

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190282** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.06.18

(51) Int. Cl. *C12N 15/115* (2010.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.07.24

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОЛЬЦЕВЫЕ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДЫ, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/702,714; 62/823,569; 62/863,670

(32) 2018.07.24; 2019.03.25; 2019.06.19

(33) US

(86) PCT/US2019/043272

(87) WO 2020/023655 2020.01.30

(71) Заявитель:

**ФЛЭГШИП ПАЙОНИРИНГ
ИННОВЭЙШНС VI, ЛЛС (US)**

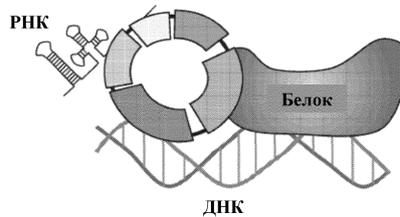
(72) Изобретатель:

**Каведжиан Авак, Пладжис Николас
Маккартни, Де Боер Александра
Софи, Стюарт Мораг Хелен,
Сифуэнтес-Рохас Кэтрин, Паэк Ки
Янг (US)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

(57) Настоящее изобретение в целом относится к фармацевтическим композициям и препаратам на основе кольцевых полирибонуклеотидов, а также к путям их применения.



-  РНК-связывающий мотив, специфичный по отношению к последовательности
-  ДНК-связывающий мотив, специфичный по отношению к последовательности
-  Связывающий мотив, специфичный по отношению к белку

A1

202190282

202190282

A1

КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОЛЬЦЕВЫЕ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДЫ, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Описание

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительным заявкам на патент США №№ 62/702714, поданной 24 июля 2018 года; 62/823569, поданной 25 марта 2019 года; и 62/863670, поданной 19 июня 2019 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определенные кольцевые полирибонуклеотиды повсеместно присутствуют в тканях и клетках человека, в том числе в тканях и клетках здоровых индивидуумов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение, описанное в данном документе, включает композиции, содержащие кольцевые полирибонуклеотиды, и способы их применения.

В некоторых аспектах способ обеспечения связывания с мишенью в клетке включает получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, при этом аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью; и доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с мишенью, который поддается выявлению через по меньшей мере 5 дней после доставки. В некоторых вариантах осуществления мишень выбрана из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты, малой молекулы, белка, углевода и липида. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой белок, регулирующий активность гена. В некоторых вариантах осуществления белок, регулирующий активность гена, представляет собой фактор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует экспрессию гена. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует управляемую транскрипцию молекулы ДНК, эпигенетическое ремоделирование молекулы ДНК или разрушение молекулы ДНК. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует разрушение мишени, транслокацию мишени или передачу сигнала к мишени. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена ассоциирована с патогенезом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления комплекс поддается выявлению через по меньшей мере

мере 7, 8, 9 или 10 дней после доставки. В некоторых вариантах осуществления трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид присутствует в течение по меньшей мере пяти дней после доставки. В некоторых вариантах осуществления трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид присутствует в течение по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 дней после доставки. В некоторых вариантах осуществления трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид представляет собой немодифицированный трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид имеет псевдодвухнитевую вторичную структуру. В некоторых вариантах осуществления аптамерная последовательность дополнительно имеет третичную структуру, которая связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку человека.

В некоторых аспектах способ обеспечения связывания с фактором транскрипции в клетке включает получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с фактором транскрипции и модулирует экспрессию гена.

В некоторых аспектах способ обеспечения секвестрации фактора транскрипции в клетке включает получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид секвестрирует фактор транскрипции посредством связывания с фактором транскрипции с образованием комплекса в клетке. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клетки снижается после образования комплекса.

В некоторых аспектах способ повышения чувствительности клетки к цитотоксическому средству включает получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и доставку цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с фактором транскрипции в клетке; за счет чего обеспечивается повышение

чувствительности клетки к цитотоксическому средству по сравнению с клеткой, в которой отсутствует трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления повышение чувствительности клетки к цитотоксическому средству приводит к снижению жизнеспособности клетки после доставки цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления снижение жизнеспособности клетки представляет собой снижение на 40% или больше через по меньшей мере два дня после доставки цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых аспектах способ обеспечения связывания с патогенным белком в клетке включает получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с патогенным белком; и доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с патогенным белком для разрушения патогенного белка.

В некоторых аспектах способ обеспечения связывания с молекулой рибонуклеиновой кислоты в клетке включает получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, комплементарную последовательности молекулы рибонуклеиновой кислоты; и доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с молекулой рибонуклеиновой кислоты.

В некоторых аспектах способ обеспечения связывания с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетке включает получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты; и доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты и модулирует экспрессию гена.

В некоторых аспектах способ обеспечения связывания с малой молекулой в клетке включает получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с малой молекулой; и доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с

малой молекулой и модулирует клеточный процесс. В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой органическое соединение с молекулярной массой, составляющей не более 900 дальтонов, и модулирует клеточный процесс. В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой флуорофор. В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой метаболит.

В некоторых аспектах композиция содержит трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид, содержащий аптамерную последовательность, где аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид, содержащий аптамерную последовательность, где аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью; и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

В некоторых аспектах клетка содержит трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе.

В некоторых аспектах способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включает введение композиции, описанной в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, кодирующий трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе.

В некоторых аспектах способ представляет собой способ получения трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью, например, РНК, ДНК, белком, мембраной клетки и т. д.; и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель; при этом мишень и кольцевой полирибонуклеотид образуют комплекс, и при этом мишень не представляет собой микроРНК. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, содержащий первый сайт связывания, который связывается с первой мишенью, и второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью; и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель; при этом первый сайт связывания отличается от второго сайта связывания, и при этом как первая мишень, так и вторая мишень представляют собой

микроРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания содержит аптамерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления первый сайт связывания содержит первую аптамерную последовательность, и второй сайт связывания содержит вторую аптамерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления первая аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с первой мишенью, и вторая аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается со второй мишенью. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания представляет собой первый сайт связывания, и мишень представляет собой первую мишень. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью. В некоторых вариантах осуществления первая мишень содержит первый мотив связывания с кольцевым полирибонуклеотидом (circRNA). В некоторых вариантах осуществления вторая мишень содержит второй мотив связывания с кольцевым полирибонуклеотидом (circRNA). В некоторых вариантах осуществления первая мишень, вторая мишень и кольцевой полирибонуклеотид образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая мишени взаимодействуют друг с другом. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует клеточный процесс. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая мишени являются одинаковыми, и первый и второй сайты связывания связываются с разными сайтами связывания в первой мишени и второй мишени. В некоторых вариантах осуществления первая мишень и вторая мишень являются разными. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит один или несколько дополнительных сайтов связывания, которые связываются с третьей или последующими мишенями. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней являются одинаковыми, и один или несколько дополнительных сайтов связывания связываются с разными сайтами связывания в одной или нескольких мишенях. В некоторых вариантах осуществления образование комплекса приводит к модулированию клеточного процесса. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид модулирует клеточный процесс, ассоциированный с первой или второй мишенью, при контакте с первой и второй мишенями. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая мишени взаимодействуют друг с другом в составе комплекса. В некоторых вариантах осуществления клеточный процесс ассоциирован с патогенезом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления клеточный процесс является отличным от трансляции кольцевой полирибонуклеиновой кислоты. В

некоторых вариантах осуществления первая мишень содержит молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), и вторая мишень содержит белок. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует управляемую транскрипцию молекулы ДНК, эпигенетическое ремоделирование молекулы ДНК или разрушение молекулы ДНК. В некоторых вариантах осуществления при этом первая мишень содержит первый белок, и вторая мишень содержит второй белок. В некоторых вариантах осуществления при этом комплекс модулирует разрушение первого белка, транслокацию первого белка или передачу сигнала или модулирует функцию нативного белка, ингибирует или модулирует образование комплекса, образующегося путем непосредственного взаимодействия между первым и вторым белками. В некоторых вариантах осуществления первая мишень или вторая мишень представляет собой убиквитинлигазу. В некоторых вариантах осуществления первая мишень содержит первую молекулу рибонуклеиновой кислоты (РНК), и вторая мишень содержит вторую молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует разрушение первой молекулы РНК. В некоторых вариантах осуществления первая мишень содержит белок, и вторая мишень содержит молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует транслокацию белка или ингибирует образование комплекса, образующегося путем непосредственного взаимодействия между белком и молекулой РНК. В некоторых вариантах осуществления первая мишень представляет собой рецептор, и вторая мишень представляет собой субстрат рецептора. В некоторых вариантах осуществления комплекс ингибирует активацию рецептора.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью; и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель; при этом кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным, и при этом мишень не представляет собой микроРНК. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит кольцевую полирибонуклеиновую кислоту, содержащую сайт связывания, который связывается с мишенью, при этом мишень содержит мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель; при этом кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным, и при этом мишень представляет собой микроРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания содержит аптамерную последовательность, имеющую вторичную структуру, которая связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления мишень содержит молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым

полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования транскрипции молекулы ДНК. В некоторых вариантах осуществления мишень содержит белок. В некоторых вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию взаимодействия белка с другими молекулами. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой рецептор, и связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к активации рецептора. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой первый фермент, при этом кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со вторым ферментом, и при этом связывание первого и второго ферментов с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию ферментативной активности первого и второго ферментов. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой убиквитинлигазу. В некоторых вариантах осуществления мишень содержит молекулу матричной РНК (mRNA). В некоторых вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования трансляции молекулы mRNA. В некоторых вариантах осуществления мишень содержит рибосому. В некоторых вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования процессу трансляции. В некоторых вариантах осуществления мишень содержит кольцевую молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к секвестрации кольцевой молекулы РНК. В некоторых вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к секвестрации молекулы микроРНК.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мембраной клетки (например, мембраной клеточной стенки, мембраной органеллы и т. д.), при этом мембрана клетки содержит мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания содержит аптамерную последовательность, имеющую вторичную структуру, которая связывается с мембраной клетки (например, мембраной клеточной стенки, мембраной органеллы и т. д.). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью, при этом вторая мишень содержит второй РНК-связывающий мотив. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид связывается с мембраной клетки и второй мишенью. В некоторых

вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй клеточной мишенью, и при этом связывание клеточной мишени и второй клеточной мишени с кольцевым полирибонуклеотидом индуцирует конформационное изменение в клеточной мишени, за счет чего индуцируется передача сигнала в нисходящем направлении от клеточной мишени. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит по меньшей мере один структурный элемент, выбранный из группы, состоящей из: а) инкриптогена; б) сплайсингового элемента; с) регуляторной последовательности; d) репликативной последовательности; е) псевдодвухнитевой вторичной структуры; f) псевдоспиральной структуры и g) экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления псевдоспиральная структура содержит по меньшей мере один двухнитевой сегмент РНК с по меньшей мере одним сегментом, отличным от двухнитевого. В некоторых вариантах осуществления псевдоспиральная структура содержит первую последовательность и вторую последовательность, связанные с помощью повторяющейся последовательности. В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит сплайсинговый элемент. В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну модифицированную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из 2'-О-метил-, 2'-О-метоксиэтил- (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил-, 2'-дезоксидезокси-, Т-дезоксидезокси-2'-фтор-, 2'-О-аминопропил- (2'-О-АP), 2'-О-диметиламиноэтил- (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил- (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтил- (2'-О-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидомодифицированной (2'-О-NMA) нуклеиновой кислоты, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), нуклеиновой кислоты с этиленовым мостиком (ENA), пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA), 1',5'-ангидрогекситмодифицированной нуклеиновой кислоты (HNA), морфолиновой нуклеиновой кислоты, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор-N3-P5'-фосфорамидита. В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит по меньшей мере одну модифицированную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит сайт связывания белка. В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит сайт связывания иммунного белка. В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота характеризуется в по меньшей мере 2 раза меньшей иммуногенностью, чем ее эквивалент, в котором отсутствует инкриптоген, как оценивается

по экспрессии, передаче сигнала или активации по меньшей мере одного из RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR и IFN-бета. В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота имеет размер от приблизительно 20 оснований до приблизительно 20 т. о. В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота синтезируется посредством циркуляризации линейного полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота является в значительной степени устойчивой к разрушению.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью, при этом мишень содержит мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель, при этом кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и первую часть, которая содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 смежных немодифицированных нуклеотидов. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью, при этом мишень содержит мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель, при этом кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и первую часть, которая содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 смежных нуклеотидов, и при этом в первой части отсутствует псевдоуридин или 5'-метилцитидин. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания содержит аптамерную последовательность, имеющую вторичную структуру, которая связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется меньшей иммуногенностью, чем соответствующий немодифицированный кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется иммуногенностью, в по меньшей мере приблизительно 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более низкой по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом, как оценивается по экспрессии, или передаче сигнала, или активации по меньшей мере одного из группы, состоящей из RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR и IFN-бета. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется более высоким показателем периода полужизни по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым

полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется показателем периода полужизни, в по меньшей мере приблизительно 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более высоким по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления период полужизни измеряется путем введения кольцевого полирибонуклеотида или соответствующего немодифицированного кольцевого полирибонуклеотида в клетку и измерения уровня введенного кольцевого полирибонуклеотида или соответствующего кольцевого полирибонуклеотида внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из N(6)метиладенозина (m6A), 5'-метилцитидина и псевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из 2'-О-метил-, 2'-О-метоксиэтил- (2'-О-MOE), 2'-О-аминопропил-, 2'-дезоксид-, Т-дезоксид-2'-фтор-, 2'-О-аминопропил- (2'-О-AP), 2'-О-диметиламиноэтил- (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил- (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтил- (2'-О-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидомодифицированной (2'-О-NMA) нуклеиновой кислоты, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), нуклеиновой кислоты с этиленовым мостиком (ENA), пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA), 1',5'-ангидрогекситмодифицированной нуклеиновой кислоты (HNA), морфолиновой нуклеиновой кислоты, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор-N3-P5'-фосфорамидита. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% нуклеотидов кольцевого полирибонуклеотида представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт связывания, который связывается с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью, состоящий из немодифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит участок внутренней посадки рибосомы (IRES), состоящий из немодифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания состоит из немодифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания содержит IRES, состоящий из немодифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая часть содержит сайт связывания, который связывается с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью. В некоторых вариантах осуществления первая часть содержит IRES. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления

кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей и IRES, и при этом кольцевой полирибонуклеотид содержит 5'-метилцитидин, псевдоуридин или их комбинацию за пределами IRES. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида имеют конфигурацию, позволяющую им обладать более высокой эффективностью трансляции по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида характеризуются эффективностью трансляции, в по меньшей мере приблизительно 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8 или 3 раза более высокой по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида характеризуются более высокой эффективностью трансляции по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим первую часть, содержащую модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида характеризуются более высокой эффективностью трансляции по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим первую часть, содержащую более 10% модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида характеризуются эффективностью трансляции, в по меньшей мере приблизительно 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более высокой по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим первую часть, содержащую модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансляции измеряется в клетке, содержащей кольцевой полирибонуклеотид или соответствующий кольцевой полирибонуклеотид, либо в системе трансляции *in vitro* (например, в лизате ретикулоцитов кролика). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид представляет собой кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из раскрытых вариантов осуществления.

В некоторых аспектах способ лечения включает введение фармацевтической композиции согласно любому из ранее раскрытых вариантов осуществления субъекту, у которого имеется заболевание или состояние.

В некоторых аспектах способ получения фармацевтической композиции включает получение кольцевого полирибонуклеотида согласно любому из раскрытых вариантов осуществления.

В некоторых аспектах композиция согласно любому из вариантов осуществления составлена в носителе, например, мембране или липидном бислое.

В некоторых аспектах способ получения кольцевого полирибонуклеотида согласно любому из раскрытых вариантов осуществления включает циркуляризацию линейного полирибонуклеотида, имеющего такую же последовательность нуклеиновой кислоты, как и у кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых аспектах сконструированная клетка содержит композицию согласно любому из раскрытых вариантов осуществления.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Файл патента или заявки на патент содержит по меньшей мере одно графическое изображение, выполненное в цвете. Копии данного патента или публикации заявки на патент с цветным(цветными) графическим(графическими) изображением(изображениями) будут предоставлены Ведомством по запросу и при уплате соответствующей пошлины. Следующее подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения будет лучшим образом понято при прочтении вместе с прилагаемыми графическими материалами. С целью иллюстрации настоящего изобретения в графических материалах показаны варианты осуществления, которые представлены на примере в данном документе. Однако необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничено точной компоновкой и техническими средствами вариантов осуществления, показанных в графических материалах.

На **фиг. 1** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида.

На **фиг. 2** изображен пример кольцевого полирибонуклеотида с транс-рибозимной активностью.

На **фиг. 3** представлено схематическое изображение экспрессии белка, осуществляющейся с помощью кольцевого полирибонуклеотида.

На **фиг. 4** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида для липидов, таких как мембраны.

На **фиг. 5A** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида для ДНК.

На **фиг. 5B** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида с ДНК-связывающим мотивом, специфичным по отношению к последовательности. *circRNA* способна связываться с большой бороздкой ДНК-дуплекса с образованием параллельных или антипараллельных триплексных структур в зависимости от ориентации третьей нити. Иллюстративные параллельные триплексные структуры включают $TA \cdot U$, $CG \cdot G$ и $CG \cdot C$ (ДНК ДНК · РНК). Иллюстративные антипараллельные триплексные структуры включают $TA \cdot A$, $TA \cdot U$ и $CG \cdot G$ (ДНК ДНК · РНК).

На **фиг. 5C** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида с ДНК-связывающим мотивом, специфичным по отношению к энхансерной области гена *DHFR*, для препятствования связыванию с фактором транскрипции и/или транскрипции mRNA.

На **фиг. 5D** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида с ДНК-связывающим мотивом, специфичным по отношению к энхансерной области гена *MEG3*, для препятствования связыванию с фактором транскрипции и/или транскрипции mRNA.

На **фиг. 5E** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида с ДНК-связывающим мотивом, специфичным по отношению к энхансерной области гена *EPS*, для препятствования связыванию с фактором транскрипции и/или транскрипции mRNA.

На **фиг. 6** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида для РНК.

На **фиг. 7A** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида для РНК-мишеней для секвестрации и/или разрушения РНК-мишеней.

На **фиг. 7B** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида для РНК и ферментов, нацеливающихся на РНК (например, декэпирующих ферментов, которые индуцируют разрушение РНК).

На **фиг. 7C** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида для РНК, ДНК и белка (например, для управления трансляцией гена-мишени).

На **фиг. 8** изображен пример молекулярного каркаса кольцевого полирибонуклеотида для белка (например, FUS/TDP43/ATXN2, PRPF8, GEMIN5, CUGBP1 и LIN28A).

На **фиг. 9A, 9B и 9C** показано, что модифицированные кольцевые РНК связываются с аппаратом трансляции белка в клетках.

На **фиг. 10A, 10B и 10C** показано, что модифицированные кольцевые РНК характеризуются сниженным связыванием с иммунными белками, как оценивается по активации генов, связанных с иммунитетом (экспрессии MDA5, OAS и IFN-бета), по сравнению с немодифицированными кольцевыми РНК в клетках.

На **фиг. 11** показано, что гибридно-модифицированные кольцевые РНК характеризуются сниженной иммуногенностью по сравнению с немодифицированными кольцевыми РНК, как оценивается по экспрессии RIG-I, MDA5, IFN-бета и OAS в клетках.

