклеотид по любому из пп. 11-17, где длина линейного полирибонуклеотида составляет по меньшей мере 500 рибонуклеотидов.

19. Линейный полирибонуклеотид по п. 18, где длина линейного полирибонуклеотида составляет от 500 до 20000 рибонуклеотидов.

20. ДНК-вектор, кодирующий линейный полирибонуклеотид по любому из пп. 11-19.

21. Способ обеспечения экспрессии антифузогенного полипептида в клетке, при этом способ включает доставку кольцевого полирибонуклеотида по любому из пп. 1-10, линейного полирибонуклеотида по любому из пп. 11-19 или ДНК-вектора по п. 20 в клетку в условиях, подходящих для экспрессии антифузогенного полипептида.

22. Способ получения кольцевого полирибонуклеотида из линейного полирибонуклеотида по любому из пп. 11-20, при этом способ включает обеспечение линейного полирибонуклеотида в условиях, подходящих для самосплайсинга линейного полирибонуклеотида с получением кольцевого полирибонуклеотида.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 1-10, линейный полирибонуклеотид по любому из пп. 11-19 или ДНК-вектор по п. 20 и разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

24. Способ обеспечения экспрессии антифузогенного полипептида у субъекта, включающий введение первой дозы фармацевтической композиции по п. 23 в количестве, достаточном для получения концентрации в сыворотке крови, составляющей по меньшей мере 500 нг/мл антифузогенного полипептида, у субъекта.

25. Способ по п. 24, дополнительно включающий введение второй дозы фармацевтической композиции.

26. Способ по п. 25, где вторую дозу вводят через по меньшей мере 1 день после первой дозы фармацевтической композиции.

27. Способ по п. 26, где вторую дозу вводят в течение периода от 1 дня до 90 дней после первой дозы фармацевтической композиции.

28. Способ по любому из пп. 25-27, где вторую дозу вводят до того, как концентрация антифузогенного полипептида в сыворотке крови субъекта становится менее приблизительно 500 нг/мл.

29. Способ по п. 28, где способ обеспечивает поддержание у субъекта концентрации антифузогенного полипептида в сыворотке крови, составляющей по меньшей мере 500 нг/мл.

30. Способ по любому из пп. 24-29, где способ обеспечивает лечение или предупреждение вирусной инфекции у субъекта.

31. Способ по п. 30, где фармацевтическую композицию вводят субъекту в

количестве и в течение периода времени, достаточных для лечения или предупреждения вирусной инфекции.

32. Способ по любому из пп. 24-31, где способ обеспечивает снижение проникновения вируса.

33. Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий полирибонуклеотидный груз, кодирующий несколько антифузогенных полипептидов.

34. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 33, где полирибонуклеотидный груз содержит экспрессионные последовательности, кодирующие антифузогенные полипептиды.

35. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 33 или п. 34, где антифузогенные полипептиды направлены на один и тот же вирус.

36. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 33 или п. 34, где антифузогенные полипептиды направлены на более чем один вирус.

По доверенности

ФИГ. 1

Идентичный/сходный

Область HR1

Wuhan-Hu-1	NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLDVNVQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVVTQQLIRAAEIRASAN
Альфа	NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLDVNVQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILARLDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVVTQQLIRAAEIRASAN
Бета	NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLDVNVQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVVTQQLIRAAEIRASAN
Гамма	NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLDVNVQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVVTQQLIRAAEIRASAN
Дельта	NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLDVNVQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVVTQQLIRAAEIRASAN
Омикрон	NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLDVNVHNAQALNTLVKQLSSKFGAISSVLNDIFSRLDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVVTQQLIRAAEIRASAN
SARS-1	NVLYENQKLIANQFNKAI SQIQESLTTTSTALGKLDVNVQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVVTQQLIRAAEIRASAN
MERS	QVLS ENQKLIANKFNQALGAMOTGFTTTNEAFQKVQDAVNNNAQALS KLA SELSNTFGAISASIGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTTLNAFVAQQLVRSESAALSAQ