На **фиг. 12** демонстрируется, что аптамер кольцевой РНК демонстрирует увеличенную внутриклеточную доставку и усиленное связывание с мишенью, представляющей собой малую молекулу, по сравнению с линейным аптамером.

На **фиг. 13** изображено связывание кольцевой РНК, содержащей мотив связывания с белком, с белком-мишенью.

На **фиг. 14** демонстрируется связывание конъюгата малой молекулы и кольцевой РНК с белком, который служит мишенью для малой молекулы.

На **фиг. 15** демонстрируется взаимодействие конъюгата кольцевой РНК и малой молекулы со специфическим биологически активным белком.

На **фиг. 16** изображена siRNA с двумя сайтами связывания, которая может выступать в качестве каркаса, например, для образования комплекса с ферментом (Enz) и субстратом-мишенью (субстрат), способствуя модификации (М) субстрата-мишени под действием фермента.

На **фиг. 17** показаны изображения, полученные в ходе проведения анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA), демонстрирующие, что РНК со скремблированными связывающими аптамерными последовательностями не демонстрировали сродство связывания с субъединицей p50 NF-κB, тогда как и линейная, и кольцевая РНК с NF-κB-связывающей аптамерной последовательностью связывались с субъединицей p50 со сходными показателями сродства.

На **фиг. 18** показано, что обработка с помощью кольцевой РНК с NF-κB-связывающей аптамерной последовательностью приводила к снижению жизнеспособности клеток A549 по сравнению с ее линейным эквивалентом.

На **фиг. 19** показано, что совместная обработка с помощью линейной РНК и доксорубина (Dox) приводила к снижению жизнеспособности клеток в день 2, и совместная обработка с помощью кольцевого аптамера и Dox приводила к большей гибели клеток как в день 1, так и в день 2 в линии раковых клеток легкого A549, устойчивой к Dox.

На **фиг. 20** показано схематическое изображение иллюстративной кольцевой РНК, которая доставляется в клетки и метит белок-мишень BRD4 в клетках для разрушения системой убиквитина.

На **фиг. 21** показаны изображения, полученные в ходе проведения вестерн-блоттинга, и количественная диаграмма, демонстрирующие, что кольцевая РНК, содержащая малые молекулы, представляющие собой талидомид и JQ1, была способна разрушать BRD4 в клетках.

На **фиг. 22** показана флуоресценция аптамера при его связывании с ТО1-биотином в разные моменты времени после доставки кольцевой РНК (замкнутого аптамера) или линейной РНК (линейного аптамера) в культуры клеток HeLa. На флуоресцентных изображениях (вверху) показана флуоресценция аптамера при его связывании с ТО1-биотином через 6 часов, в день 1 и день 10 после доставки кольцевой РНК (замкнутого аптамера) или линейной РНК (линейного аптамера). На диаграммах (внизу) показана процентная доля флуоресцирующих клеток в культурах клеток HeLa через 6 часов, в день 1, день 3, день 5, день 7, день 10 и день 12 после доставки кольцевой РНК (замкнутого аптамера), линейной РНК (линейного аптамера) или только ТО1-биотина (контроль).

На **фиг. 23** показаны связанные с HuR кольцевые РНК с HuR- и РНК-связывающим аптамерным мотивом и РНК, полученные в результате соосаждения со стрептавидином, с РНК-связывающими аптамерными мотивами по сравнению с кольцевой РНК без связывающих аптамерных мотивов, кольцевой РНК с HuR- и РНК-связывающим аптамерным мотивом и кольцевой РНК с РНК-связывающим аптамерным мотивом.

На **фиг. 24** показаны связанные с HuR кольцевые РНК с HuR- и ДНК-связывающим аптамерным мотивом и РНК, полученные в результате соосаждения со стрептавидином, с ДНК-связывающими аптамерными мотивами по сравнению с кольцевой РНК без связывающих аптамерных мотивов, кольцевой РНК с HuR- и ДНК-связывающим аптамерным мотивом и кольцевой РНК с ДНК-связывающим мотивом.

На **фиг. 25** показан более низкий уровень экспрессии секретируемого белка для кольцевой РНК без HuR-связывающего мотива по сравнению с кольцевой РНК с 1X HuR-связывающим мотивом, 2X HuR-связывающими мотивами и 3X HuR-связывающими мотивами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к фармацевтическим композициям и препаратам на основе кольцевых полирибонуклеотидов, а также путям их применения.

Несколько аспектов описываются ниже со ссылкой на иллюстративные пути применения с целью иллюстрации. Следует понимать, что многочисленные специфические детали, связи и способы изложены ниже для обеспечения полного понимания особенностей, описанных в данном документе. Средний специалист в соответствующей области техники, однако, с готовностью признает, что особенности, описанные в данном документе, могут реализовываться на практике при отсутствии одной или нескольких специфических деталей или при применении других способов. Особенности, описанные в данном документе, не ограничиваются проиллюстрированным порядком действий или событий, так как некоторые действия могут производиться в другом порядке и/или одновременно с другими действиями или событиями. Кроме того, не все проиллюстрированные действия или события являются необходимыми для реализации способов в соответствии с особенностями, описанными в данном документе.

Терминология, используемая в данном документе, предназначена для описания только конкретных случаев и не предполагается как ограничивающая. Используемые в данном документе формы единственного числа предполагаются как охватывающие также формы множественного числа, если в контексте четко не указывается иное. Кроме того, в той степени, в которой термины "включающий", "включает", "имеющий", "имеет", "с" или их варианты используются в подробном описании и/или в формуле изобретения, такие термины предполагаются как включительные подобно термину "содержащий".

Определения

Используемый в данном документе термин "сiсгRNA", или "кольцевая РНК", или "кольцевой полирибонуклеотид" относится к полирибонуклеотиду, который образует кольцевую структуру посредством ковалентных или нековалентных связей.

Используемый в данном документе термин "инкриптоген" относится к последовательности нуклеиновой кислоты в кольцевом полирибонуклеотиде, которая способствует ослаблению выявления иммунной клеткой, ускользанию от него и/или его избеганию и/или ослабляет индукцию иммунного ответа на кольцевой полирибонуклеотид.

Используемый в данном документе термин "экспрессионная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует продукт, например, пептид или полипептид, или регуляторной нуклеиновой кислоте.

Используемый в данном документе термин "сайт связывания иммунного белка" относится к нуклеотидной последовательности, которая связывается с иммунным белком и

способствует маскированию кольцевого полирибонуклеотида, являющегося отличным от эндогенного.

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

Используемая в данном документе фраза "псевдоспиральная структура" относится к структуре высшего порядка кольцевого полирибонуклеотида, где по меньшей мере часть кольцевого полирибонуклеотида свернута в спиральную структуру.

Используемая в данном документе фраза "псевдодвухнитевая вторичная структура" относится к структуре высшего порядка кольцевого полирибонуклеотида, где по меньшей мере часть кольцевого полирибонуклеотида образует двойную нить.

Используемый в данном документе термин "регуляторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая модифицирует продукт экспрессии.

Используемый в данном документе термин "повторяющаяся нуклеотидная последовательность" относится к повторяющейся последовательности нуклеиновой кислоты в пределах отрезка ДНК или во всем геноме. В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность включает в себя последовательности поли(CA) или поли(TG). В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность включает в себя повторяющиеся последовательности интронов из семейства Alu.

Используемый в данном документе термин "репликативный элемент" относится к последовательности и/или мотивам, которые являются применимыми для репликации или которые инициируют транскрипцию кольцевого полирибонуклеотида.

Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательной трансляции" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая избирательно инициирует или активирует трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде.

Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательного разрушения" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая инициирует трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде.

Используемый в данном документе термин "сдвигающая последовательность" относится к нуклеотидной последовательности, которая индуцирует рибосомальную паузу в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающая последовательность представляет собой неконсервативную последовательность аминокислот с сильной

склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность -D(V/I)ExNPGP, где x представляет собой любую аминокислоту.

Используемый в данном документе термин "в значительной степени устойчивый" относится к чему-либо, характеризующемуся устойчивостью, составляющей по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по сравнению с эталоном.

Используемый в данном документе термин "комплекс" относится к ассоциации между по меньшей мере двумя компонентами (например, химическими или биохимическими), обладающими сродством по отношению друг к другу. Например, по меньшей мере два компонента представляют собой мишень (например, белок) и кольцевую молекулу РНК.

Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к полимеру из двух или более аминокислот, соединенных посредством ковалентной связи (например, амидной связи). Полипептиды, описанные в данном документе, могут включать полноразмерные белки (например, полностью процессированные белки), а также более короткие аминокислотные последовательности (например, фрагменты белков, встречающихся в природе, или фрагменты синтетических полипептидов). Полипептиды могут содержать встречающиеся в природе аминокислоты (например, одну из двадцати аминокислот, обычно обнаруживаемых в пептидах, синтезирующихся в природе, и известных под однобуквенными аббревиатурами A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y и V) и не встречающиеся в природе аминокислоты (например, аминокислоты, которые не являются одной из двадцати аминокислот, обычно обнаруживаемых в пептидах, синтезирующихся в природе, в том числе синтетические аминокислоты, аналоги аминокислот и миметики аминокислот).

Используемый в данном документе термин "сайт связывания" относится к области кольцевого полирибонуклеотида, которая взаимодействует с другим объектом, например, химическим соединением, белком, нуклеиновой кислотой и т. д. Сайт связывания может содержать аптамерную последовательность.

Используемый в данном документе термин "связываемый компонент" относится к области мишени, с которой может связываться сайт связывания, например, к области, домену, фрагменту, эпитопу или части нуклеиновой кислоты (например, РНК, ДНК, гибридной молекулы РНК-ДНК), химического соединения, малой молекулы (например, лекарственного средства), аптамера, полипептида, белка, липида, углевода, антитела, вируса, вирусной частицы, мембраны, многокомпонентного комплекса, органеллы, клетки, других клеточных компонентов, любому их фрагменту и любой их комбинации.

Используемый в данном документе термин "аптамерная последовательность" относится к не встречающемуся в природе или синтетическому олигонуклеотиду, который специфично связывается с молекулой-мишенью. Как правило, аптамер содержит от 20 до 250 нуклеотидов. Как правило, аптамер связывается со своей мишенью благодаря вторичной структуре, а не благодаря гомологии последовательностей.

Используемый в данном документе термин "малая молекула" относится к органическому соединению, имеющему молекулярную массу, составляющую не более 900 дальтонов. Малая молекула обладает способностью к модулированию клеточного процесса или представляет собой флуорофор.

Используемый в данном документе термин "конъюгационный компонент" относится к модифицированному нуклеотиду, содержащему функциональную группу, для применения в способе конъюгации.

Используемый в данном документе термин "линейный эквивалент" относится к полирибонуклеотиду, имеющему такую же нуклеотидную последовательность и модификации нуклеиновой кислоты, как и кольцевой полирибонуклеотид, и имеющему два свободных конца (т. е. к нециркуляризованному варианту циркуляризованного 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.

Кольцевые полирибонуклеотиды

Кольцевые полирибонуклеотиды (circRNA), описанные в данном документе, представляют собой полирибонуклеотиды, которые образуют непрерывную структуру посредством ковалентных или нековалентных связей.

Настоящее изобретение, описанное в данном документе, включает композиции, содержащие синтетическую circRNA, и способы их применения. Благодаря кольцевой структуре circRNA может обладать улучшенной стабильностью, увеличенным периодом полужизни, сниженной иммуногенностью и/или улучшенными функциональными свойствами (например, в отношении функции, описанной в данном документе) по сравнению с соответствующей линейной РНК. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК поддается выявлению в течение по меньшей мере 5 дней после доставки кольцевой РНК в клетку. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК поддается выявлению в течение 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14

дней, 15 дней или 16 дней после доставки кольцевой РНК в клетку. Кольцевую РНК можно выявлять с помощью любой методики, известной из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления *circRNA* связывается с одной или несколькими мишенями. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* представляет собой кольцевой аптамер. В одном варианте осуществления *circRNA* содержит один или несколько сайтов связывания, которые связываются с одной или несколькими мишенями. В одном варианте осуществления *circRNA* содержит аптамерную последовательность. В одном варианте осуществления *circRNA* связывается как с ДНК-мишенью, так и с белком-мишенью и, например, опосредует транскрипцию. В другом варианте осуществления *circRNA* обеспечивает сборку белкового комплекса и, например, опосредует посттрансляционные модификации или передачу сигнала. В другом варианте осуществления *circRNA* связывается с двумя или более различными мишенями, такими как белки, и, например, переносит такие белки в цитоплазму или опосредует разрушение одной или нескольких из мишеней.

В некоторых вариантах осуществления *circRNA* связывается с по меньшей мере одним из ДНК, РНК и белков и тем самым регулирует клеточные процессы (например, изменяет экспрессию белка, модулирует экспрессию гена, модулирует передачу сигнала в клетке и т. д.). В некоторых вариантах осуществления синтетическая *circRNA* содержит сайты связывания для осуществления взаимодействия с мишенью или по меньшей мере одним компонентом, например, связываемым компонентом, ДНК, РНК или выбранных белков, конкурируя таким образом за связывание с эндогенным эквивалентом.

В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК образует комплекс, который регулирует клеточный процесс (например, изменяет экспрессию белка, модулирует экспрессию гена, модулирует передачу сигнала в клетке и т. д.). В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК повышает чувствительность клетки к цитотоксическому средству (например, химиотерапевтическому средству) посредством связывания с мишенью (например, фактором транскрипции), что приводит к снижению жизнеспособности клетки. Например, повышение чувствительности клетки к цитотоксическому средству приводит к снижению жизнеспособности клетки после доставки цитотоксического средства и кольцевой РНК. В некоторых вариантах осуществления снижение жизнеспособности клетки представляет собой снижение на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90%, или любое определяемое данным выражением процентное значение.

В некоторых вариантах осуществления комплекс поддается выявлению в течение по меньшей мере 5 дней после доставки кольцевой РНК в клетку. В некоторых вариантах

осуществления комплекс поддается выявлению в течение 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней или 16 дней после доставки кольцевой РНК в клетку.

В одном варианте осуществления синтетическая *circRNA* связывается с *miRNA* и/или секвестрирует ее. В другом варианте осуществления синтетическая *circRNA* связывается с белками и/или секвестрирует их. В другом варианте осуществления синтетическая *circRNA* связывается с *mRNA* и/или секвестрирует ее. В другом варианте осуществления синтетическая *circRNA* связывается с рибосомами и/или секвестрирует их. В другом варианте осуществления синтетическая *circRNA* связывается с *circRNA* и/или секвестрирует ее. В другом варианте осуществления синтетическая *circRNA* связывается с длинной некодирующей РНК (*lncRNA*) или любой другой некодирующей РНК, например, *miRNA*, *tRNA*, *rRNA*, *snoRNA*, *ncRNA*, *siRNA*, длинной некодирующей РНК, *shRNA*, и/или секвестрирует ее. Кроме сайтов связывания и/или секвестрации, *circRNA* может содержать разрушающий элемент, который будет приводить к разрушению связанных и/или секвестрированных РНК и/или белка.

В одном варианте осуществления *circRNA* содержит *lncRNA* или последовательность *lncRNA*, например, *circRNA* содержит последовательность встречающейся в природе некодирующей *lncRNA* или ее фрагмента. В одном варианте осуществления *lncRNA* или последовательность *lncRNA* циркуляризуется при наличии или отсутствии спейсерной последовательности с образованием синтетической *circRNA*.

В одном варианте осуществления *circRNA* обладает рибозимной активностью. В одном варианте осуществления *circRNA* может применяться, выступая в качестве рибозима и расщепляя патогенные или эндогенные РНК, ДНК, малые молекулы или белок. В одном варианте осуществления *circRNA* обладает ферментативной активностью. В одном варианте осуществления синтетическая *circRNA* обладает способностью к специфичному распознаванию и расщеплению РНК (например, вирусной РНК). В другом варианте осуществления *circRNA* обладает способностью к специфичному распознаванию и расщеплению белков. В другом варианте осуществления *circRNA* обладает способностью к специфичному распознаванию и разрушению малых молекул.

В одном варианте осуществления *circRNA* представляет собой разлагающуюся, или саморасщепляющуюся, или расщепляемую *circRNA*. В одном варианте осуществления *circRNA* может применяться для доставки РНК, например, *miRNA*, *tRNA*, *rRNA*, *snoRNA*, *ncRNA*, *siRNA*, длинной некодирующей РНК, *shRNA*. В одном варианте осуществления синтетическая *circRNA* образована из микроРНК, отделенных друг от друга (1) саморасщепляющимися элементами (например, рибозимом типа "головки молотка",

сплайсинговым элементом), (2) сайтами привлечения факторов расщепления (например, ADAR), (3) разрушаемым линкером (например, глицериновым), (4) химическим линкером и/или (5) спейсерной последовательностью. В другом варианте осуществления синтетическая *circRNA* образована из *siRNA*, отделенных друг от друга (1) саморасщепляющимися элементами (например, рибозимом типа "головки молотка", сплайсинговым элементом), (2) сайтами привлечения факторов расщепления (например, ADAR), (3) разрушаемым линкером (например, глицериновым), (4) химическим линкером и/или (5) спейсерной последовательностью.

В одном варианте осуществления *circRNA* представляет собой транскрипционно/репликационно компетентную *circRNA*. Данная *circRNA* может кодировать любой тип РНК. В одном варианте осуществления синтетическая *circRNA* имеет антисмысловую *miRNA* и транскрипционный элемент. В одном варианте осуществления после транскрипции из *circRNA* образуются линейные функциональные *miRNA*. В одном варианте осуществления *circRNA* представляет собой трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид.

В одном варианте осуществления *circRNA* имеет один или несколько из вышеперечисленных характерных признаков в комбинации с трансляционным элементом.

В некоторых вариантах осуществления *circRNA* содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* содержит по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* содержит по сути все (например, более 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99%, или приблизительно 100%) модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* содержит модифицированные нуклеотиды и часть, образованную немодифицированными смежными нуклеотидами, и она может называться гибридно-модифицированной *circRNA*. Часть, образованная немодифицированными смежными нуклеотидами, может представлять собой немодифицированный сайт связывания, имеющий конфигурацию, позволяющую ему связываться с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью в гибридно-модифицированной *circRNA*. Часть, образованная немодифицированными смежными нуклеотидами, может представлять собой немодифицированный IRES в гибридно-модифицированной *circRNA*. В других вариантах осуществления в *circRNA* отсутствуют модифицированные нуклеотиды, и она может называться немодифицированной *circRNA*.