Область HR2

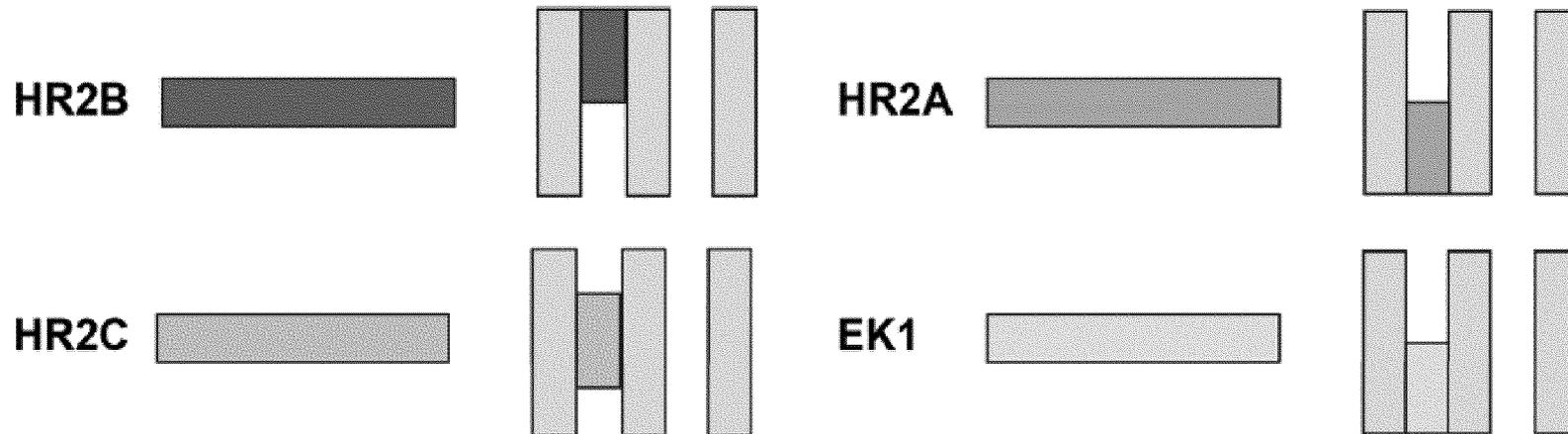
Wuhan-Hu-1	VVIGIVNNTVYDPLQ--PELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
Альфа	VVIGIVNNTVYDPLQ--PELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
Бета	VVIGIVNNTVYDPLQ--PELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
Гамма	VVIGIVNNTVYDPLQ--PELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVFNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
Дельта	VVIGIVNNTVYDPLQ--PELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
Омикрон	VVIGIVNNTVYDPLQ--PELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
SARS-1	VVIGIINNTVYDPLQ--PELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
MERS	VTYQNI STNLP PPL LGNSTGIDFQDELDEFKFNVSTSI PNFGSLTQINTTLLDLYEMLSLQVVKALNESYIDLKEL