Мишени

circRNA может содержать по меньшей мере один сайт связывания для мишени, например, для связываемого компонента мишени. *circRNA* может содержать по меньшей

мере одну аптамерную последовательность, которая связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления siRNA содержит один или несколько сайтов связывания для одной или нескольких мишеней. Мишени включают без ограничения нуклеиновые кислоты (например, РНК, ДНК, гибридные молекулы РНК-ДНК), малые молекулы (например, лекарственные средства, флуорофоры, метаболиты), аптамеры, полипептиды, белки, липиды, углеводы, антитела, вирусы, вирусные частицы, мембраны, многокомпонентные комплексы, органеллы, клетки, другие клеточные компоненты, любые их фрагменты и любую их комбинацию. (См., например, Fredriksson *et al.*, (2002) *Nat Biotech* 20:473-77; Gullberg *et al.*, (2004) *PNAS*, 101:8420-24). Например, мишень представляет собой однонитевую РНК, двухнитевую РНК, однонитевую ДНК, двухнитевую ДНК, ДНК или РНК, содержащие одну или несколько двухнитевых областей и одну или несколько однонитевых областей, гибридную молекулу РНК-ДНК, малую молекулу, аптамер, полипептид, белок, липид, углевод, антитело, фрагмент антитела, смесь антител, вирусную частицу, мембрану, многокомпонентный комплекс, клетку, клеточный компонент, любой их фрагмент или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой полипептид, белок или любой их фрагмент. Например, мишень может представлять собой очищенный полипептид, выделенный полипептид, слитый меченый полипептид, полипептид, прикрепленный к мембране клетки, или вируса, или вириона, или пронизывающий ее, цитоплазматический белок, внутриклеточный белок, внеклеточный белок, киназу, тирозинкиназу, серин/треониновую киназу, фосфатазу, ароматазу, фосфодиэстеразу, циклазу, геликазу, протеазу, оксидоредуктазу, редуктазу, трансферазу, гидролазу, лиазу, изомеразу, гликозилазу, белок внеклеточного матрикса, лигазу, убиквитинлигазу, любую лигазу, которая влияет на посттрансляционную модификацию, транспортер ионов, канал, пору, апоптотический белок, белок клеточной адгезии, патогенный белок, абберрантно экспрессирующийся белок, фактор транскрипции, регулятор транскрипции, белок, участвующий в трансляции, эпигенетический фактор, эпигенетический регулятор, регулятор хроматина, шаперон, секретлируемый белок, лиганд, гормон, цитокин, хемокин, ядерный белок, рецептор, трансмембранный рецептор, рецепторную тирозинкиназу, рецептор, сопряженный с G-белком, рецептор фактора роста, ядерный рецептор, рецептор гормона, передатчик сигнала, антитело, мембранный белок, интегральный мембранный белок, периферический мембранный белок, белок клеточной стенки, глобулярный белок, фибриллярный белок, гликопротеин, липопротеин, хромосомный белок, протоонкоген, онкоген, ген-супрессор опухолей, любой их фрагмент или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой гетерологичный

полипептид. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой белок, сверхэкспрессирующийся в клетке с помощью методик молекулярной биологии, таких как трансфекция. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой рекомбинантный полипептид. Например, мишень находится в образце, полученном из клетки бактерии (например, *E. coli*), дрожжей, млекопитающего или насекомого (например, белки, сверхэкспрессирующиеся организмами). В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой полипептид, имеющий мутацию, вставку, делецию или полиморфизм. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой полипептид, экспрессируемый клеткой естественным образом (например, здоровой клеткой или клеткой, ассоциированной с заболеванием или состоянием). В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой антиген, такой как полипептид, применяемый для иммунизации организма или для формирования иммунного ответа в организме, как, например, для выработки антител.

В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой антитело. Антитело может специфично связываться с другой молекулой с конкретной пространственной и полярной организацией. Антитело может представлять собой моноклональное, поликлональное или рекомбинантное антитело и может быть получено с помощью методик, хорошо известных из уровня техники, таких как иммунизация хозяина и сбор сыворотки крови (поликлональные), или посредством получения непрерывных гибридных линий клеток и сбора секретируемого белка (моноклональные), или посредством клонирования и экспрессии нуклеотидных последовательностей или их подвергнутых мутагенезу вариантов, кодирующих по меньшей мере аминокислотные последовательности, необходимые для специфического связывания природных антител. Встречающееся в природе антитело может представлять собой белок, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой с помощью дисульфидных связей. Каждая тяжелая цепь может содержать переменную область тяжелой цепи (V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи может содержать три домена — C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь может содержать переменную область легкой цепи (V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи может содержать один домен — C_L . Области V_H и V_L могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), в промежутках между которыми располагаются области, которые являются более консервативными, называемые каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке:

FR₁, CDR₁, FR₂, CDR₂, FR₃, CDR₃ и FR₄. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе разнообразными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классического пути активации системы комплемента. Антитела могут относиться к любому изотипу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂), подклассу или представлять собой их модифицированные варианты. Антитела могут включать в себя полноразмерный иммуноглобулин или его фрагменты. Фрагмент антитела может относиться к одному или нескольким фрагментам антитела, сохраняющим способность специфично связываться со связываемым компонентом, таким как антиген. Кроме того, также включены агрегаты, полимеры и конъюгаты иммуноглобулинов или их фрагментов при условии сохранения сродства связывания с конкретной молекулой. Примеры фрагментов антител включают Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; F(ab)₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных посредством дисульфидного мостика в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1}; Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H из одного плеча антитела; фрагмент однодоменного антитела (dAb) (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-46), который состоит из домена V_H; а также выделенный CDR и одноцепочечный фрагмент (scFv), в котором области V_L и V_H спарены с образованием моновалентной молекулы (известной как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird *et al.*, (1988) Science 242:423-26 и Huston *et al.*, (1988) PNAS 85:5879-83). Таким образом, фрагменты антител включают Fab, F(ab)₂, scFv, Fv, dAb и т. п. Хотя два домена V_L и V_H кодируются отдельными генами, они могут быть соединены рекомбинантными способами с помощью искусственного пептидного линкера, который обеспечивает их получение в виде одной белковой цепи. Такие одноцепочечные антитела содержат один или несколько антигенсвязывающих компонентов. Антитело может представлять собой поливалентное антитело, например, бивалентные, тривалентные, тетравалентные, пентавалентные, гексавалентные, гептавалентные или октавалентные антитела. Антитело может представлять собой полиспецифическое антитело. Например, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические, пентаспецифические, гексаспецифические, гептаспецифические или октаспецифические антитела могут быть получены, например, посредством соединения рекомбинантным способом комбинации из любых двух или более антигенсвязывающих средств (например, Fab, F(ab)₂, scFv, Fv, IgG). Полиспецифические антитела могут применяться для приведения в непосредственную близость двух или более мишеней, например, аппарата разрушения и субстрата-мишени, подлежащего разрушению, или

убиквитинлигазы и субстрата, подлежащего убиквитинированию. Эти фрагменты антител могут быть получены с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области, и фрагменты могут подвергаться скринингу в отношении полезности таким же образом, как и интактные антитела. Антитела могут представлять собой человеческие, гуманизированные, химерные, выделенные антитела, антитела собаки, кошки, осла, овцы, любого растения, животного или млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой полимерную форму рибонуклеотидов и/или дезоксирибонуклеотидов (аденина, гуанина, тимина или цитозина), таких как ДНК или РНК (например, mRNA). ДНК включает двухнитевую ДНК, обнаруживаемую в линейных молекулах ДНК (например, фрагментах рестрикции), вирусах, плаزمидах и хромосомах. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид-мишень представляет собой однонитевую, двухнитевую, малую интерферирующую РНК (siRNA), матричную РНК (mRNA), транспортную РНК (tRNA), хромосому, ген, некодирующую геномную последовательность, геномную ДНК (например, фрагментированную геномную ДНК), очищенный полинуклеотид, выделенный полинуклеотид, гибридизированный полинуклеотид, сайт связывания фактора транскрипции, митохондриальную ДНК, рибосомальную РНК, полинуклеотид эукариотической клетки, полинуклеотид прокариотической клетки, синтезированный полинуклеотид, лигированный полинуклеотид, рекомбинантный полинуклеотид, полинуклеотид, содержащий аналог нуклеиновой кислоты, метилированный полинуклеотид, деметилированный полинуклеотид, любой их фрагмент или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой рекомбинантный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой гетерологичный полинуклеотид. Например, мишень представляет собой полинуклеотид, полученный из клеток бактерий (например, *E. coli*), дрожжей, млекопитающих или насекомых (например, полинуклеотиды, гетерологичные по отношению к организмам). В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой полинуклеотид, имеющий мутацию, вставку, делецию или полиморфизм.

В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой аптамер. Аптамер представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, которая связывается с высокими специфичностью и сродством со связываемым компонентом или молекулой-мишенью, такой как белок. Аптамер представляет собой трехмерную структуру, удерживаемую в определенной(определенных) конформации(конформациях), которая обеспечивает химические контакты для специфического связывания с его указанной мишенью. Хотя аптамеры представляют собой молекулы на основе нуклеиновой кислоты,

между аптамерами и другими молекулами нуклеиновых кислот, такими как гены и mRNA, имеется фундаментальное отличие. В последнем случае структура нуклеиновой кислоты кодирует информацию посредством ее линейной последовательности оснований, и, таким образом, данная последовательность представляет важность в отношении функции хранения информации. В полную противоположность этому, функция аптамера, которая основана на специфичном связывании с молекулой-мишенью, зависит не полностью от консервативной линейной последовательности оснований (некодирующая последовательность), а скорее от конкретной вторичной/третичной/четвертичной структуры. Любой кодирующий потенциал, которым может обладать аптамер, является случайным и не считается играющим роль в процессе связывания аптамера с его когнатной мишенью. Аптамеры отличаются от встречающихся в природе последовательностей нуклеиновой кислоты, которые связываются с определенными белками. Эти последние последовательности представляют собой встречающиеся в природе последовательности, заключенные в пределах генома организма, которые связываются со специализированной подгруппой белков, участвующих в транскрипции, трансляции и транспортировке встречающихся в природе нуклеиновых кислот (например, белков, связывающихся с нуклеиновыми кислотами). В то же время аптамеры представляют собой не встречающиеся в природе молекулы нуклеиновых кислот. Хотя могут быть идентифицированы аптамеры, которые связывают белки, связывающиеся с нуклеиновыми кислотами, в большинстве случаев такие аптамеры обладают небольшой или нулевой идентичностью последовательности по отношению к последовательностям, распознаваемым белками, связывающимися с нуклеиновыми кислотами, в природе. Что еще более важно, аптамеры могут связываться с практически любым белком (не только белками, связывающимися с нуклеиновыми кислотами), а также почти любым партнером, представляющим интерес, в том числе с малыми молекулами, углеводами, пептидами и т. д. Для большинства партнеров, даже белков, не существует встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты, с которой они связываются. В случае с теми партнерами, для которых имеется такая последовательность, например, белками, связывающимися с нуклеиновыми кислотами, такие последовательности будут отличаться от аптамеров вследствие относительно низкого сродства связывания, используемого в природе, по сравнению с прочно связывающимися аптамерами. Аптамеры обладают способностью к специфичному связыванию с выбранными партнерами и модулированию активности партнера или его взаимодействий связывания, например, посредством связывания аптамеры могут блокировать способность к функционированию у своих партнеров. Функциональное свойство, заключающееся в специфичном связывании с партнером,

является неотъемлемым свойством аптамера. Аптамер может иметь молекулярную массу, составляющую от 6 до 35 кДа. Аптамер может иметь длину, составляющую от 20 до 250 нуклеотидов. Аптамер может связываться со своим партнером со сродством от микромолярного до субнаномолярного и может обеспечивать проведение различий между близкородственными мишенями (например, аптамеры могут избирательно связываться с родственными белками, принадлежащими к одному и тому же семейству генов). В некоторых случаях аптамер связывается только с одной молекулой. В некоторых случаях аптамер связывается с членами семейства, представителем которого является молекула, представляющая интерес. В некоторых случаях аптамер связывается с несколькими различными молекулами. Аптамеры обладают способностью к использованию часто наблюдаемых межмолекулярных взаимодействий, таких как образование водородных связей, виды электростатической комплементарности, гидрофобные контакты и стерическая эксклюзия, для связывания с конкретным партнером. Аптамеры обладают рядом требуемых характеристик для применения в качестве терапевтических средств и средств для диагностики, включая высокую специфичность и сродство, низкую иммуногенность, биологическую эффективность и превосходные фармакокинетические свойства. Аптамер может содержать молекулярную структуру "стебель-петля", образующуюся в результате гибридизации комплементарных полинуклеотидов, связанных посредством ковалентной связи (например, структуру, представляющую собой шпилечную петлю). Стебель содержит гибридизированные полинуклеотиды, а петля представляет собой область, в которой связаны между собой два комплементарных полинуклеотида посредством ковалентной связи. Аптамер может представлять собой линейную рибонуклеиновую кислоту (например, линейный аптамер), содержащую аптамерную последовательность, или кольцевую полирибонуклеиновую кислоту, содержащую аптамерную последовательность (например, кольцевой аптамер).

В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой малую молекулу. Например, малая молекула может представлять собой макроциклическую молекулу, ингибитор, лекарственное средство или химическое соединение. В некоторых вариантах осуществления малая молекула содержит не более пяти доноров водородных связей. В некоторых вариантах осуществления малая молекула содержит не более десяти акцепторов водородных связей. В некоторых вариантах осуществления малая молекула имеет молекулярную массу, составляющую 500 дальтонов или меньше. В некоторых вариантах осуществления малая молекула имеет молекулярную массу, составляющую от приблизительно 180 до 500 дальтонов. В некоторых вариантах осуществления малая молекула характеризуется коэффициентом распределения октанол/вода $\log P$,

составляющим не более пяти. В некоторых вариантах осуществления малая молекула характеризуется коэффициентом распределения $\log P$, составляющим от -0,4 до 5,6. В некоторых вариантах осуществления малая молекула характеризуется молярной рефракцией, составляющей от 40 до 130. В некоторых вариантах осуществления малая молекула содержит от приблизительно 20 до приблизительно 70 атомов. В некоторых вариантах осуществления малая молекула имеет площадь полярной поверхности, составляющую 140 ангстрем² или меньше.

В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой клетку. Например, мишень представляет собой интактную клетку, клетку, обработанную соединением (например, лекарственным средством), фиксированную клетку, лизированную клетку или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой одну клетку. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой множество клеток.

В некоторых вариантах осуществления *circRNA* содержит сайт связывания с одной мишенью или множеством (например, двумя или более) мишенями. В одном варианте осуществления отдельная *circRNA* содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различных сайтов связывания для отдельной мишени. В одном варианте осуществления отдельная *circRNA* содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более одинаковых сайтов связывания для одной мишени. В одном варианте осуществления отдельная *circRNA* содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различных сайтов связывания для одной или нескольких различных мишеней. В одном варианте осуществления две или более мишеней находятся в образце, таком как смесь или библиотека мишеней, и образец содержит *circRNA*, содержащую два или более сайта связывания, которые связываются с двумя или более мишенями.

В некоторых вариантах осуществления одна мишень или множество (например, две или более) мишеней имеют множество связываемых компонентов. В одном варианте осуществления одна мишень может иметь 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более связываемых компонентов. В одном варианте осуществления две или более мишеней находятся в образце, таком как смесь или библиотека мишеней, и образец содержит два или более связываемых компонента. В некоторых вариантах осуществления одна мишень или множество мишеней содержат множество различных связываемых компонентов. Например, множество может включать по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 25000 или 30000 связываемых компонентов.

Мишень может содержать множество связываемых компонентов, предусматривающее по меньшей мере 2 различных связываемых компонента. Например, связываемый компонент может предусматривать множество связываемых компонентов, содержащее по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 21000, 22000, 23000, 24000 или 25000 различных связываемых компонентов.

Сайты связывания и связываемые компоненты

В некоторых случаях circRNA содержит один сайт связывания. Сайт связывания может содержать аптамерную последовательность. В некоторых случаях circRNA содержит по меньшей мере два сайта связывания. Например, circRNA может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более сайтов связывания. В некоторых вариантах осуществления circRNA, описанная в данном документе, представляет собой молекулярный каркас, который связывает одну или несколько мишеней или один или несколько связываемых компонентов одной или нескольких мишеней. Каждая мишень может представлять собой, без ограничения, различные или одинаковые нуклеиновые кислоты (например, РНК, ДНК, гибридные молекулы РНК-ДНК), малые молекулы (например, лекарственные средства), аптамеры, полипептиды, белки, липиды, углеводы, антитела, вирусы, вирусные частицы, мембраны, многокомпонентные комплексы, клетки, клеточные компоненты, любые их фрагменты и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления один или несколько сайтов связывания связываются с одной и той же мишенью. В некоторых вариантах осуществления один или несколько сайтов связывания связываются с одним или несколькими связываемыми компонентами одной и той же мишени. В некоторых вариантах осуществления один или несколько сайтов связывания связываются с одной или несколькими различными мишенями. В некоторых вариантах осуществления один или несколько сайтов связывания связываются с одним или несколькими связываемыми компонентами различных мишеней. В некоторых вариантах осуществления circRNA выступает в качестве каркаса для связывания одной или нескольких мишеней. В некоторых вариантах осуществления circRNA выступает в качестве каркаса для одного или нескольких связываемых компонентов одной или нескольких мишеней. В некоторых вариантах осуществления circRNA модулирует клеточные процессы посредством специфичного связывания с одной или несколькими мишенями. В некоторых вариантах осуществления circRNA модулирует клеточные процессы посредством специфичного связывания с одним или несколькими связываемыми компонентами одной или нескольких мишеней. В некоторых вариантах осуществления circRNA модулирует

клеточные процессы посредством специфического связывания с одной или несколькими мишенями. В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, содержит сайты связывания для одной или нескольких конкретных мишеней, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* содержит несколько сайтов связывания или комбинацию сайтов связывания для каждой мишени, представляющей интерес. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* содержит несколько сайтов связывания или комбинацию сайтов связывания для каждого связываемого компонента, представляющего интерес. Например, *circRNA* может содержать один или несколько сайтов связывания для полипептида-мишени. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* содержит один или несколько сайтов связывания для полинуклеотида-мишени, такого как ДНК или РНК, mRNA-мишень, rRNA-мишень, tRNA-мишень или геномная ДНК-мишень.

В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для одонитевой ДНК. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для двухнитевой ДНК. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для антитела. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для вирусной частицы. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для малой молекулы. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связывания в клетке или на клетке. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для гибридной молекулы РНК-ДНК. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для метилированного полинуклеотида. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для неметилированного полинуклеотида. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для аптамера. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для полипептида. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для полипептида, белка, фрагмента белка, меченого белка, антитела, фрагмента антитела, малой молекулы, вирусной частицы (например, вирусной частицы, содержащей трансмембранный белок) или клетки. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в одонитевой ДНК. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в двухнитевой ДНК. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в антителе. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в вирусной частице. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в малой молекуле. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в клетке или на клетке. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в гибридной молекуле РНК-ДНК. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого

компонента в метилированном полинуклеотиде. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в неметилованном полинуклеотиде. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в аптамере. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в полипептиде. В некоторых случаях *circRNA* содержит сайт связывания для связываемого компонента в полипептиде, белке, фрагменте белка, меченом белке, антителе, фрагменте антитела, малой молекуле, вирусной частице (например, вирусной частице, содержащей трансмембранный белок) или клетке.

В некоторых случаях сайт связывания связывается с частью мишени, содержащей по меньшей мере две амидные связи. В некоторых случаях сайт связывания не связывается с частью мишени, содержащей фосфодиэфирную связь. В некоторых случаях часть мишени не представляет собой ДНК или РНК. В некоторых случаях связываемый компонент содержит по меньшей мере две амидные связи. В некоторых случаях связываемый компонент не содержит фосфодиэфирную связь. В некоторых случаях связываемый компонент не представляет собой ДНК или РНК.

circRNA, предусмотренные в данном документе, могут содержать один или несколько сайтов связывания для связываемых компонентов в комплексе. *circRNA*, предусмотренные в данном документе, могут содержать один или несколько сайтов связывания с мишенью для образования комплекса. Например, *circRNA*, предусмотренные в данном документе, могут выступать в качестве каркаса для образования комплекса между *circRNA* и мишенью. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* образует комплекс с одной мишенью. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* образует комплекс с двумя мишенями. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* образует комплекс с тремя мишенями. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* образует комплекс с четырьмя мишенями. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* образует комплекс с пятью или более мишенями. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* образует комплекс с комплексом, состоящим из двух или более мишеней. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* образует комплекс с комплексом, состоящим из трех или более мишеней. В некоторых вариантах осуществления две или более *circRNA* образуют комплекс с одной мишенью. В некоторых вариантах осуществления две или более *circRNA* образуют комплекс с двумя или более мишенями. В некоторых вариантах осуществления первая *circRNA* образует комплекс с первым связываемым компонентом первой мишени и вторым отличающимся связываемым компонентом второй мишени. В некоторых вариантах осуществления первая *circRNA* образует комплекс с первым связываемым компонентом

первой мишени, и вторая circRNA образует комплекс со вторым связываемым компонентом второй мишени.

В некоторых вариантах осуществления circRNA может содержать сайт связывания для одного или нескольких комплексов антитело-полипептид, комплексов полипептид-полипептид, комплексов полипептид-ДНК, комплексов полипептид-РНК, комплексов полипептид-аптамер, комплексов вирусная частица-антитело, комплексов вирусная частица-полипептид, комплексов вирусная частица-ДНК, комплексов вирусная частица-РНК, комплексов вирусная частица-аптамер, комплексов клетка-антитело, комплексов клетка-полипептид, комплексов клетка-ДНК, комплексов клетка-РНК, комплексов клетка-аптамер, комплексов малая молекула-полипептид, комплексов малая молекула-ДНК, комплексов малая молекула-аптамер, комплексов малая молекула-клетка, комплексов малая молекула-вирусная частица и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления circRNA может содержать сайт связывания для одного или нескольких связываемых компонентов в одном или нескольких комплексах антитело-полипептид, комплексах полипептид-полипептид, комплексах полипептид-ДНК, комплексах полипептид-РНК, комплексах полипептид-аптамер, комплексах вирусная частица-антитело, комплексах вирусная частица-полипептид, комплексах вирусная частица-ДНК, комплексах вирусная частица-РНК, комплексах вирусная частица-аптамер, комплексах клетка-антитело, комплексах клетка-полипептид, комплексах клетка-ДНК, комплексах клетка-РНК, комплексах клетка-аптамер, комплексах малая молекула-полипептид, комплексах малая молекула-ДНК, комплексах малая молекула-аптамер, комплексах малая молекула-клетка, комплексах малая молекула-вирусная частица и их комбинациях.

В некоторых случаях сайт связывания связывается с полипептидом, белком или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью полипептида, белка или его фрагмента в мишени. Например, сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью выделенного полипептида, полипептида в клетке, очищенного полипептида или рекомбинантного полипептида. Например, сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью антитела или его фрагмента. Например, сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью фактора транскрипции. Например, сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью рецептора. Например, сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью трансмембранного рецептора. Сайты связывания могут связываться с доменом,

фрагментом, эпитопом, областью или частью выделенных, очищенных и/или рекомбинантных полипептидов. Сайты связывания могут связываться с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью смеси аналитов (например, лизата). Например, сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью, полученными из множества клеток или полученными из лизата одной клетки. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом мишени. В некоторых случаях связываемый компонент находится в полипептиде, белке или его фрагменте. В некоторых вариантах осуществления связываемый компонент содержит домен, фрагмент, эпитоп, область или часть полипептида, белка или его фрагмента. Например, связываемый компонент содержит домен, фрагмент, эпитоп, область или часть выделенного полипептида, полипептида в клетке, очищенного полипептида или рекомбинантного полипептида. Например, связываемый компонент содержит домен, фрагмент, эпитоп, область или часть антитела или его фрагмента. Например, связываемый компонент содержит домен, фрагмент, эпитоп, область или часть фактора транскрипции. Например, связываемый компонент содержит домен, фрагмент, эпитоп, область или часть рецептора. Например, связываемый компонент содержит домен, фрагмент, эпитоп, область или часть трансмембранного рецептора. Связываемые компоненты могут находиться в домене, фрагменте, эпитопе, области или части выделенных, очищенных и/или рекомбинантных полипептидов или содержать таковые. Связываемые компоненты включают связываемые компоненты, находящиеся в домене, фрагменте, эпитопе, области или части смеси аналитов (например, лизата) или представляющие собой таковые. Например, связываемые компоненты находятся в домене, фрагменте, эпитопе, области или части, полученных из множества клеток или из лизата одной клетки, или содержат таковые.

В некоторых случаях сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью химического соединения (например, малой молекулы). Например, сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью лекарственного средства. Например, сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью соединения. Например, связываемый компонент связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью органического соединения. В некоторых случаях сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью малой молекулы, имеющей молекулярную массу, составляющую 900 дальтонов или меньше. В некоторых случаях сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью малой молекулы, имеющей молекулярную массу, составляющую 500 дальтонов или больше. Часть малой молекулы, с которой связывается сайт связывания, может быть получена, например, из

библиотеки встречающихся в природе или синтетических молекул, в том числе из библиотеки соединений, полученных посредством комбинаторных способов, т. е. комбинаторной библиотеки разнообразия соединений. Комбинаторные библиотеки, а также способы их получения и скрининга известны из уровня техники и описаны в US 5741713; 5734018; 5731423; 5721099; 5708153; 5698673; 5688997; 5688696; 5684711; 5641862; 5639603; 5593853; 5574656; 5571698; 5565324; 5549974; 5545568; 5541061; 5525735; 5463564; 5440016; 5438119; 5223409, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом малой молекулы. В некоторых случаях связываемый компонент находится в домене, фрагменте, эпитопе, области или части малой молекулы или содержит таковые. Например, связываемый компонент находится в домене, фрагменте, эпитопе, области или части лекарственного средства или содержит таковые. Например, связываемый компонент находится в домене, фрагменте, эпитопе, области или части соединения или содержит таковые. Например, связываемый компонент находится в домене, фрагменте, эпитопе, области или части органического соединения или содержит таковые. В некоторых случаях связываемый компонент находится в домене, фрагменте, эпитопе, области или части малой молекулы, имеющей молекулярную массу, составляющую 900 дальтонов или меньше, или содержит таковые. В некоторых случаях связываемый компонент находится в домене, фрагменте, эпитопе, области или части малой молекулы, имеющей молекулярную массу, составляющую 500 дальтонов или больше, или содержит таковые. Связываемые компоненты могут быть получены, например, из библиотеки встречающихся в природе или синтетических молекул, в том числе из библиотеки соединений, полученных посредством комбинаторных способов, т. е. комбинаторной библиотеки разнообразия соединений. Комбинаторные библиотеки, а также способы их получения и скрининга известны из уровня техники и описаны в US 5741713; 5734018; 5731423; 5721099; 5708153; 5698673; 5688997; 5688696; 5684711; 5641862; 5639603; 5593853; 5574656; 5571698; 5565324; 5549974; 5545568; 5541061; 5525735; 5463564; 5440016; 5438119; 5223409, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Сайт связывания может связываться с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью члена конкретной связывающейся пары (например, лиганда). Сайт связывания может связываться с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью моновалентной (моноэпитопной) или поливалентной (полиэпитопной) мишени. Сайт связывания может связываться с антигенной или гаптенной частью мишени. Сайт связывания может связываться с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью одной молекулы или множества молекул, обладающих по меньшей мере одним общим

эпитопом или детерминантным сайтом. Сайт связывания может связываться с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью в части клетки (например, клетки бактерии, клетки растения или клетки животного). Сайт связывания может связываться с мишенью, которая находится в естественной среде (например, в ткани), культивируемой клетке или микроорганизме (например, бактерии, грибе, простейшем или вирусе) или лизированной клетке. Сайт связывания может связываться с частью мишени, которая является модифицированной (например, химическим способом) с обеспечением одного или нескольких дополнительных сайтов связывания, таких как, без ограничения, краситель (например, флуоресцентный краситель), компонент, модифицирующий полипептид, такой как фосфатная группа, углеводная группа и т. п., или компонент, модифицирующий полинуклеотид, такой как метильная группа. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом члена конкретной связывающейся пары. Связываемый компонент может находиться в домене, фрагменте, эпитопе, области или части члена конкретной связывающейся пары (например, лиганда) или содержать таковые. Связываемый компонент может находиться в домене, фрагменте, эпитопе, области или части моновалентной (моноэпитопной) или мновалентной (полиэпитопной) мишени или содержать таковые. Связываемый компонент может быть антигенным или гаптенным. Связываемый компонент может находиться в домене, фрагменте, эпитопе, области или части одной молекулы или множества молекул, имеющих по меньшей мере один общий эпитоп или детерминантный сайт, или содержать таковые. Связываемый компонент может находиться в домене, фрагменте, эпитопе, области или части в части клетки (например, клетки бактерии, клетки растения или клетки животного) или содержать таковые. Связываемый компонент может находиться в естественной среде (например, в ткани), культивируемой клетке или микроорганизме (например, бактерии, грибе, простейшем или вирусе) или лизированной клетке. Связываемый компонент может быть модифицированным (например, химическим способом) с обеспечением одного или нескольких дополнительных сайтов связывания, таких как, без ограничения, краситель (например, флуоресцентный краситель), компонент, модифицирующий полипептид, такой как фосфатная группа, углеводная группа и т. п., или компонент, модифицирующий полинуклеотид, такой как метильная группа.

В некоторых случаях сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью молекулы, находящейся в образце, полученном от хозяина. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом молекулы, находящейся в образце, полученном от хозяина. В некоторых случаях связываемый компонент находится в домене, фрагменте, эпитопе, области или части молекулы, находящейся в образце,

полученном от хозяина, или содержит таковые. Образец, полученный от хозяина, включает биологическую жидкость (например, мочу, кровь, плазму крови, сыворотку крови, слюну, семенную жидкость, стул, мокроту, спинномозговую жидкость, слезы, слизь и т. п.). Образец может быть подвергнут непосредственному исследованию или может быть подвергнут предварительной обработке для того, чтобы сделать связываемый компонент более легко поддающимся выявлению. Образцы содержат некоторое количество вещества от живого организма или ранее бывших живыми организмов. Образец может быть природным, рекомбинантным, синтетическим или не встречающимся в природе. Сайт связывания может связываться с любым из вышеупомянутого, экспрессирующимся в клетке естественным образом или рекомбинантным способом, находящимся в клеточном лизате или среде для культивирования клеток, в образце, полученном в результате трансляции *in vitro*, или полученным с помощью иммунопреципитации из образца (например, клеточного лизата). Связываемый компонент может являться любым из вышеупомянутого, экспрессирующимся в клетке естественным образом или рекомбинантным способом, находящимся в клеточном лизате или среде для культивирования клеток, в образце, полученном в результате трансляции *in vitro*, или полученным с помощью иммунопреципитации из образца (например, клеточного лизата).

В некоторых случаях сайт связывания связывается с мишенью, экспрессирующейся в бесклеточной системе или *in vitro*. Например, сайт связывания связывается с мишенью в клеточном экстракте. В некоторых случаях сайт связывания связывается с мишенью в клеточном экстракте с ДНК-матрицей и реагентами для осуществления транскрипции и трансляции. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом мишени, экспрессирующейся в бесклеточной системе или *in vitro*. В некоторых случаях связываемый компонент мишени экспрессируется в бесклеточной системе или *in vitro*. Например, связываемый компонент мишени находится в клеточном экстракте. В некоторых случаях связываемый компонент мишени находится в клеточном экстракте с ДНК-матрицей и реагентами для осуществления транскрипции и трансляции. Иллюстративные источники клеточных экстрактов, которые могут применяться, включают зародыши пшеницы, *Escherichia coli*, ретикулоциты кролика, гипертермофилы, гибридомы, ооциты *Xenopus*, клетки насекомых и клетки млекопитающих (например, клетки человека). Иллюстративные бесклеточные способы, которые могут применяться для экспрессии полипептидов-мишеней (например, для получения полипептидов-мишеней на микрочипе), включают способы с применением белковых микрочипов *in situ* (PISA), методики многократного точечного нанесения (MIST), трансляции самособирающейся mRNA, белкового микрочипа, программируемого нуклеиновой кислотой (NAPPA), NAPPA в нанолунках,

получения белковых микрочипов из ДНК-микрочипов (DAPA), безмембранного DAPA, копирования в нанолунках и микролитографии μ IP, а также копирования белковых микрочипов РМаС (см. Kilb *et al.*, *Eng. Life Sci.* 2014, 14, 352–364).

В некоторых случаях сайт связывания связывается с мишенью, синтезированной *in situ* (например, на твердой подложке микрочипа) из ДНК-матрицы. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом мишени, синтезированным *in situ*. В некоторых случаях связываемый компонент мишени синтезируется *in situ* (например, на твердой подложке микрочипа) из ДНК-матрицы. В некоторых случаях множество связываемых компонентов синтезируется *in situ* из множества соответствующих ДНК-матриц параллельно или в ходе одной реакции. Иллюстративные способы экспрессии полипептидов-мишеней *in situ* включают способы, описанные в Stevens, *Structure* 8(9): R177-R185 (2000); Katzen *et al.*, *Trends Biotechnol.* 23(3):150–6 (2005); He *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 19(1):4–9 (2008); Ramachandran *et al.*, *Science* 305(5680):86–90 (2004); He *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 29(15):E73-3 (2001); Angenendt *et al.*, *Mol. Cell Proteomics* 5(9): 1658–66 (2006); Tao *et al.*, *Nat Biotechnol* 24(10):1253–4 (2006); Angenendt *et al.*, *Anal. Chem.* 76(7):1844–9 (2004); Kinpara *et al.*, *J. Biochem.* 136(2):149–54 (2004); Takulapalli *et al.*, *J. Proteome Res.* 11(8):4382-91 (2012); He *et al.*, *Nat. Methods* 5(2):175–7 (2008); Chatterjee and J. LaBaer, *Curr Opin Biotech* 17(4):334–336 (2006); He and Wang, *Biomol Eng* 24(4):375–80 (2007); а также He and Taussig, *J. Immunol. Methods* 274(1–2):265–70 (2003).

В некоторых случаях сайт связывания связывается с нуклеиновой кислотой-мишенью, содержащей участок из по меньшей мере 6 нуклеотидов, например, по меньшей мере 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 или 100 нуклеотидов. В некоторых случаях сайт связывания связывается с белком-мишенью, содержащим непрерывный отрезок из нуклеотидов. В некоторых случаях сайт связывания связывается с белком-мишенью, содержащим прерывистый отрезок из нуклеотидов. В некоторых случаях сайт связывания связывается с нуклеиновой кислотой-мишенью, содержащей сайт мутации или функциональной мутации, включающей делецию, вставку, обмен или усечение нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых случаях связываемый компонент нуклеиновой кислоты-мишени содержит участок из по меньшей мере 6 нуклеотидов, например, по меньшей мере 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 или 100 нуклеотидов. В некоторых случаях связываемый компонент белка-мишени содержит непрерывный отрезок из нуклеотидов. В некоторых случаях связываемый компонент белка-мишени содержит прерывистый отрезок из нуклеотидов. В некоторых случаях связываемый компонент нуклеиновой кислоты-мишени содержит сайт мутации

или функциональной мутации, включающей делецию, вставку, обмен или усечение нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты.

В некоторых случаях сайт связывания связывается с белком-мишенью, содержащим участок из по меньшей мере 6 аминокислот, например, по меньшей мере 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 или 100 аминокислот. В некоторых случаях сайт связывания связывается с белком-мишенью, содержащим непрерывный отрезок из аминокислот. В некоторых случаях сайт связывания связывается с белком-мишенью, содержащим прерывистый отрезок из аминокислот. В некоторых случаях сайт связывания связывается с белком-мишенью, содержащим сайт мутации или функциональной мутации, включающей делецию, вставку, обмен или усечение аминокислот в полипептидной последовательности. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом белка-мишени. В некоторых случаях связываемый компонент белка-мишени содержит участок из по меньшей мере 6 аминокислот, например, по меньшей мере 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 или 100 аминокислот. В некоторых случаях связываемый компонент белка-мишени содержит непрерывный отрезок из аминокислот. В некоторых случаях связываемый компонент белка-мишени содержит прерывистый отрезок из аминокислот. В некоторых случаях связываемый компонент белка-мишени содержит сайт мутации или функциональной мутации, включающей делецию, вставку, обмен или усечение аминокислот в полипептидной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания связывается с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью мембраносвязанного белка. Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом мембраносвязанного белка. В некоторых вариантах осуществления связываемый компонент находится в домене, фрагменте, эпитопе, области или части мембраносвязанного белка или содержит таковые. Иллюстративные мембраносвязанные белки включают без ограничения GPCR (например, адренергические рецепторы, рецепторы ангиотензина, рецепторы холецистокинина, мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, рецепторы нейротензина, рецепторы галанина, дофаминовые рецепторы, опиоидные рецепторы, серотониновые рецепторы, рецепторы соматостатина и т. д.), ионные каналы (например, никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, натриевые каналы, калиевые каналы и т. д.), каналы невозбудимых и возбудимых клеток, рецепторные тирозинкиназы, рецепторные серин/треониновые киназы, рецепторные гуанилатциклазы, рецепторы факторов роста и гормонов (например, рецептор эпидермального фактора роста (EGF)) и другие. Сайт связывания может связываться с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью мутантных или модифицированных вариантов мембраносвязанных белков. Сайт связывания может связываться со

связываемым компонентом мутантного или модифицированного варианта мембраносвязанного белка. Связываемый компонент может также находиться в домене, фрагменте, эпитопе, области или части мутантных или модифицированных вариантов мембраносвязанных белков или содержать таковые. Например, некоторые одиночные или множественные точечные мутации GPCR сохраняют функцию и вовлечены в заболевание (см., например, Stadel *et al.*, (1997) *Trends in Pharmacological Review* 18:430-37).

Сайт связывания связывается, например, с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью убиквитинлигазы. Сайт связывания связывается, например, с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью адаптера убиквитина, адаптера протеасомы или белка протеасомы. Сайт связывания связывается, например, с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью белка, участвующего в эндоцитозе, фагоцитозе, лизосомном пути, аутофагическом пути, макроаутофагии, микроаутофагии, шаперон-опосредованной аутофагии, пути, опосредованном мультивезикулярными тельцами, или их комбинацией. В некоторых случаях сайт связывания связывается со связываемым компонентом. Связываемый компонент может содержать, например, домен, фрагмент, эпитоп, область или часть убиквитинлигазы. Связываемый компонент может содержать, например, домен, фрагмент, эпитоп, область или часть адаптера убиквитина, адаптера протеасомы или белка протеасомы. Связываемый компонент может содержать, например, домен, фрагмент, эпитоп, область или часть белка, участвующего в эндоцитозе, фагоцитозе, лизосомном пути, аутофагическом пути, макроаутофагии, микроаутофагии, шаперон-опосредованной аутофагии, пути, опосредованном мультивезикулярными тельцами, или их комбинацию.

Сайт связывания связывается, например, с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью белка, ассоциированного с заболеванием или состоянием. Сайт связывания связывается, например, с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью протоонкогена. Сайт связывания связывается, например, с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью онкогена. Сайт связывания связывается, например, с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью гена-супрессора опухолей. Сайт связывания связывается, например, с доменом, фрагментом, эпитопом, областью или частью воспалительного гена (например, гена цитокина). Сайт связывания может связываться со связываемым компонентом. Связываемый компонент может содержать, например, домен, фрагмент, эпитоп, область или часть белка, ассоциированного с заболеванием или состоянием. Связываемый компонент может содержать, например, домен, фрагмент, эпитоп, область или часть протоонкогена. Связываемый компонент может содержать, например, домен, фрагмент, эпитоп, область или часть онкогена. Связываемый

компонент может содержать, например, домен, фрагмент, эпитоп, область или часть гена-супрессора опухолей. Связываемый компонент может содержать, например, домен, фрагмент, эпитоп, область или часть воспалительного гена (например, гена цитокина).