ФИГ. 2

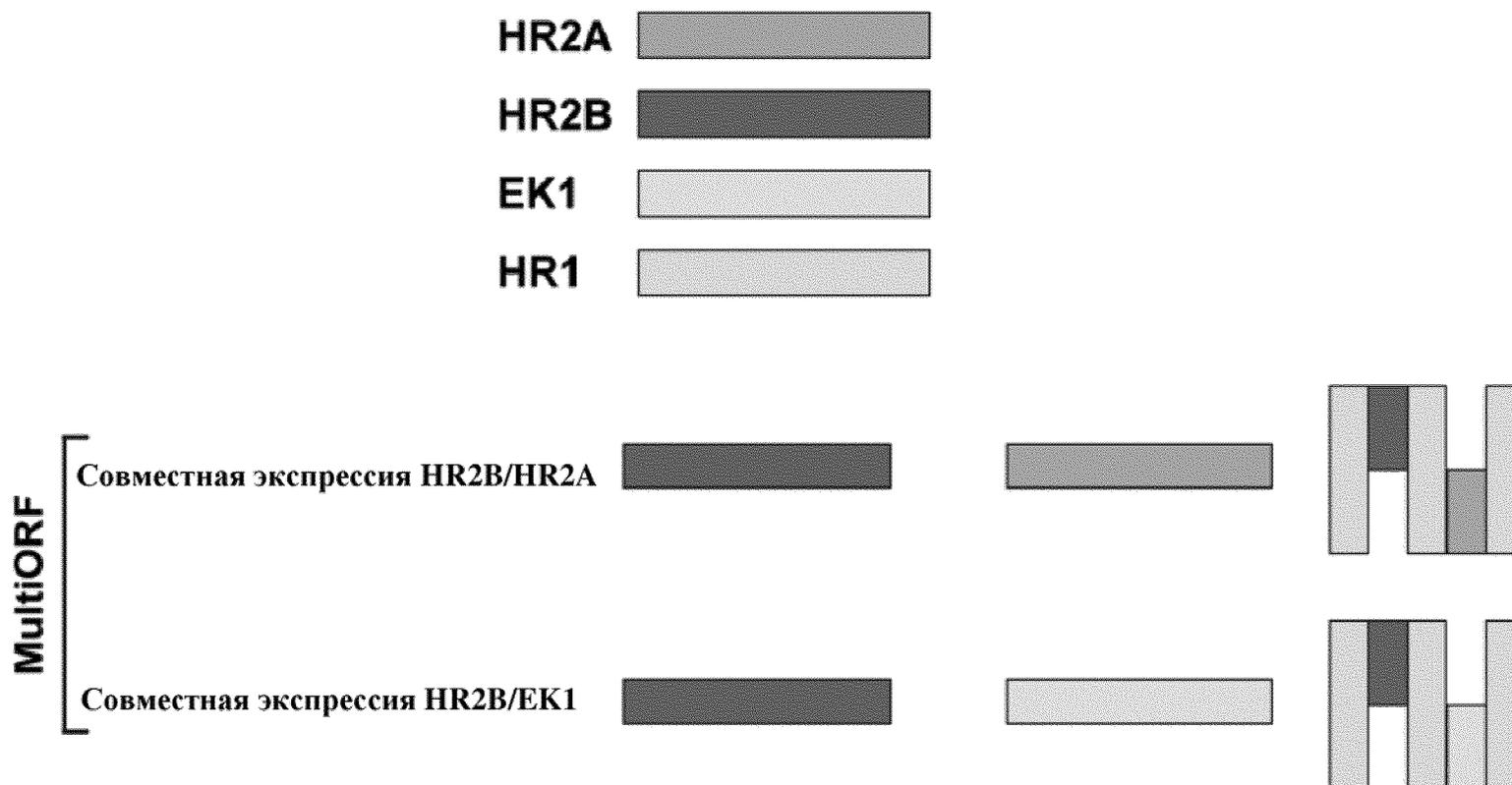
Область HR2 SARS CoV2

```

HR2_область . VVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
HR2A          -----DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL
HR2C          -----FKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAK-----
HR2B          VVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPD-----
EK1           -----SLDQINVTFLDLEYEMKKLEEAIKKLEESYIDLKEL
    
```

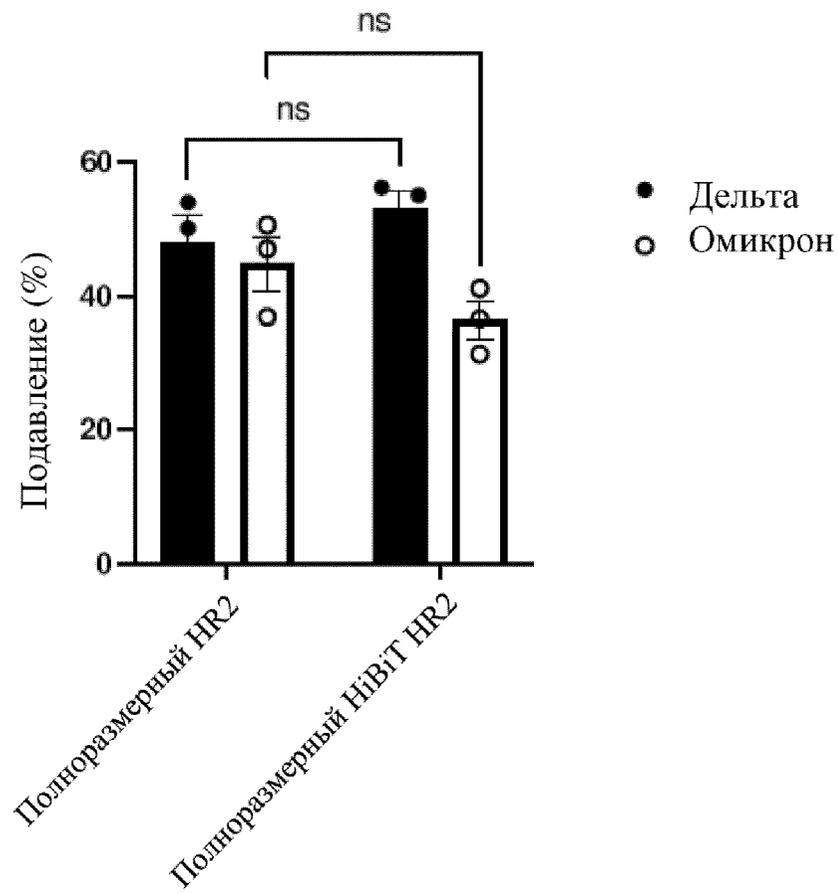


ФИГ. 3



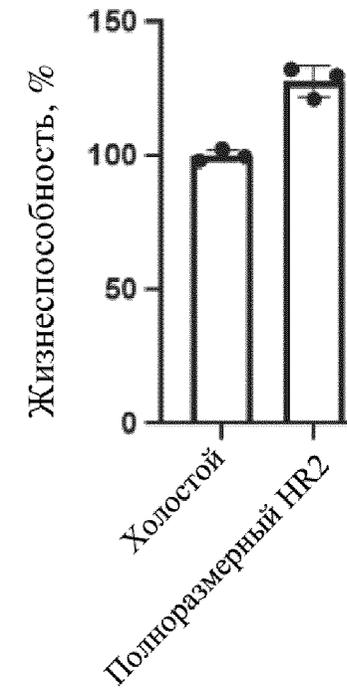
ФИГ. 4А

Функция

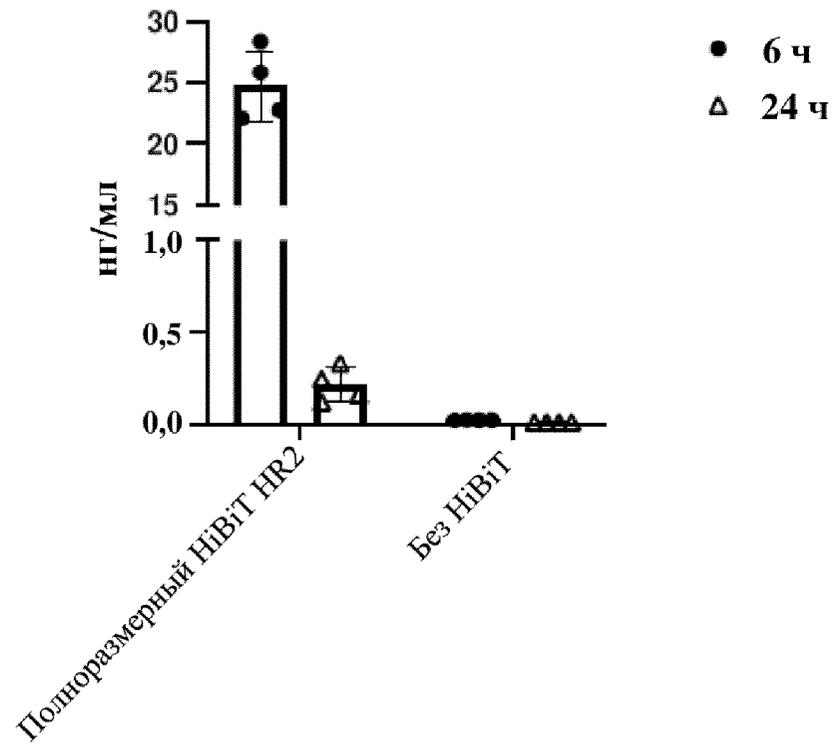


ФИГ. 4В

Жизнеспособность



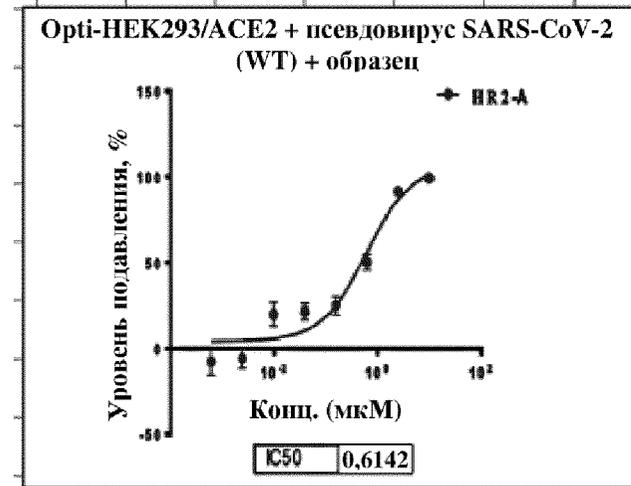
ФИГ. 5



ФИГ. 6А

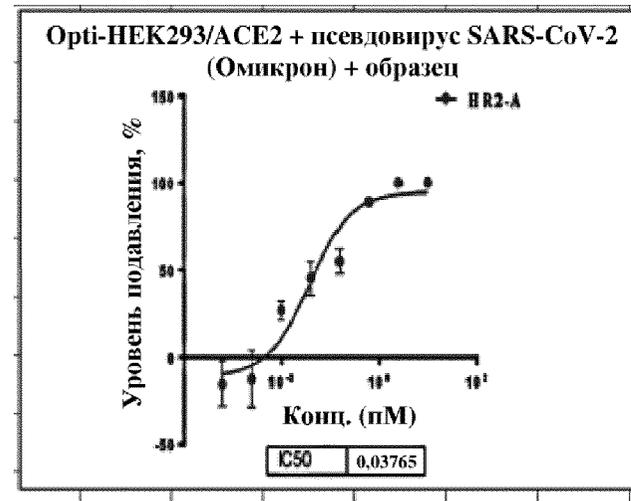
HR2A

Wuhan



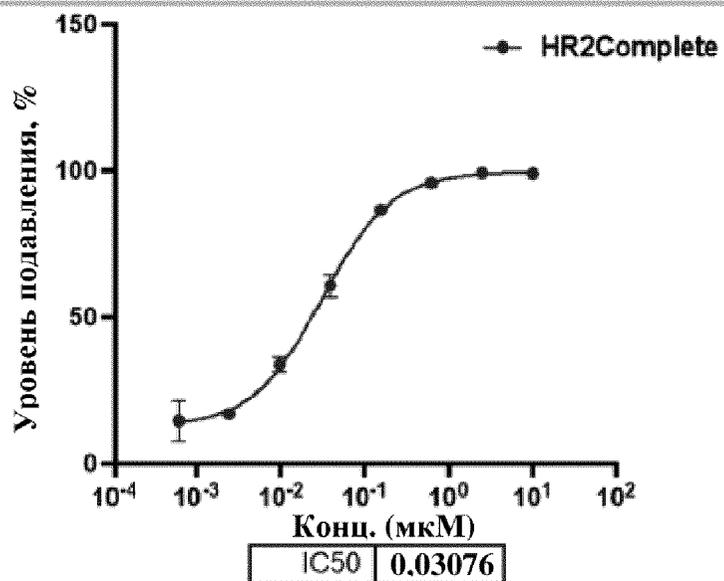
Омикрон