На **фиг. 1** показан пример кольцевого полирибонуклеотида с РНК-связывающим мотивом, специфичным по отношению к последовательности, ДНК-связывающим мотивом, специфичным по отношению к последовательности, и связывающим мотивом, специфичным по отношению к белку. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* может содержать другие связывающие мотивы для связывания с другими внутриклеточными молекулами. Неограничивающие примеры путей применения *circRNA* перечислены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

Процесс	МОА (пример)
Управляемая транскрипция	ДНК- <i>circRNA</i> -белок (<i>pol</i> , <i>TF</i>)
Эпигенетическое ремоделирование	ДНК- <i>circRNA</i> -белок (<i>SWI/SNF</i>)
Препятствование транскрипции	<i>circRNA</i> -ДНК
Препятствование трансляции	<i>circRNA</i> -mRNA или рибосома
Ингибирование взаимодействия белков	<i>circRNA</i> -белок
Разрушение белка	Белок- <i>circRNA</i> -белок (<i>убиквитин</i>)
Разрушение РНК	РНК- <i>circRNA</i> -РНК (<i>от РНКазы к РНК</i>)
Разрушение ДНК	ДНК- <i>circRNA</i> -белок (<i>от ДНК к ДНКазе</i>)
Искусственный рецептор	Клеточная поверхность- <i>circRNA</i> -субстрат
Транслокация белка	Белок- <i>circRNA</i> -белок/РНК
Слияние клеток	Клеточная поверхность- <i>circRNA</i> -клеточная поверхность
Разъединение комплекса	Белок- <i>circRNA</i> -белок/РНК
Ингибирование рецептора	Белок- <i>circRNA</i> -субстрат

Процесс	МОА (пример)
Передача сигнала	Белок-circRNA-белок (каспаза)
Ускорение работы мультиферментного комплекса	Мультиферментный комплекс-circRNA
Индукция рецептора	circRNA-рецептор

Сайты связывания с РНК

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания с РНК. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сайты связывания с РНК, которые модифицируют экспрессию эндогенного гена и/или экзогенного гена. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с РНК модулирует экспрессию гена хозяина. Сайт связывания с РНК может содержать последовательность, которая гибридизируется с эндогенным геном (например, последовательность для miRNA, siRNA, mRNA, lncRNA, РНК, ДНК, антисмысловой РНК, gRNA, описанных в данном документе), последовательность, которая гибридизируется с экзогенной нуклеиновой кислотой, такой как вирусная ДНК или РНК, последовательность, которая гибридизируется с РНК, последовательность, которая препятствует транскрипции гена, последовательность, которая препятствует трансляции РНК, последовательность, которая стабилизирует РНК или дестабилизирует РНК, как, например, посредством нацеливания для разрушения, или последовательность, которая модулирует ДНК- или РНК-связывающий фактор. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая связывается с РНК. Аптамерная последовательность может связываться с эндогенным геном (например, последовательность для miRNA, siRNA, mRNA, lncRNA, РНК, ДНК, антисмысловой РНК, gRNA, описанных в данном документе), с экзогенной нуклеиновой кислотой, такой как вирусная ДНК или РНК, с РНК, с последовательностью, которая препятствует транскрипции гена, с последовательностью, которая препятствует трансляции РНК, с последовательностью, которая стабилизирует РНК или дестабилизирует РНК, как, например, посредством нацеливания для разрушения, или с последовательностью, которая модулирует ДНК- или РНК-связывающий фактор. Вторичная структура аптамерной последовательности может связываться с РНК. Кольцевая РНК может образовывать комплекс с РНК посредством связывания аптамерной последовательности с РНК.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с РНК может представлять собой один из сайтов связывания с tRNA, lncRNA, lincRNA, miRNA, rRNA, snRNA,

микроРНК, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA, exRNA, scaRNA, Y-РНК и hnRNA. Сайты связывания с РНК хорошо известны средним специалистам в данной области.

Определенные сайты связывания с РНК могут ингибировать экспрессию генов посредством биологического процесса РНК-интерференции (RNAi). В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды содержат молекулу для RNAi с РНК- или РНК-подобными структурами, как правило, имеющими 15-50 пар оснований (как, например, приблизительно 18-25 пар оснований) и имеющими последовательность нуклеиновых оснований, идентичную (комплементарную) или практически идентичную (по сути комплементарную) кодирующей последовательности в экспрессируемом гене-мишени в клетке. Молекулы для RNAi включают без ограничения короткие интерферирующие РНК (siRNA), двухнитевые РНК (dsRNA), микроРНК (miRNA), короткие шпилечные РНК (shRNA), меродуплексы и субстраты дайсера.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с РНК содержит siRNA или shRNA. siRNA и shRNA имеют сходство с промежуточными соединениями в пути процессинга генов эндогенной microRNA. В некоторых случаях siRNA могут функционировать в качестве miRNA и наоборот. МикроРНК, как и siRNA, могут использовать RISC для подавления экспрессии генов-мишеней, однако, в отличие от siRNA, большинство miRNA животных не расщепляют mRNA. Вместо этого miRNA уменьшают выход белка посредством подавления трансляции или удаления поли(A) и разрушения mRNA. Известные сайты связывания с miRNA расположены в пределах 3'-UTR mRNA; по-видимому, miRNA нацеливаются на сайты с практически абсолютной комплементарностью по отношению к нуклеотидам 2-8 5'-конца miRNA. Эта область известна как затравочная область. Поскольку siRNA и miRNA являются взаимозаменяемыми, экзогенная siRNA может подавлять экспрессию mRNA, обладающую комплементарностью по отношению к затравочной области siRNA. Несколько сайтов-мишеней в 3'-UTR обеспечивают более сильное подавление экспрессии.

МикроРНК (miRNA) представляют собой короткие некодирующие РНК, которые связываются с 3'-UTR молекул нуклеиновых кислот и подавляют экспрессию генов путем снижения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты либо путем ингибирования трансляции. Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько последовательностей-мишеней для miRNA, последовательностей miRNA или затравочных областей miRNA. Такие последовательности могут соответствовать любой miRNA.

Последовательность miRNA содержит "затравочную" область, т. е. последовательность в области положений 2-8 зрелой miRNA, причем эта последовательность обладает уотсон-криковской комплементарностью по отношению к

последовательности-мишени для miRNA. Затравочная область miRNA может содержать положения 2-8 или 2-7 зрелой miRNA. В некоторых вариантах осуществления затравочная область miRNA может содержать 7 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-8 зрелой miRNA), где сайт, комплементарный затравочной области, в соответствующей мишени для miRNA фланкирован аденином (A), расположенным напротив положения 1 miRNA. В некоторых вариантах осуществления затравочная область miRNA может содержать 6 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-7 зрелой miRNA), где сайт, комплементарный затравочной области, в соответствующей мишени miRNA фланкирован аденином (A), расположенным напротив положения 1 miRNA.

Основания затравочной области miRNA могут быть по сути комплементарными последовательности-мишени. Благодаря встраиванию последовательностей-мишеней для miRNA в кольцевой полирибонуклеотид кольцевой полирибонуклеотид может ускользать от выявления или выявляться иммунной системой хозяина, характеризоваться модулированным разрушением или модулированной трансляцией. Такой способ может снижать риск возникновения нецелевых эффектов при доставке кольцевых полирибонуклеотидов.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность miRNA, идентичную смежным нуклеотидам гена-мишени в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 25. В некоторых вариантах осуществления последовательность miRNA нацеливается на mRNA и начинается с динуклеотида AA, характеризуется содержанием GC, составляющим приблизительно 30%–70%, приблизительно 30%–60%, приблизительно 40%–60% или приблизительно 45%–55%, и не характеризуется высоким процентным значением идентичности по отношению к какой-либо нуклеотидной последовательности, отличной от мишени в геноме млекопитающего, в который она подлежит введению, например, согласно определению с помощью стандартного поиска BLAST.

В противоположность этому, сайты связывания с miRNA могут быть вырезаны из (т. е. удалены из) кольцевого полирибонуклеотида для модулирования экспрессии белка в конкретных тканях. Регуляцию экспрессии в нескольких тканях можно осуществлять путем введения или удаления одного или нескольких сайтов связывания с miRNA.

Примеры тканей, в которых miRNA, как известно, регулируют mRNA и, таким образом, экспрессию белка, включают без ограничения печень (miR-122), мышцы (miR-133, miR-206, miR-208), эндотелиальные клетки (miR-17-92, miR-126), миелоидные клетки (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), жировую ткань (let-7, miR-30c), сердце (miR-1d, miR-149), почки (miR-192, miR-194, miR-204), а также эпителиальные клетки легких (let-7, miR-133, miR-126). miRNA может также контролировать сложные

биологические процессы, такие как ангиогенез (miR-132). В кольцевых полирибонуклеотидах, описанных в данном документе, сайты связывания для miRNA, которые участвуют в таких процессах, могут быть удалены или введены с целью адаптации экспрессии кольцевого полирибонуклеотида к биологически релевантным типам клеток или к условиям соответствующих биологических процессов. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с miRNA включает, например, сайт для miR-7.

Благодаря пониманию паттернов экспрессии miRNA в различных типах клеток кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может быть сконструирован для более целенаправленной экспрессии в конкретных типах клеток или только в конкретных биологических условиях. Посредством введения сайтов связывания для тканеспецифических miRNA можно разработать кольцевой полирибонуклеотид для оптимальной экспрессии белка в ткани или в условиях биологического состояния.

Кроме того, в состав кольцевого полирибонуклеотида могут быть включены сайты для затравочной области miRNA для модулирования экспрессии в определенных клетках, что приводит к биологическому улучшению. Примером этого является включение сайтов для miR-142. Посредством включения сайтов для miR-142 в состав кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, можно модулировать экспрессию в гемопоэтических клетках, но также ослаблять или устранять иммунные ответы на белок, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну miRNA, например, 2, 3, 4, 5, 6 или более. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит miRNA, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% идентичностью нуклеотидной последовательности по отношению к любой из нуклеотидных последовательностей, или последовательность, которая является комплементарной последовательности-мишени.

Перечни известных последовательностей miRNA можно найти в базах данных, поддерживаемых исследовательскими организациями, например, Институтом Сенгера, действующим под эгидой фонда Wellcome Trust, Центром биоинформатики Пенсильванского университета, Мемориальным онкологическим центром имени Слоуна-Кеттеринга и Европейской молекулярно-биологической лабораторией. Молекулы для RNAi могут быть без труда разработаны и получены с помощью технологий, известных из уровня техники. Кроме того, для определения эффективных и специфических мотивов последовательности могут использоваться вычислительные инструменты.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит длинную некодирующую РНК. Длинные некодирующие РНК (lncRNA) содержат не кодирующие белок транскрипты, длина которых превышает 100 нуклеотидов. Большая длина отличает lncRNA от малых регуляторных РНК, таких как miRNA, siRNA и другие короткие РНК. Как правило, большинство (~ 78%) lncRNA характеризуются как тканеспецифические. Дивергентные lncRNA, которые транскрибируются в противоположном направлении по отношению к близлежащим генам, кодирующим белок (составляют значительную долю ~ 20% от всех lncRNA в геномах млекопитающих), могут регулировать транскрипцию близлежащего гена.

Длина сайта связывания с РНК может составлять от приблизительно 5 до 30 нуклеотидов, от приблизительно 10 до 30 нуклеотидов или приблизительно 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более нуклеотидов. Степень идентичности сайта связывания с РНК по отношению к мишени, представляющей интерес, может составлять по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания с большими некодирующими межгенными РНК (lincRNA). lincRNA составляют большую часть длинных некодирующих РНК. lincRNA являются некодирующими транскриптами и в некоторых вариантах осуществления имеют длину более чем приблизительно 200 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления lincRNA имеют структуру экзон-интрон-экзон, сходную с генами, кодирующими белок, но не содержат открытые рамки считывания и не кодируют белки. Экспрессия lincRNA может иметь выраженный тканеспецифический характер по сравнению с кодирующими генами. lincRNA, как правило, экспрессируются совместно с соседними генами в такой же степени, что и пары соседних генов, кодирующих белок. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит циркуляризованную lincRNA.

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат одну или несколько lincRNA, например, FIRRE, LINC00969, PVT1, LINC01608, JPX, LINC01572, LINC00355, C1orf132, C3orf35, RP11-734, LINC01608, CC-499B15.5, CASC15, LINC00937 и RP11-191.

Перечни известных последовательностей lincRNA и lncRNA можно найти в базах данных, поддерживаемых исследовательскими организациями, например, Институтом геномики и интегративной биологии, Институтом Диамантины при Квинслендском университете, Гентским университетом и Университетом Сунь Ятсена. Молекулы lincRNA и lncRNA могут быть без труда разработаны и получены с помощью технологий, известных

из уровня техники. Кроме того, для определения эффективных и специфических мотивов последовательности могут использоваться вычислительные инструменты.

Сайт связывания с РНК может содержать последовательность, по сути комплементарную или полностью комплементарную всему эндогенному гену или продукту гена (например, mRNA) или фрагменту таковых. Комплементарная последовательность может быть комплементарна последовательностям на границе между интронами и экзонами для предотвращения созревания вновь образованных ядерных РНК-транскриптов определенных генов до mRNA для транскрипции. Комплементарная последовательность может быть специфичной по отношению к генам посредством гибридизации с mRNA для этого гена и предотвращения ее трансляции. Сайт связывания с РНК может содержать последовательность, которая является антисмысловой или по сути антисмысловой по отношению ко всему эндогенному гену или к продукту гена, такому как ДНК, РНК или их производное или гибридная форма, или к фрагменту таковых.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт связывания с РНК, который имеет РНК- или РНК-подобную структуру, как правило, содержащую приблизительно 5-5000 пар оснований (в зависимости от структуры конкретной РНК, например, miRNA длиной 5-30 п. о., lncRNA длиной 200-500 п. о.) и имеющую последовательность нуклеиновых оснований, идентичную (комплементарную) или практически идентичную (по сути комплементарную) по отношению к кодирующей последовательности в экспрессируемом гене-мишени в клетке.

Сайты связывания с ДНК

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт связывания с ДНК, такой как последовательность направляющей РНК (gRNA). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит направляющую РНК или последовательность, комплементарную последовательности gRNA. gRNA представляет собой короткую синтетическую РНК, состоящую из "каркасной" последовательности, требуемой для связывания с неполным эффекторным компонентом, и определяемой пользователем нацеливающейся последовательности длиной ~ 20 нуклеотидов для геномной мишени. Последовательности направляющей РНК могут иметь длину, составляющую от 17 до 24 нуклеотидов (например, 19, 20 или 21 нуклеотид), и являются комплементарными по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Специализированные генераторы и алгоритмы для создания gRNA могут использоваться при разработке эффективной направляющей РНК. Редактирование генов может осуществляться с помощью химерных "одиночных направляющих РНК" ("sgRNA"), сконструированной (синтетической) одиночной молекулы РНК, которая имитирует

встречающийся в природе комплекс crRNA-tracrRNA и содержит как tracrRNA (для связывания с нуклеазой), так и по меньшей мере одну crRNA (для направления нуклеазы к последовательности, которая служит мишенью для редактирования). Химически модифицированная sgRNA может быть эффективной при редактировании генома.

gRNA может распознавать специфические последовательности ДНК (например, последовательности, прилегающие к промотору, энхансеру, сайленсеру или репрессору гена или расположенные в их пределах).

В некоторых вариантах осуществления gRNA представляет собой часть системы CRISPR для редактирования генов. Для целей редактирования генов кольцевой полирибонуклеотид может быть разработан таким образом, чтобы он содержал одну или несколько последовательностей направляющих РНК, соответствующих желаемой последовательности ДНК-мишени. Последовательности gRNA могут содержать по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более нуклеотидов для взаимодействия с Cas9 или другой экзонуклеазой с целью расщепления ДНК, например, Cpf1 взаимодействует с по меньшей мере приблизительно 16 нуклеотидами последовательности gRNA для поддающегося выявлению расщепления ДНК.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая может связываться с ДНК. Вторичная структура аптамерной последовательности может связываться с ДНК. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с ДНК посредством связывания аптамерной последовательности с ДНК.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательности, которые связываются с большой бороздкой ДНК-дуплекса. В одном таком случае специфичность и стабильность триплексной структуры, образованной кольцевым полирибонуклеотидом и ДНК-дуплексом, достигается с помощью водородных связей в хугстиновских парах оснований, которые отличаются от таковых, образующихся согласно каноническому уотсон-криковскому спариванию оснований в ДНК-дуплексе. В одном случае кольцевой полирибонуклеотид связывается с богатой пурином нитью дуплекса-мишени по большой бороздке.

В некоторых вариантах осуществления образование триплекса происходит в двух мотивах, отличающихся ориентацией кольцевого полирибонуклеотида по отношению к богатой пурином нити дуплекса-мишени. В некоторых случаях полипиримидиновые отрезки последовательности в кольцевом полирибонуклеотиде связываются с полипуриновыми отрезками последовательности ДНК-дуплекса параллельно посредством

образования водородных связей в хугстиновских парах оснований (т. е. в такой же ориентации от 5' к 3', как для богатой пурином нити дуплекса), при этом полипуриновые отрезки (R) связываются с пуриновой нитью дуплекса антипараллельно посредством водородных связей в обратных хугстиновских парах оснований. В случае антипараллельного связывания пуриновый мотив содержит триплеты G:G-C, A:A-T или T:A-T; при этом в случае параллельного связывания пиримидиновый мотив содержит канонические триплеты C+:G-C или T:A-T (где C+ обозначает протонированный цитозин в положении N3). Антипараллельные последовательности GA и GT в кольцевом полирибонуклеотиде могут образовывать стабильные триплексы при нейтральных значениях pH, тогда как параллельные последовательности CT в кольцевом полирибонуклеотиде могут связываться при кислых значениях pH. N3 цитозина в кольцевом полирибонуклеотиде может быть протонированным. Замена C на 5-метил-C может обеспечить возможность связывания последовательностей CT в кольцевом полирибонуклеотиде при физиологическом значении pH, так как 5-метил-C имеет более высокую pK по сравнению с цитозином. Что касается как пуриновых, так и пиримидиновых мотивов, то непрерывные отрезки гомопуринов-гомопиримидиновой последовательности, состоящие из по меньшей мере 10 пар оснований, способствуют связыванию кольцевого полирибонуклеотида с ДНК-дуплексом, поскольку более короткие триплексы могут быть нестабильными при физиологических условиях, и разрывы в последовательностях могут дестабилизировать структуру триплекса. В некоторых вариантах осуществления ДНК-дуплекс-мишень для образования триплекса содержит последовательно расположенные пуриновые основания в одной нити. В некоторых вариантах осуществления мишень для образования триплекса содержит гомопуриновую последовательность в одной нити ДНК-дуплекса и гомопиримидиновую последовательность в комплементарной нити.

В некоторых вариантах осуществления триплекс, содержащий кольцевой полирибонуклеотид, представляет собой стабильную структуру. В некоторых вариантах осуществления триплекс, содержащий кольцевой полирибонуклеотид, демонстрирует увеличенный период полужизни, например, увеличенный на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или больше, например, персистенцию, составляющую от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней, или по меньшей мере приблизительно 2 часа, 6 часов, 12 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, 60 дней или больше, или любой период времени в промежутке между этими значениями.

Сайты связывания с белком

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид одержит один или несколько сайтов связывания с белком. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с белком содержит аптамерную последовательность. В одном варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт связывания с белком для ослабления иммунного ответа хозяина по сравнению с ответом, запускаемым эталонным соединением, например, кольцевым полирибонуклеотидом, в котором отсутствуют сайты связывания с белком, например, линейной РНК.

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат один или несколько сайтов связывания с белком для связывания с белком, например, с рибосомой. Благодаря встраиванию в кольцевой полирибонуклеотид сайтов связывания с белком, например, сайтов связывания с рибосомой, кольцевой полирибонуклеотид может ускользать от выявления или характеризоваться сниженным выявлением иммунной системой хозяина, характеризоваться модулированным разрушением или модулированной трансляцией.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сайт связывания с иммунным белком, например, для маскирования кольцевого полирибонуклеотида от компонентов иммунной системы хозяина, например, для ускользания от ответов с участием CTL. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с иммунным белком представляет собой нуклеотидную последовательность, которая связывается с иммунным белком и способствует маскированию кольцевого полирибонуклеотида, являющегося отличным от эндогенного.

Традиционные механизмы контактирования рибосом с линейной РНК включают связывание рибосом с экпированным 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 или трансляции кольцевого полирибонуклеотида не требуется свободный конец или экпированный 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.

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат последовательность связывания с белком, которая связывается с белком. В некоторых вариантах осуществления последовательность

связывания с белком нацеливает кольцевой полирибонуклеотид на конкретную мишень или локализует его рядом с ней. В некоторых вариантах осуществления последовательность связывания с белком специфично связывается с областью белка, богатой аргинином.

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат один или несколько сайтов связывания с белком, каждый из которых связывается с белком-мишенью, например, выступая в качестве каркаса для приведения в непосредственную близость двух или более белков. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат два сайта связывания с белком, каждый из которых связывается с белком-мишенью, за счет чего белки-мишени приводятся в непосредственную близость. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат три сайта связывания с белком, каждый из которых связывается с белком-мишенью, за счет чего три белка-мишени приводятся в непосредственную близость. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат четыре сайта связывания с белком, каждый из которых связывается с белком-мишенью, за счет чего четыре белка-мишени приводятся в непосредственную близость. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат пять или более сайтов связывания с белком, каждый из которых связывается с белком-мишенью, за счет чего пять или более белков-мишеней приводятся в непосредственную близость. В некоторых вариантах осуществления белки-мишени являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления белки-мишени являются разными. В некоторых вариантах осуществления приведение белков-мишеней в непосредственную близость способствует образованию белкового комплекса. Например, кольцевой полирибонуклеотид согласно настоящему изобретению может выступать в качестве каркаса для способствования образованию комплекса, содержащего один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять белков-мишеней или больше. В некоторых вариантах осуществления приведение двух или более белков-мишеней в непосредственную близость способствует взаимодействию двух или более белков-мишеней. В некоторых вариантах осуществления приведение двух или более белков-мишеней в непосредственную близость приводит к модулированию ферментативной реакции, способствует ей или приводит к ее ингибированию. В некоторых вариантах осуществления приведение двух или более белков-мишеней в непосредственную близость приводит к модулированию пути передачи сигнала, способствует ему или приводит к его ингибированию.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с белком включает в себя 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, p53, PCBP2, POLR2A, PRPF8, PTBP1, RBFOX1, RBFOX2, RBFOX3, 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 связывается с РНК.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с белком представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая связывается с белком, например, последовательность, которая может связываться с фактором транскрипции, энхансером, репрессором, полимеразой, нуклеазой, гистоном или любым другим белком, который связывается с ДНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания с белком представляет собой аптамерную последовательность, которая связывается с белком. В некоторых вариантах осуществления вторичная структура аптамерной последовательности связывается с белком. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК образует комплекс с белком посредством связывания аптамерной последовательности с белком.

В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК конъюгирована с малой молекулой или ее частью, при этом малая молекула или ее часть связывается с мишенью, такой как белок. Малая молекула может быть конъюгирована с кольцевой РНК с помощью модифицированного нуклеотида, например, посредством клик-химии. Примеры малых молекул, которые могут связываться с белками, включают без ограничения 4-гидрокситамоксифен (4-ОНТ), AC220, афатиниб, аналог аминопиразола, антагонист AR, BI-7273, босутиниб, церитиниб, хлоралкан, дазатиниб, форетиниб, гефитиниб, (R)-гидроксипролин, полученный из HIF-1 α , HJB97, лиганд на основе гидроксипролина, IACS-7e, ибрутиниб, производное ибрутиниба, JQ1, лапатиниб, производное LCL161, леналидомид, малую молекулу, представляющую собой нутлин, OTX015, ингибитор PDE4, помалидомид, ингибитор RIPK2, RN486, ингибитор 3b Sirt2, SNS-032, фактор Стила,

ингибитор ТВК1, талидомид, производное талидомида, лиганд на основе тиазолидиндиона, производное VH032, лиганд 2 VHL, VHL-1, VL-269 и их производные.

В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК конъюгирована с более чем одной малой молекулой, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более малыми молекулами. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК конъюгирована с более чем одной различной малой молекулой, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различными малыми молекулами. В некоторых вариантах осуществления более чем одна малая молекула, конъюгированная с кольцевой РНК, имеет конфигурацию, позволяющую ей привлекать и сближать соответствующие белки-мишени, что может приводить к взаимодействию между белками-мишенями и/или другим изменениям на молекулярном и клеточном уровне. Например, кольцевая РНК может быть конъюгирована как с JQ1, так и с талидомидом или их производным, что таким образом может позволять привлекать белок-мишень для JQ1, например, белки из семейства BET, и белок-мишень для талидомида, например, лигазу E3. В некоторых случаях кольцевая РНК, конъюгированная с JQ1 и талидомидом, привлекает белок из семейства BET с помощью JQ1 или его производного, метит белок из семейства BET убиквитином с помощью лигазы E3, привлеченной с помощью талидомида или его производного, и, таким образом, приводит к разрушению меченого белка из семейства BET.

Другие сайты связывания

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания с мишенью, отличной от РНК или отличной от ДНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания может представлять собой один из сайтов связывания с малой молекулой, аптамером, липидом, углеводом, вирусной частицей, мембраной, многокомпонентным комплексом, клеткой, клеточным компонентом или любым их фрагментом. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания с липидом. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания с углеводом. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания с углеводом. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания с мембраной. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания с многокомпонентным комплексом, например, рибосомой, нуклеосомой, аппаратом транскрипции и т. д.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность. Аптамерная последовательность может связываться с

любой мишенью, описанной в данном документе (например, молекулой нуклеиновой кислоты, малой молекулой, белком, углеводом, липидом и т. д.). Аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая может связываться с мишенью. В некоторых вариантах осуществления аптамерная последовательность имеет третичную структуру, которая может связываться с мишенью. В некоторых вариантах осуществления аптамерная последовательность имеет четвертичную структуру, которая может связываться с мишенью. Кольцевой полирибонуклеотид может связываться с мишенью посредством аптамерной последовательности с образованием комплекса. В некоторых вариантах осуществления комплекс поддается выявлению в течение по меньшей мере 5 дней. В некоторых вариантах осуществления комплекс поддается выявлению в течение по меньшей мере 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.

Секвестрация

В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, секвестрирует мишень, например, ДНК, РНК, белки и другие клеточные компоненты, для регуляции клеточных процессов. *circRNA* с сайтами связывания для мишени, представляющей интерес, может конкурировать за связывание мишени с эндогенным партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, секвестрирует *miRNA*. В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, секвестрирует *mRNA*. В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, секвестрирует белки. В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, секвестрирует рибосомы. В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, секвестрирует другие *circRNA*. В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, секвестрирует некодирующие РНК, *lncRNA*, *miRNA*, *tRNA*, *rRNA*, *snoRNA*, *ncRNA*, *siRNA* или *shRNA*. В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, содержит разрушающий элемент, который разрушает секвестрированную мишень, например, ДНК, РНК, белок или другие клеточные компоненты, связанные с *circRNA*. Неограничивающие примеры путей применения секвестрации, опосредованной *circRNA*, перечислены в **таблице 2**.

ТАБЛИЦА 2

Процесс	МОА (пример)
Препятствование транскрипции	<i>circRNA</i> -ДНК
Препятствование трансляции	<i>circRNA</i> - <i>mRNA</i> или рибосома
Ингибирование взаимодействия белков	<i>circRNA</i> -белок

Секвестрация микроРНК	circRNA-РНК (антисмысловая)	
Секвестрация circRNA (эндогенной circRNA)	circRNA-circRNA (антисмысловая)	

В некоторых вариантах осуществления любой из способов применения circRNA, описанной в данном документе, может применяться в комбинации с трансляционным элементом. circRNA, описанные в данном документе, которые содержат трансляционный элемент, могут транслировать РНК в белки. На **фиг. 3** представлено схематическое изображение экспрессии белка, осуществляющейся с помощью circRNA, содержащей РНК-связывающий мотив, специфичный по отношению к последовательности, ДНК-связывающий мотив, специфичный по отношению к последовательности, связывающий мотив, специфичный по отношению к белку (Белок 1), и регуляторный РНК-мотив (РНК 1). Регуляторный РНК-мотив может инициировать транскрипцию РНК и экспрессию белка.

Нетранслируемые области

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

В некоторых вариантах осуществления инкриптоген повышает стабильность. В некоторых вариантах осуществления регуляторные элементы UTR могут быть включены в инкриптоген для повышения стабильности кольцевого полирибонуклеотида.

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

Введение, удаление или модификация AU-богатых элементов (ARE) UTR могут быть применимыми для модулирования стабильности или иммуногенности кольцевого

полирибонуклеотида. При конструировании конкретных кольцевых полирибонуклеотидов одна или несколько копий ARE могут быть введены для дестабилизации кольцевого полирибонуклеотида, и копии ARE могут снижать трансляцию и/или снижать выработку продукта экспрессии. Аналогично, ARE могут быть идентифицированы и удалены или быть подвергнуты мутации для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, повышения трансляции и выработки получаемого в результате белка.

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

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

Инкриптоген

Как описано в данном документе, кольцевой полирибонуклеотид может содержать инкриптоген для ослабления врожденного иммунного ответа клетки, ускользания от него или его избегания. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, предусмотренные в данном документе, приводят к ослаблению иммунного ответа хозяина по сравнению с ответом, запускаемым эталонным соединением, например, линейным полинуклеотидом, соответствующим описанному кольцевому полирибонуклеотиду, или

кольцевым полирибонуклеотидом, в котором отсутствует инкриптоген. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется меньшей иммуногенностью, чем его эквивалент, в котором отсутствует инкриптоген.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является неиммуногенным в организме млекопитающего, например, человека. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид способен реплицироваться в клетке млекопитающего, например, в клетке человека.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательности или продукты экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни, по меньшей мере равным периоду полужизни его линейного эквивалента, например, линейной экспрессионной последовательности или линейного кольцевого 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 от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней, или по меньшей мере приблизительно 2 часа, 6 часов, 12 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, 60 дней или больше, или любой период времени в промежутке между этими значениями. В определенных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни или персистенции в клетке, составляющим от не более чем приблизительно 10 минут до приблизительно 7 дней, или не более чем 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, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, или любой период времени в промежутке между этими значениями.

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, что сохраняется в течение от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней или в течение по меньшей мере приблизительно 2 часов,

6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 60 дней или больше или любого периода времени в промежутке между этими значениями. В определенных вариантах осуществления клеточная функция является временно измененной, как, например, в результате модулирования, что сохраняется в течение от не более чем приблизительно 30 минут до приблизительно 7 дней или в течение не более чем приблизительно 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 часа, 22 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или любого периода времени в промежутке между этими значениями.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере приблизительно 20 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 30 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 40 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 50 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 75 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 100 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 200 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 300 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 400 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 500 пар оснований или по меньшей мере приблизительно 1000 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может иметь размер, достаточный для размещения сайта связывания с рибосомой. Специалисту в данной области может быть понятно, что максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида может быть настолько большим, насколько позволяют пределы технических ограничений получения кольцевого полирибонуклеотида и/или применения кольцевого полирибонуклеотида. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают возможным, что из ДНК могут быть получены несколько сегментов РНК, а их 5'- и 3'- свободные концы могут быть отождествлены с образованием "нити" РНК, которая в конечном итоге может циркуляризоваться, когда остаются свободными только один 5'- и один 3'-конец. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида может быть ограничен возможностью упаковки и доставки РНК к мишени. В некоторых вариантах осуществления размер кольцевого полирибонуклеотида представляет собой длину, достаточную для того, чтобы кодировать применимые полипептиды и, таким образом, могут быть применимы значения длины, составляющие менее чем приблизительно 20000 пар оснований, менее чем приблизительно 15000 пар оснований, менее чем приблизительно

10000 пар оснований, менее чем приблизительно 7500 пар оснований или менее чем приблизительно 5000 пар оснований, менее чем приблизительно 4000 пар оснований, менее чем приблизительно 3000 пар оснований, менее чем приблизительно 2000 пар оснований, менее чем приблизительно 1000 пар оснований, менее чем приблизительно 500 пар оснований, менее чем приблизительно 400 пар оснований, менее чем приблизительно 300 пар оснований, менее чем приблизительно 200 пар оснований, менее чем приблизительно 100 пар оснований.

Последовательности расщепления

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления прилегает к экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность расщепления, подобную той, какая содержится в разлагающейся *circRNA*, или расщепляемой *circRNA*, или саморасщепляющейся *circRNA*. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит две или более последовательности расщепления, что приводит к разделению кольцевого полирибонуклеотида на несколько продуктов, например, *miRNA*, линейные РНК, кольцевой полирибонуклеотид меньшего размера и т. д.

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

Разлагающаяся последовательность

В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, содержит разлагающуюся *circRNA*, или расщепляемую *circRNA*, или

саморасщепляющуюся circRNA. circRNA может осуществлять доставку клеточных компонентов, включая, например, РНК, lncRNA, lincRNA, miRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, ncRNA, siRNA или shRNA. В некоторых вариантах осуществления circRNA содержит miRNA, отделенную (i) саморасщепляющимися элементами; (ii) сайтами привлечения 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 привлечения 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*. Неограничивающие примеры путей применения разлагающихся circRNA перечислены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 3

Процесс	МОА (пример)
Доставка miRNA	microRNA в кольцевой форме, содержащие саморасщепляющийся элемент (например, рибозим типа "головки молотка"), сайт привлечения фактора расщепления (например, ADAR) или разрушаемый линкер (например, глицериновый)
Доставка siRNA	siRNA в кольцевой форме, содержащие саморасщепляющийся элемент (например, рибозим типа "головки молотка"), сайт привлечения фактора расщепления (например, ADAR) или разрушаемый линкер (например, глицериновый)

Экспрессионные последовательности

Пептиды или полипептиды

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, которая кодирует пептид или полипептид.

Полипептид может быть линейным или разветвленным. Полипептид может иметь длину, составляющую от приблизительно 5 до приблизительно 4000 аминокислот, от приблизительно 15 до приблизительно 3500 аминокислот, от приблизительно 20 до

приблизительно 3000 аминокислот, от приблизительно 25 до приблизительно 2500 аминокислот, от приблизительно 50 до приблизительно 2000 аминокислот или находящуюся в любом диапазоне между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления может быть применимым полипептид, имеющий длину, составляющую менее чем приблизительно 4000 аминокислот, менее чем приблизительно 3500 аминокислот, менее чем приблизительно 3000 аминокислот, менее чем приблизительно 2500 аминокислот или 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.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько последовательностей РНК, каждая из которых может кодировать полипептид. Полипептид может вырабатываться в значительных количествах. Таким образом, полипептид может представлять собой любую белковую молекулу, которая может вырабатываться. Полипептид может представлять собой полипептид, который может секретироваться из клетки или локализоваться в цитоплазматическом, ядерном или мембранном компартменте клетки.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую белок, например, терапевтический белок. Некоторые примеры терапевтических белков могут включать без ограничения заместительный белок, дополняющий белок, вакцинный белок, антигены (например, опухолевые, вирусные и бактериальные антигены), гормоны, цитокины, антитела, иммунотерапевтические средства (например, противораковые), фактор репрограммирования/трансдифференцировки клеток, факторы транскрипции, химерный антигенный рецептор, транспозазу или нуклеазу, иммунный эффектор (например, влияющий на восприимчивость к иммунному ответу/сигналу), белок-эффектор регулируемой гибели клеток (например, индуктор апоптоза или некроза), нелигандный ингибитор опухоли (например, ингибитор онкобелка), эпигенетическое модифицирующее средство, эпигенетический фермент, фактор транскрипции, фермент, модифицирующий ДНК или белок, ДНК-интеркалирующее средство, ингибитор эффлюксного насоса, активатор или ингибитор ядерных рецепторов, ингибитор протеасом, конкурентный ингибитор фермента, эффектор или ингибитор синтеза белка, нуклеазу, фрагмент или домен белка, лиганд или рецептор и систему CRISPR или ее компонент.

Регуляторные последовательности

В некоторых вариантах осуществления регуляторная последовательность представляет собой промотор. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один промотор, прилегающий к по меньшей мере одной экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит промотор, прилегающий к каждой экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления промотор присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии, например, пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов).

Кольцевой полирибонуклеотид может модулировать экспрессию РНК, кодируемой геном. Поскольку несколько генов могут обладать некоторой степенью гомологии последовательностей друг с другом, то кольцевой полирибонуклеотид может быть разработан для нацеливания на класс генов с достаточной гомологией последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность, которая обладает комплементарностью по отношению к последовательностям, которые являются общими среди различных генов-мишеней или являются уникальными для конкретного гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть разработан для нацеливания на консервативные области последовательности РНК, характеризующиеся гомологией между несколькими генами, за счет чего обеспечивается нацеливание на несколько генов в семействе генов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть разработан для нацеливания на последовательность, которая является уникальной для конкретной последовательности РНК одного гена.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность имеет длину менее 5000 п. о. (например, менее чем приблизительно 5000 п. о., 4000 п. о., 3000 п. о., 2000 п. о., 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о., 100 п. о., 50 п. о., 40 п. о., 30 п. о., 20 п. о., 10 п. о. или меньше). В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность имеет, независимо или дополнительно, длину более 10 п. о. (например, по меньшей мере приблизительно 10 п. о., 20 п. о., 30 п. о., 40 п. о., 50 п. о., 60 п. о., 70 п. о., 80 п. о., 90 п. о., 100 п. о., 200 п. о., 300 п. о., 400 п. о., 500 п. о., 600 п. о., 700 п. о., 800 п. о., 900 п. о., 1000 т. о., 1,1 т. о., 1,2 т. о., 1,3 т. о., 1,4 т. о., 1,5 т. о., 1,6 т. о., 1,7 т. о., 1,8 т. о., 1,9 т. о., 2 т. о., 2,1 т. о., 2,2 т. о., 2,3 т. о., 2,4 т. о., 2,5 т. о., 2,6 т. о., 2,7 т. о., 2,8 т. о., 2,9 т. о., 3 т. о., 3,1 т. о., 3,2 т. о., 3,3 т. о., 3,4 т. о.,

3,5 т. о., 3,6 т. о., 3,7 т. о., 3,8 т. о., 3,9 т. о., 4 т. о., 4,1 т. о., 4,2 т. о., 4,3 т. о., 4,4 т. о., 4,5 т. о., 4,6 т. о., 4,7 т. о., 4,8 т. о., 4,9 т. о., 5 т. о. или больше).