ФИГ. 6В



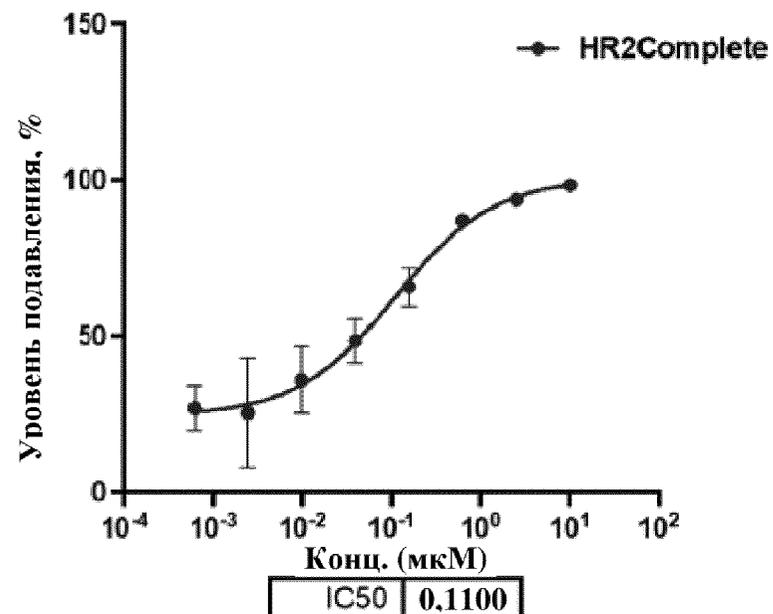
ФИГ. 7А

Опти-НЕК293/АСЕ2 + псевдовирус SARS-CoV-2 (Омикрон, ВА.4 и ВА.5) + образец



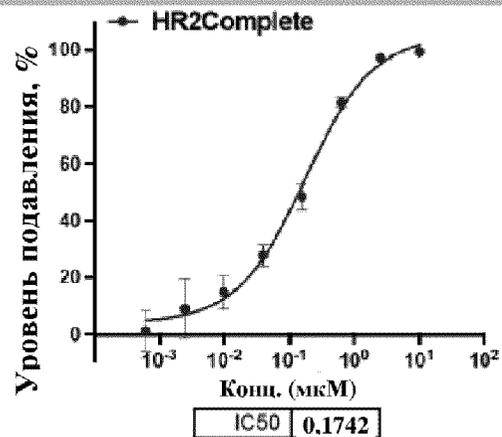
ФИГ. 7В

Опти-НЕК293/АСЕ2 + псевдовирус SARS-CoV-1 + образец



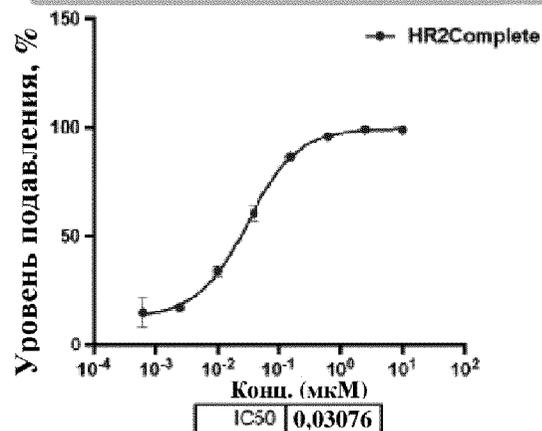
ФИГ. 8А

Opti-HEK293/ACE2 + псевдовиррус SARS-CoV-2 (Wuhan) + образец