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность содержит один или несколько элементов, описанных в данном документе, например, последовательность, кодирующую один или несколько пептидов или белков, одну или несколько регуляторных нуклеиновых кислот, одну или несколько некодирующих РНК и другие экспрессионные последовательности.

Участок внутренней посадки рибосомы (IRES)

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, содержат элемент, представляющий собой участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Подходящий элемент IRES может содержать последовательность РНК, способную контактировать с эукариотической рибосомой. В некоторых вариантах осуществления элемент IRES содержит по меньшей мере приблизительно 50 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 100 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 200 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 250 пар оснований, по меньшей мере приблизительно 350 пар оснований или по меньшей мере приблизительно 500 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления элемент IRES получен из ДНК организма, включающего без ограничения вирус, млекопитающее и дрозофилу. Вирусная ДНК может быть получена из, например, сDNA пикорнавируса, сDNA вируса энцефаломиокардита (EMCV) и сDNA вируса полиомиелита. В некоторых вариантах осуществления ДНК дрозофилы, из которой получен элемент IRES, может включать, например, ген *Antennapedia* из *Drosophila melanogaster*.

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один IRES, фланкирующий по меньшей мере одну (например, 2, 3, 4, 5 или более) экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах осуществления IRES может фланкировать по меньшей мере одну экспрессионную последовательность (например, 2, 3, 4, 5 или более) с обеих сторон. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут содержать 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).

Последовательность инициации трансляции

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

трансляции включает в себя последовательность Козак или Шайна-Дальгарно. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, прилегающую к экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность инициации трансляции, прилегающую к экспрессионной последовательности.

Природные 5'-UTR могут нести элементы, которые играют роль в инициации трансляции. Природные 5'-UTR могут содержать сигнатуры, такие как последовательности Козак, которые могут участвовать в процессе, посредством которого рибосома иницирует трансляцию многих генов. Последовательности Козак имеют консенсусную последовательность CCR(A/G)CCAUGG, где R представляет собой пурин (аденин или гуанин), расположенный на три основания выше старт-кодона (AUG), за которым расположен еще один "G". 5'-UTR может также образовывать вторичные структуры, которые участвуют в связывании с фактором элонгации.

Кольцевой 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 иницироваться в первом старт-кодоне или может иницироваться ниже первого старт-кодона.

В некоторых вариантах осуществления трансляция кольцевого полирибонуклеотида может иницироваться в кодоне, который не является первым старт-кодоном, например, AUG. Трансляция кольцевого полирибонуклеотида может иницироваться 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 кольцевого полирибонуклеотида может начинаться с альтернативной последовательности инициации

трансляции, такой как ACG. В качестве другого неограничивающего примера, трансляция кольцевого полирибонуклеотида может начинаться с альтернативной последовательности инициации трансляции CTG/CUG. В качестве еще одного неограничивающего примера, трансляция кольцевого полирибонуклеотида может начинаться с альтернативной последовательности инициации трансляции GTG/GUG. В качестве еще одного неограничивающего примера, трансляция кольцевого полирибонуклеотида может начинаться с ассоциированной с повторами последовательности, отличной от AUG (RAN), такой как альтернативная последовательность инициации трансляции, которая содержит короткие повторяющиеся отрезки РНК, например, CGG, GGGGCC, CAG, CTG.

Нуклеотиды, фланкирующие кодон, который иницирует трансляцию, могут влиять на эффективность трансляции, длину и/или структуру кольцевого полирибонуклеотида. Маскирование любого из нуклеотидов, фланкирующих кодон, который иницирует трансляцию, можно использовать для изменения положения инициации трансляции, эффективности трансляции, длины и/или структуры кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления маскирующее средство можно использовать вблизи старт-кодона или альтернативного старт-кодона с целью маскирования или сокрытия кодона для снижения вероятности инициации трансляции в маскированном старт-кодоне или альтернативном старт-кодоне. Неограничивающие примеры маскирующих средств включают антисмысловые олигонуклеотиды типа запертых нуклеиновых кислот (LNA) и комплексы соединения экзонов (EJC). В некоторых вариантах осуществления маскирующее средство можно применять для маскирования старт-кодона кольцевого полирибонуклеотида с целью повышения вероятности того, что трансляция будет иницироваться в альтернативном старт-кодоне.

В некоторых вариантах осуществления трансляция иницируется в избирательных условиях, таких как, без ограничения, вирус-индуцированный отбор в присутствии GRSF-1, и кольцевой полирибонуклеотид содержит сайты связывания GRSF-1.

В некоторых вариантах осуществления трансляция иницируется путем обработки эукариотического фактора инициации трансляции 4A (eIF4A) с помощью рокаглатов. Трансляция может репрессироваться путем блокирования сканирования 43S, что приводит к преждевременной инициации трансляции в вышерасположенном месте и снижению экспрессии белка с транскриптов, несущих последовательность-мишень RocA-eIF4A.

Последовательность терминации

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и каждая экспрессионная последовательность может иметь последовательность терминации. В некоторых вариантах

осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, и в экспрессионных последовательностях отсутствует последовательность терминации, так что кольцевой полирибонуклеотид транслируется непрерывно. Исключение последовательности терминации может приводить к трансляции по типу "катящегося кольца" или к непрерывной выработке продукта экспрессии, например, пептидов или полипептидов, ввиду отсутствия задержки или отделения рибосомы. В таком варианте осуществления в результате трансляции по типу "катящегося кольца" вырабатывается непрерывный продукт экспрессии при участии каждой экспрессионной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающую последовательность. Во избежание выработки непрерывного продукта экспрессии, например, пептида или полипептида, при сохранении трансляции по типу "катящегося кольца" можно включить сдвигающую последовательность для индукции рибосомальной паузы в ходе трансляции. Сдвигающая последовательность может включать 2A-подобную последовательность или последовательность CHYSEL (цис-действующего гидролазного элемента). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент кодирует последовательность с С-концевой консенсусной последовательностью, которая представляет собой X1X2X3EX5NPGP, где X1 отсутствует или представляет собой G или H, X2 отсутствует или представляет собой D или G, X3 представляет собой D, или V, или I, или S, или M, и X5 представляет собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления эта последовательность содержит неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность - D(V/I)ExNPGP, где x = любая аминокислота. Некоторые неограничивающие примеры сдвигающих элементов включают GDVESNPGP, GDIEENPGP, VEPNPGP, IETNPGP, GDIESNPGP, GDVELNPGP, GDIETNPGP, GDVENPGP, GDVEENPGP, GDVEQNPGP, IESNPGP, GDIELNPGP, HDIETNPGP, HDVETNPGP, HDVEMNPGP, GDMESNPGP, GDVETNPGP, GDIEQNPGP и DSEFNPGP.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность терминации на конце одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в одной или нескольких экспрессионных последовательностях отсутствует последовательность терминации. Как правило, последовательности терминации включают в себя внутрирамочный нуклеотидный триплет, который сигнализирует о терминации трансляции, например, UAA, UGA, UAG. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей терминации

в кольцевом полирибонуклеотиде представляют собой последовательности терминации в сдвинутых рамках считывания, например, без ограничения, внерамочные последовательности или последовательности в сдвинутых на -1 и +1 рамках считывания (например, скрытые стоп-кодона), которые могут терминировать трансляцию. Последовательности терминации в сдвинутых рамках считывания включают нуклеотидные триплеты TAA, TAG и TGA, которые появляются во второй и третьей рамках считывания экспрессионной последовательности. Последовательности терминации в сдвинутых рамках считывания могут быть важны для предотвращения неверного считывания mRNA, что часто является губительным для клетки.

В некоторых вариантах осуществления сдвигающая последовательность, описанная в данном документе, может терминировать трансляцию и/или расщеплять продукт экспрессии между G и P в консенсусной последовательности, описанной в данном документе. В качестве одного неограничивающего примера, кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну сдвигающую последовательность для терминации трансляции и/или расщепления продукта экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающую последовательность, прилегающую к по меньшей мере одной экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающую последовательность после каждой экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающую последовательность, присутствующую с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к трансляции отдельных пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов) с каждой экспрессионной последовательности.

Последовательность поли(A)

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность поли(A). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) имеет длину более 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) имеет длину более 15 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более чем приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500 и 3000 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) содержит от приблизительно 10 до приблизительно 3000 нуклеотидов (например, от 30 до 50, от 30 до 100, от 30 до 250, от 30 до 500, от 30 до 750, от 30 до 1000, от 30 до 1500, от 30 до 2000, от 30 до 2500, от 50 до 100,

от 50 до 250, от 50 до 500, от 50 до 750, от 50 до 1000, от 50 до 1500, от 50 до 2000, от 50 до 2500, от 50 до 3000, от 100 до 500, от 100 до 750, от 100 до 1000, от 100 до 1500, от 100 до 2000, от 100 до 2500, от 100 до 3000, от 500 до 750, от 500 до 1000, от 500 до 1500, от 500 до 2000, от 500 до 2500, от 500 до 3000, от 1000 до 1500, от 1000 до 2000, от 1000 до 2500, от 1000 до 3000, от 1500 до 2000, от 1500 до 2500, от 1500 до 3000, от 2000 до 3000, от 2000 до 2500 и от 2500 до 3000).

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

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

Рибопереключатели

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

Рибопереключателъ может представлять собой часть кольцевого полирибонуклеотида, которая может непосредственно связываться с небольшой молекулой-мишенью и связывание которой с мишенью влияет на трансляцию РНК, а также стабильность и активность продукта экспрессии. Таким образом, кольцевой полирибонуклеотид, который содержит рибопереключателъ, может регулировать активность кольцевого полирибонуклеотида в зависимости от наличия или отсутствия молекулы-мишени. В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ содержит область аптамероподобного сродства к отдельной молекуле. Любой аптамер, включенный в некодирующую нуклеиновую кислоту, может применяться для секвестрации молекул из общего объема. В некоторых вариантах осуществления активность "(рибо)переключателъ" может использоваться для передачи сообщения о событии в нисходящем направлении.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ модулирует экспрессию гена посредством терминации транскрипции, ингибирования инициации трансляции, саморасщепления mRNA, а у эукариот – изменения путей сплайсинга. Рибопереключателъ может контролировать экспрессию гена посредством связывания или удаления триггерной молекулы. Таким образом, воздействие на кольцевой полирибонуклеотид, который содержит рибопереключателъ, условий, в которых активируется, деактивируется или блокируется рибопереключателъ, может изменять экспрессию гена. Например, экспрессия гена может изменяться в результате терминации транскрипции или блокирования связывания рибосомы с РНК. Связывание триггерной молекулы или ее аналога может приводить к снижению/предотвращению экспрессии или стимуляции/повышению экспрессии молекулы РНК в зависимости от природы рибопереключателъ.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой кобаламин-связывающий рибопереключателъ (также В12-элемент), который связывает аденозилкобаламин (коферментную форму витамина В12), для регуляции биосинтеза и транспорта кобаламина и сходных метаболитов.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой рибопереключателъ, связывающий циклический ди-GMP, который связывает циклический ди-GMP, для регуляции множества генов. Существуют два структурно неродственных класса рибопереключателъ, связывающих циклический ди-GMP: I подтип, связывающий циклический ди-GMP, и II подтип, связывающий циклический ди-GMP.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой FMN-связывающий рибопереключателъ (также RFN-элемент), который связывает флавинмононуклеотид (FMN), для регуляции биосинтеза и транспорта рибофлавина.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой рибопереключателъ *glmS*, который подвергается саморасщеплению при наличии достаточной концентрации глюкозамин-6-фосфата.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой глутамин-связывающй рибопереключателъ, который связывает глутамин, для регуляции генов, участвующих в метаболизме глутамина и азота. Глутамин-связывающие рибопереключателы могут также связывать короткие пептиды с неизвестной функцией. Такие рибопереключателы делятся на два структурно родственных класса: мотив *glnA*-RNA и мотив "нижерасположенный пептид".

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой глицин-связывающй рибопереключателъ, который связывает глицин, для регуляции генов, отвечающих за метаболизм глицина. Он содержит два прилегающих аптамерных домена в одной и той же mRNA и является единственной известной природной РНК, которая демонстрирует кооперативное связывание.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой лизин-связывающй рибопереключателъ (также L-бокc), который связывает лизин, для регуляции биосинтеза, катаболизма и транспорта лизина.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой *preQ1*-связывающй рибопереключателъ, который связывает прекевуозин, для регуляции генов, участвующих в синтезе или транспорте этого предшественника квеуозина. Двумя отдельными классами *preQ1*-связывающих рибопереключателов являются *preQ1*-связывающие рибопереключателы I класса и *preQ1*-связывающие рибопереключателы II класса. Связывающй домен *preQ1*-связывающих рибопереключателов I класса является чрезвычайно небольшим среди таковых у встречающихся в природе рибопереключателов. *preQ1*-связывающие рибопереключателы II класса, которые обнаруживаются только у определенных видов представителей родов *Streptococcus* и *Lactococcus*, имеют совершенно другую структуру и являются более крупными, чем *preQ1*-связывающие рибопереключателы I класса.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой пурин-связывающй рибопереключателъ, который связывает пурины, для регуляции метаболизма и транспорта пуринов. Различные формы пурин-связывающих рибопереключателов связывают гуанин или аденин. Специфичность в отношении гуанина или аденина зависит от уотсон-криковских взаимодействий с одним пиримидиновым остатком в рибопереключателе в положении Y74. В гуанин-связывающем рибопереключателе единственным пиримидином является цитозин (т. е. C74). В аденин-

связывающем рибопереключателе единственным пиримидином является урацил (т. е. U74). Гомологичные типы пурин-связывающих рибопереключателей могут связывать дезоксигуанозин, но имеют более значительные различия, чем одонуклеотидная мутация.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателем представляет собой S-аденозилгомоцистеин-связывающий (SAH) рибопереключателем, который связывает SAH, для регуляции генов, участвующих в реутилизации SAH, получаемого из S-аденозилметионина (SAM) в ходе реакций метилирования.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателем представляет собой S-аденозилметионин-связывающий (SAM) рибопереключателем, который связывает SAM, для регуляции биосинтеза и транспорта метионина и SAM. Существует три отдельных класса SAM-связывающих рибопереключателей: SAM-связывающие рибопереключателем I класса (изначально называвшийся S-боксом), SAM-связывающие рибопереключателем II класса и SMK-боксом. SAM-связывающие рибопереключателем I класса широко распространены у бактерий. SAM-связывающие рибопереключателем II класса обнаруживаются только у α -, β - и некоторых γ -протеобактерий. Рибопереключателем SMK-боксом обнаруживается у представителей Lactobacillales. Данные три разновидности рибопереключателей не имеют очевидного сходства с точки зрения последовательности или структуры. Четвертая разновидность, SAM-связывающие рибопереключателем IV класса, по-видимому, имеют лигандсвязывающую сердцевину, сходную с таковой у SAM-связывающих рибопереключателей I класса, но в окружении другого каркаса.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателем представляет собой SAM-SAИ-связывающий рибопереключателем, который связывает как SAM, так и SAИ со сходными показателями сродства.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателем представляет собой тетрагидрофолат-связывающий рибопереключателем, который связывает тетрагидрофолат, для регуляции генов, отвечающих за его синтез и транспорт.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателем представляет собой теофиллин-связывающий рибопереключателем или тиминпирофосфат-связывающий рибопереключателем.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателем представляет собой каталитический рибопереключателем *glmS* из *Thermoanaerobacter tengcongensis*, который является чувствительным к глюкозамин-6-фосфату.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателем представляет собой тиаминпирофосфат-связывающий рибопереключателем (TPP) (также Thi-боксом), который

связывает TPP, для регуляции биосинтеза и транспорта тиамина, а также транспорта сходных метаболитов. TPP-связывающий рибопереключателъ обнаруживается у эукариот.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой рибопереключателъ Мосо, который связывает молибденовый кофактор, для регуляции генов, участвующих в биосинтезе и транспорте этого кофермента, а также ферментов, которые используют молибден или его производные в качестве кофактора.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателъ представляет собой аденин-чувствительный рибопереключателъ add-A, обнаруживаемый в 5'-UTR гена, кодирующего адениндезаминазу (add), из *Vibrio vulnificus*.

Аптазим

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит аптазим. Аптазим представляет собой переключателъ для условной экспрессии, в котором аптамерная область используется в качестве аллостерического контрольного элемента и связана с областью каталитической РНК ("рибозима", как описано ниже). В некоторых вариантах осуществления аптазим является активным во время трансляции, специфичной по отношению к типу клеток. В некоторых вариантах осуществления аптазим является активным во время трансляции, специфичной по отношению к состоянию клетки, например, в клетках, инфицированных вирусом, или в присутствии вирусных нуклеиновых кислот или вирусных белков.

Рибозим представляет собой молекулу РНК, которая катализирует химическую реакцию. Множество природных рибозимов могут катализировать гидролиз фосфодиэфирных связей самого рибозима или гидролиз фосфодиэфирных связей в других РНК. Природные рибозимы могут также катализировать аминотрансферазную активность рибосомы. Каталитическая РНК может "эволюционировать" посредством способов *in vitro*. Рибозимы и продукты реакций с участием рибозимов 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 химического превращения молекулы из общего объема. В некоторых вариантах осуществления как аптамеры, так и рибозимы могут кодироваться в одной и той же некодирующей РНК.

Неограничивающие примеры рибозимов включают рибозим типа "головки молотка", рибозим VL, свинцовый рибозим и рибозим, содержащий шпильку.

В некоторых вариантах осуществления аптазим представляет собой рибозим, который может расщеплять последовательности РНК и который может регулироваться в результате связывания с лигандом или модулятором. Рибозим может представлять собой

саморасщепляющийся рибозим. Таким образом, данные рибозимы могут сочетать в себе свойства рибозимов и аптамеров.

В некоторых вариантах осуществления аптазим включен в нетранслируемую область кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе. Аптазим в отсутствие лиганда/модулятора является неактивным, что обеспечивает возможность экспрессии трансгена. Экспрессия может быть отключена или подавлена путем добавления лиганда. Аптазимы, которые деактивируются в ответ на присутствие определенного модулятора, могут использоваться в системах контроля, где желательно повышение экспрессии генов в ответ на модулятор.

Аптазимы могут также применяться для разработки систем для саморегуляции экспрессии кольцевых полирибонуклеотидов. Например, белковый продукт кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, являющийся ферментом, определяющим скорость синтеза конкретной малой молекулы, может быть модифицирован таким образом, чтобы он содержал аптазим, выбранный так, чтобы он обладал повышенной каталитической активностью в присутствии малой молекулы, с обеспечением саморегулируемой петли обратной связи для синтеза молекулы. В качестве альтернативы, активность аптазима может быть выбрана таким образом, чтобы он обладал чувствительностью к накоплению белкового продукта с кольцевого полирибонуклеотида или любой другой клеточной макромолекулы.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать аптамерную последовательность. Неограничивающие примеры аптамеров включают РНК-аптамеры, связывающие лизоцим, Toggle-25t (РНК-аптамер, содержащий 2'-фторпиримидиновые нуклеотиды, который связывает тромбин с высокими специфичностью и сродством), RNA-Tat, который связывает транс-действующий элемент ответа вируса иммунодефицита человека (TAR HIV), РНК-аптамеры, которые связывают гемин, РНК-аптамеры, которые связывают интерферон- γ , РНК-аптамер, связывающий фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), РНК-аптамеры, которые связывают простатический специфический антиген (PSA), РНК-аптамеры, которые связывают дофамин, и РНК-аптамеры, которые связывают фактор теплового шока 1 (HSF1).