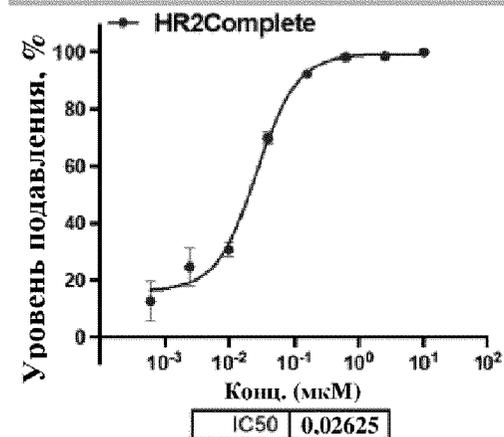
ФИГ. 8В

Opti-HEK293/ACE2 + псевдовиррус SARS-CoV-2 (Омикрон, ВА.4 и ВА.5) + образец

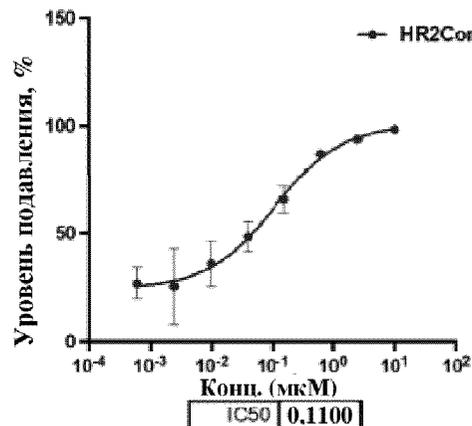


ФИГ. 8С

Opti-HEK293/ACE2 + псевдовиррус SARS-CoV-2 (Омикрон, ВА.1) + образец



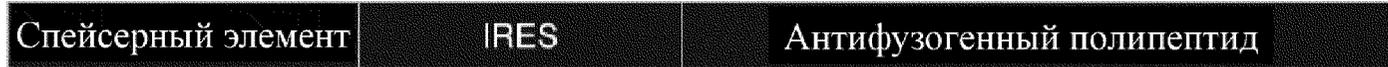
Opti-HEK293/ACE2 + псевдовиррус SARS-CoV-1 + образец



ФИГ. 8D

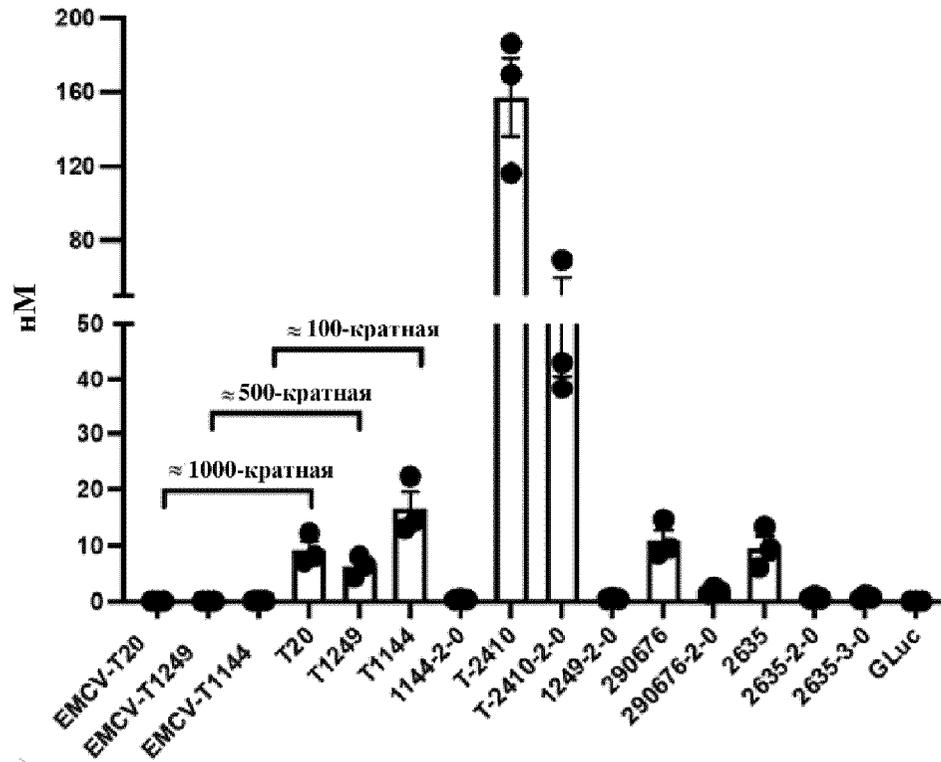
ФИГ. 9

Схема конструкции ►



HIV_CHR	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWA SLWNWF
T20	-----YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWA SLWNWF
T2410	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEL-----
T2410_2.0	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWA SLWNWF
T1144	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL-----
T1144_2.0	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALRELDKWA SLWNWF
T1249	--WQEWEQK-----ITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWA SLWEWF
T1249_2.0	TTWQEWEQK-----ITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWA SLWEWF
T2635	TTWEAWDRAIAEYAARIEALIRAAQEQQEKNEAALREL-----
T2635_2.0	TTWEAWDRAIAEYAARIEALIRAAQEQQEKNEAALRELDKWA SLWNWF
T2635_3.0	MTWEAWDRAIAEYAARIEALIRAAQEQQEKNEAALRELDKWA SLWNWF
T290676	TTWEAWDRAIAEYAARIEALIRASQEQQEKNEAELREL-----
T290676_2.0	TTWEAWDRAIAEYAARIEALIRASQEQQEKNEAELRELDKWA SLWNWF

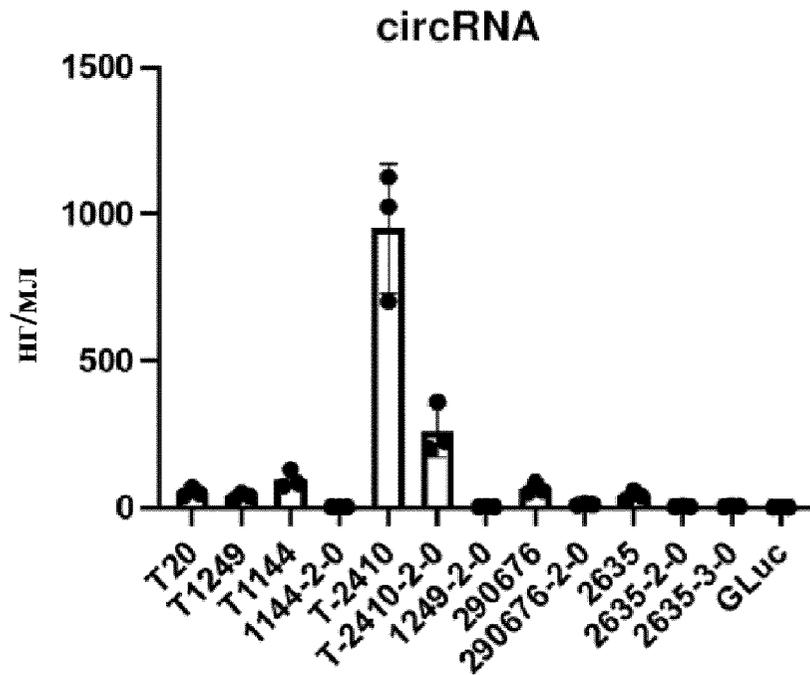
ФИГ. 10А



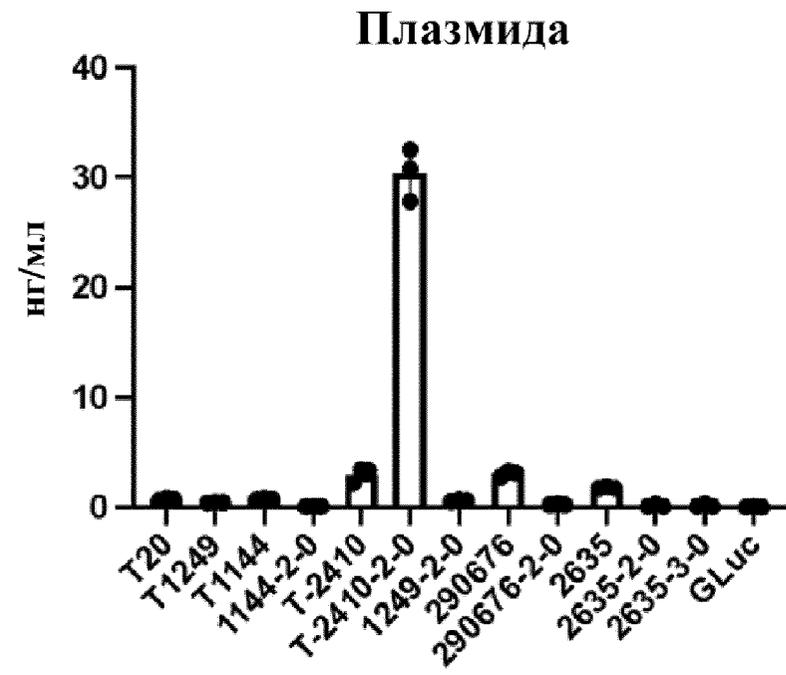
ФИГ. 10В

ТР/разведение	нг/мл			нМ		
	1 10	1 40	1 200	1 10	1 40	1 200
EMCV -T₂₀	0,03	0,03	0,03	0,0	0,0	0,0
EMCV -T₁₂₄₉	0,10	0,10	0,00	0,0	0,0	0,0
EMCV T₁₁₄₄	0,78	0,78	0,43	0,1	0,1	0,1
T₂₀	41,51	70,11	46,40	7,2	12,2	8,1
T₁₂₄₉	40,83	50,61	27,30	6,5	8,0	4,3
T₁₁₄₄	83,72	129,11	74,83	14,5	22,4	13,0
1144-2-0	1,56	2,37	1,73	0,3	0,4	0,3
T-2410	703,38	1126,75	1026,00	116,1	186,0	169,4
T-2410-2-0	223,61	360,71	198,90	43,0	69,4	38,3
1249-2-0	1,77	3,17	2,20	0,3	0,6	0,4
290676	55,45	85,28	49,20	9,5	14,6	8,4
290676-2-0	10,48	14,98	7,80	1,8	2,6	1,3
2635	40,83	58,91	26,87	9,2	13,3	6,1
2635-2-0	2,86	5,99	2,87	0,5	1,0	0,5
2635-3-0	3,80	6,61	2,23	0,7	1,1	0,4
GLuc	0,07	0,03	0,07	0	0,0	0,0

ФИГ. 11А



ФИГ. 11В



ФИГ. 12

ТР/разведение	нг/мл			нМ		
	1 10	1 40	1 200	1 10	1 40	1 200
EMCV T20	0,03	0,03	0,03	0,0	0,0	0,0
EMCV T1249	0,10	0,10	0,00	0,0	0,0	0,0
EMCV 1144	0,78	0,78	0,43	0,1	0,1	0,1
T20	41,51	70,11	46,40	7,2	12,2	8,1
T1249	40,83	50,61	27,30	6,5	8,0	4,3
T1144	83,72	129,11	74,83	14,5	22,4	13,0
1144-2-0	1,56	2,37	1,73	0,3	0,4	0,3
T-2410	703,38	1126,75	1026,00	116,1	186,0	169,4
T-2410-2-0	223,61	360,71	198,90	43,0	69,4	38,3
1249-2-0	1,77	3,17	2,20	0,3	0,6	0,4
290676	55,45	85,28	49,20	9,5	14,6	8,4
290676-2-0	10,48	14,98	7,80	1,8	2,6	1,3
2635	40,83	58,91	26,87	9,2	13,3	6,1
2635-2-0	2,86	5,99	2,87	0,5	1,0	0,5
2635-3-0	3,80	6,61	2,23	0,7	1,1	0,4
GLuc	0,07	0,03	0,07	0	0,0	0,0