В некоторых вариантах осуществления *circRNA*, описанная в данном документе, может использоваться для транскрипции и репликации РНК. Например, *circRNA* может использоваться для кодирования некодирующей РНК, *lncRNA*, *miRNA*, *tRNA*, *rRNA*, *snoRNA*, *ncRNA*, *siRNA* или *shRNA*. В некоторых вариантах осуществления *circRNA* может содержать антисмысловую *miRNA* и транскрипционный элемент. После транскрипции такая *circRNA* может продуцировать функциональные, линейные *miRNA*.

Неограничивающие примеры путей применения экспрессии и модулирования circRNA перечислены в таблице 5.

ТАБЛИЦА 4

Процесс	МОА (пример)
Комбинированная терапия путем ингибирования и трансляции	Ингибирование одного белка и дополнение другого (или того же)

Репликативный элемент

Кольцевой полирибонуклеотид может кодировать последовательность и/или мотив, применимые для репликации. Репликация кольцевого полирибонуклеотида может происходить путем образования комплементарного кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит мотив для инициации транскрипции, где транскрипция управляется посредством эндогенного клеточного аппарата (ДНК-зависимой РНК-полимеразы) либо РНК-зависимой РНК-полимеразы, кодируемой кольцевым полирибонуклеотидом. Продукт события транскрипции по типу "катыщегося кольца" может быть разрезан рибозимом с образованием комплементарного либо репродуцированного кольцевого полирибонуклеотида единичной длины. Рибозимы могут кодироваться кольцевым полирибонуклеотидом, комплементарной ему молекулой или последовательностью РНК в транс-положении. В некоторых вариантах осуществления кодируемые рибозимы могут содержать последовательность или мотив, который регулирует (ингибирует или стимулирует) активность рибозима для контроля репродукции circRNA. В некоторых вариантах осуществления последовательности единичной длины могут быть лигированы в кольцевую форму с помощью клеточной РНК-лигазы. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит репликативный элемент, который способствует самоамплификации. Примеры таких репликативных элементов включают репликативные домены HDV и репликационно компетентные смысловые и/или антисмысловые рибозимы кольцевой РНК, такие как антигеномный 5'-CGGGUCGGCAUGGCAUCUCCACCUCCUCGCGGUCCGACCUGGGCAUCCGAAGGAGGACGCACGUCCACUCGGAUGGCUAAGGGAGAGCCA-3' (SEQ ID NO: 1) или геномный 5'-UGGCCGGCAUGGUCCCAGCCUCCUCGCUGGCGCCGGCUGGGCAACAUCCGAGGGGACCGUCCCCUCGGUAAUGGCGAAUGGGACCCA-3' (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность расщепления, описанную в данном документе, для способствования репликации. Последовательность расщепления в кольцевом

полирибонуклеотиде может расщеплять длинные транскрипты, реплицирующиеся с кольцевого полирибонуклеотида, до фрагментов определенной длины, которые впоследствии могут циркуляризоваться с образованием молекулы, комплементарной кольцевому полирибонуклеотиду.

В другом варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну последовательность рибозима для расщепления длинных транскриптов, реплицирующихся с кольцевого полирибонуклеотида, до фрагментов определенной длины, где другой кодируемый рибозим разрезает транскрипты в последовательности рибозима. В результате циркуляризации образуется молекула, комплементарная кольцевому полирибонуклеотиду.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является в значительной степени устойчивым к разрушению, например, под действием экзонуклеаз.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид реплицируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид реплицируется в клетке с показателем, составляющим приблизительно 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95%, 95%-99% или имеющим любое процентное значение в промежутке между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид реплицируется в клетке и передается дочерним клеткам. В некоторых вариантах осуществления клетка передает по меньшей мере один кольцевой полирибонуклеотид дочерним клеткам с эффективностью, составляющей по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%. В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергающаяся мейозу, передает кольцевой полирибонуклеотид дочерним клеткам с эффективностью, составляющей по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%. В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергающаяся митозу, передает кольцевой полирибонуклеотид дочерним клеткам с эффективностью, составляющей по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид реплицируется в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид способен реплицироваться в клетке млекопитающего, например, в клетке человека.

Хотя в некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид реплицируется в клетке-хозяине, кольцевой полирибонуклеотид не интегрируется в геном хозяина, например, в хромосомы хозяина. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется пренебрежимо малой частотой

рекомбинации, например, с хромосомами хозяина. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется частотой рекомбинации, например, составляющей менее чем приблизительно 1,0 сМ/м. о., 0,9 сМ/м. о., 0,8 сМ/м. о., 0,7 сМ/м. о., 0,6 сМ/м. о., 0,5 сМ/м. о., 0,4 сМ/м. о., 0,3 сМ/м. о., 0,2 сМ/м. о., 0,1 сМ/м. о. или меньше, например, с хромосомами хозяина.

Другие последовательности

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит другую последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать ДНК, РНК или искусственные последовательности нуклеиновой кислоты. Другие последовательности могут включать в себя без ограничения геномную ДНК, кДНК или последовательности, которые кодируют tRNA, mRNA, rRNA, miRNA, gRNA, siRNA или другие молекулы для RNAi. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую siRNA для нацеливания на другой локус или локусы того же самого продукта экспрессии гена, на который воздействует кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую siRNA для нацеливания на продукт экспрессии гена, отличный от того, на который воздействует кольцевой полирибонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(A). В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность терминации. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует участок внутренней посадки рибосомы. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует восприимчивость к разрушению под действием экзонуклеаз. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует способность к связыванию с кэп-связывающими белками. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 5'-кэп.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько из следующих последовательностей: последовательность, которая кодирует одну или несколько miRNA, последовательность, которая кодирует один или несколько репликативных белков, последовательность, которая кодирует экзогенный

белок, последовательность, которая кодирует терапевтическое средство, регуляторную последовательность (например, промотор, энхансер), последовательность, которая кодирует одну или несколько регуляторных последовательностей, которые целенаправленно воздействуют на эндогенные гены (siRNA, lncRNA, shRNA), и последовательность, которая кодирует терапевтические mRNA или белок.

Другая последовательность может иметь длину от приблизительно 2 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 150 нуклеотидов, от приблизительно 100 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 150 до приблизительно 250 нуклеотидов, от приблизительно 200 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 250 до приблизительно 350 нуклеотидов, от приблизительно 300 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 100 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000 нуклеотидов, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000 нуклеотидов, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 нуклеотидов, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов или в любом диапазоне между этими значениями.

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. Повышенная стабильность кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с линейной РНК делает кольцевой полирибонуклеотид более 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, можно тестировать с помощью способов, стандартных в данной области техники, посредством которых определяют, произошло ли разрушение РНК (например, с помощью гель-электрофореза).

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

Нуклеотидные спейсерные последовательности

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит спейсерную последовательность.

Спейсер может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую низкое содержание GC, например, менее чем 65%, 60%, 55%, 50%, 55%, 50%, 45%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% по всей длине спейсера или на протяжении по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% смежных остатков нуклеиновой кислоты спейсера. В некоторых вариантах осуществления спейсер по сути не содержит вторичной структуры, как, например, имеет значение менее 40 ккал/моль, менее -39, -38, -37, -36, -35, -34, -33, -32, -31, -30, -29, -28, -27, -26, -25, -24, -23, -22, -20, -19, -18, -17, -16, -15, -14, -13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2 или -1 ккал/моль. Спейсер может включать в себя нуклеиновую кислоту, такую как ДНК или РНК.

Спейсерная последовательность может кодировать последовательность РНК и предпочтительно последовательность белка или пептида, в том числе пептида, являющегося сигналом секреции.

Спейсерная последовательность может быть некодирующей. Если спейсер является некодирующей последовательностью, то старт-кодон может быть предусмотрен в кодирующей последовательности прилегающей последовательности. В некоторых вариантах осуществления предусматривается, что первый остаток нуклеиновой кислоты кодирующей последовательности может представлять собой остаток А старт-кодона, такого как AUG. Если спейсер кодирует последовательность РНК, или белка, или пептида, то старт-кодон может быть предусмотрен в спейсерной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления спейсер функционально связан с другой последовательностью, описанной в данном документе.

Линкеры, отличные от нуклеиновой кислоты

Кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может также содержать линкер, отличный от нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержит линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, между одной или несколькими последовательностями или элементами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей или элементов, описанных в данном документе, связаны с линкером. Линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой химическую связь, например, одну или несколько

ковалентных связей или нековалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, представляет собой пептидный или белковый линкер. Такой линкер может иметь длину 2-30 аминокислот или больше. Линкер включает в себя гибкие, жесткие или расщепляемые линкеры, описанные в данном документе.

Наиболее часто используемые гибкие линкеры имеют последовательности, состоящие главным образом из отрезков из остатков Gly и Ser (линкеры "GS"). Гибкие линкеры могут быть применимы для соединения доменов, которые требуют определенной степени подвижности или взаимодействия, и могут содержать небольшие неполярные (например, Gly) или полярные (например, Ser или Thr) аминокислоты. Включение Ser или Thr также может обеспечивать поддержание стабильности линкера в водных растворах путем образования водородных связей с молекулами воды и, следовательно, уменьшение неблагоприятных взаимодействий между линкером и белковыми компонентами.

Жесткие линкеры применимы для сохранения фиксированного расстояния между доменами и поддержания их независимых функций. Жесткие линкеры также могут быть применимы, если пространственное разделение доменов является критически важным для сохранения стабильности или биологической активности одного или нескольких компонентов в продукте слияния. Жесткие линкеры могут иметь альфа-спиральную структуру или Pro-богатую последовательность (XP)_n, при этом X обозначает любую аминокислоту, предпочтительно Ala, Lys или Glu.

Расщепляемые линкеры могут высвобождать свободные функциональные домены *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления линкеры могут расщепляться в специфических условиях, таких как присутствие восстанавливающих реагентов или протеаз. Расщепляемые *in vivo* линкеры могут использовать обратимую природу дисульфидной связи. Один пример включает в себя последовательность, чувствительную к тромбину (например, PRS), между двумя остатками Cys. Обработка тромбином CPRSC *in vitro* приводит к расщеплению последовательности, чувствительной к тромбину, тогда как обратимая дисульфидная связь остается интактной. Расщепление линкеров *in vivo* в продуктах слияния может также осуществляться протеазами, которые экспрессируются *in vivo* при патологических состояниях (например, раке или воспалении), в конкретных клетках или тканях или ограничены определенными клеточными компартментами. Специфичность многих протеаз обеспечивает более медленное расщепление линкера в ограниченных компартментах.

Примеры линкерных молекул включают гидрофобный линкер, такой как отрицательно заряженная сульфатная группа; липиды, такие как поли(-CH₂-)липиды, такие как поли(-CH-EG), полиэтиленгликолевая (PEG) группа, их ненасыщенные

варианты, их гидроксильные варианты, их амидированные или в других отношениях N-содержащие варианты, неуглеродные линкеры; углеводные линкеры; фосфодиэфирные линкеры или другие молекулы, способные ковалентно связывать два или более полипептида. Также включены нековалентные линкеры, такие как гидрофобные липидные глобулы, с которыми связывается полипептид, например, посредством гидрофобной области полипептида или гидрофобного удлинения полипептида, такого как ряд остатков, богатый лейцином, изолейцином, валином или, возможно, также аланином, фенилаланином или даже тирозином, метионином, глицином или другим гидрофобным остатком. Полипептид может быть связан с помощью химического взаимодействия зарядов таким образом, что положительно заряженный компонент полипептида связывается с отрицательно заряженными другим полипептидом или нуклеиновой кислотой.

Циркуляризация

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

Внеклеточная циркуляризация

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид 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 кольцевого полирибонуклеотида) 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'- или 3'-амидной связи.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать ДНК- или РНК-лигазу для ферментативного связывания 5'-фосфорилированной молекулы нуклеиновой кислоты (например, линейного кольцевого полирибонуклеотида) с 3'-гидроксильной группой нуклеиновой кислоты (например, линейной нуклеиновой кислоты) с образованием новой

фосфодиэфирной связи. В приводимой в качестве примера реакции линейный кольцевой полирибонуклеотид инкубируют при 37°C в течение 1 часа с 1-10 единицами РНК-лигазы T4 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 при синтезе кольцевых полинуклеотидов можно использовать ДНК- или РНК-лигазу. В качестве неограничивающего примера, лигаза может представлять собой CircLigase или лигазу для циркуляризации.

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

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

представлять собой олигонуклеотидный или пептидный компонент, такой как аптамер или линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, описанный в данном документе.

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

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность РНК-рибозима вблизи 5'-конца и вблизи 3'-конца. Последовательность РНК-рибозима может образовывать ковалентную связь с пептидом, когда его последовательность подвергается воздействию остальной части рибозима. В одном аспекте пептиды, ковалентно связанные с последовательностью РНК-рибозима вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут связываться друг с другом, обеспечивая циклизацию или конкатемеризацию линейного кольцевого полирибонуклеотида. В другом аспекте пептиды, ковалентно связанные с РНК-рибозимом вблизи 5'-конца и 3'-конца, могут обеспечивать циклизацию или конкатемеризацию линейной первичной конструкции или линейной mRNA после их лигирования с использованием различных способов, известных в данной области техники, таких как, без ограничения, лигирование белков.

В некоторых вариантах осуществления линейный кольцевой полирибонуклеотид может содержать 5'-трифосфат нуклеиновой кислоты, превращенный в 5'-монофосфат, например, путем приведения в контакт 5'-трифосфата с РНК-5'-пирофосфогидролазой (RppH) или АТФ-дифосфогидролазой (апиразой). В качестве альтернативы, превращение 5'-трифосфата линейного кольцевого полирибонуклеотида в 5'-монофосфат может происходить посредством двухстадийной реакции, включающей: (а) приведение 5'-нуклеотида линейного кольцевого полирибонуклеотида в контакт с фосфатазой (например, антарктической фосфатазой, щелочной фосфатазой креветки или кишечной фосфатазой

теленка) для удаления всех трех фосфатных остатков; и (b) приведение 5'-нуклеотида после стадии (a) в контакт с киназой (например, полинуклеотидкиназой), которая обеспечивает добавление одного фосфатного остатка.

Сплайсинговый элемент

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сплайсинговый элемент. В некоторых вариантах осуществления сплайсинговый элемент прилегает к по меньшей мере одной экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сплайсинговый элемент, прилегающий к каждой экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления сплайсинговый элемент расположен с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии, например, пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов).

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность, которая опосредует самолигирование. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность HDV (например, последовательность консервативного репликативного домена

HDV

GGCUCAUCUCGACAAGAGGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUUCUGUAAAG
AGGAGACUGCUGGACUCGCCGCCCAAGUUCGAGCAUGAGCC (SEQ ID NO: 3)

(Beeharry et al 2004) или

GGCUAGAGGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUUCUGUAAAGAGGAGACUG
CUGGACUCGCCGCCCGAGCC (SEQ ID NO: 4)) для самолигирования. В некоторых

вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность петли E (например, в PSTVd) для самолигирования. В другом варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать самоциркуляризирующийся интрон, например, 5'- и 3'-границы сплайсинга, или самоциркуляризирующийся каталитический интрон, такой как интроны группы I, группы II или группы III. Неограничивающие примеры последовательностей самосплайсирующихся интронов группы I могут включать самосплайсирующиеся последовательности с циклическими перестановками интронов и экзонов, полученные из гена td бактериофага T4, и вставочные последовательности (IVS) рРНК Tetrahymena.

Другие способы циркуляризации

В некоторых вариантах осуществления линейные кольцевые полирибонуклеотиды могут содержать комплементарные последовательности, в том числе повторяющиеся либо

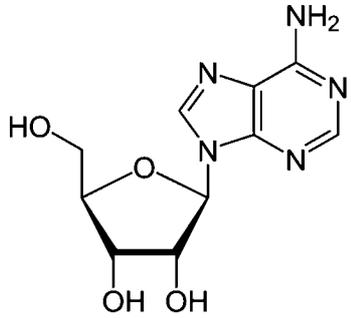
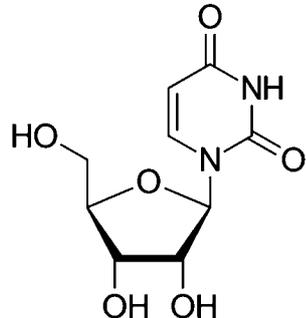
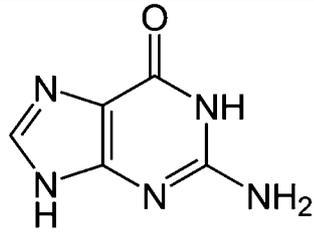
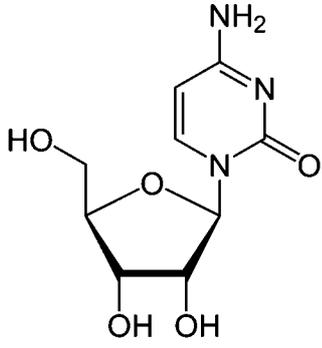
неповторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты в отдельных интронах или среди фланкирующих интронов. Повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты представляют собой последовательности, которые встречаются в сегменте кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность включает в себя последовательности поли(CA) или поли(UG). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты и комплементарные повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты из двух отдельных кольцевых полирибонуклеотидов гибридизируются с образованием одного кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированные сегменты образуют внутренние двойные нити. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности находятся на 5'- и 3'-концах линейных кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности 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 более спаренных нуклеотидов.

Модификации

В некоторых аспектах настоящее изобретение, описанное в данном документе, охватывает композиции и способы для применения и получения модифицированных кольцевых полирибонуклеотидов, а также доставки модифицированных кольцевых полирибонуклеотидов. Термин "модифицированный нуклеотид" может относиться к любому аналогу или производному нуклеотида, который имеет одну или несколько химических модификаций по сравнению с химическим составом немодифицированного природного рибонуклеотида, такого как природный немодифицированный нуклеотид аденозин (A), уридин (U), гуанин (G), цитидин (C), как показано с помощью химических формул в таблице 5, и монофосфат. Химические модификации модифицированного рибонуклеотида могут представлять собой модификации любой одной или нескольких функциональных групп рибонуклеотида, таких как сахарный фрагмент, нуклеиновое

основание или межнуклеозидная связь (например, фосфатного остатка, участвующего в образовании связи/фосфодиэфирной связи/фосфодиэфирного остова).

ТАБЛИЦА 5. Немодифицированные природные рибонуклеозиды

Рибонуклеозид	Название по IUPAC	Химическая формула
Аденозин	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-(6-амино-9 <i>H</i> -пурин-9-ил)-5-(гидроксиметил)оксолан-3,4-диол	 C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄
Уридин	1-[(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-ил]пиримидин-2,4-дион	 C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆
Гуанин	2-амино-9 <i>H</i> -пурин-6(1 <i>H</i>)-он	 C ₅ H ₅ N ₅ O
Цитидин	4-амино-1-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-ил]пиримидин-2(1 <i>H</i>)-он	 C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько замен, вставок и/или добавлений, делеций и ковалентных модификаций относительно эталонных

последовательностей, в частности, исходного полирибонуклеотида, которые включены в объем настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько посттранскрипционных модификаций (например, кэпирование, расщепление, полиаденилирование, сплайсинг, последовательность поли(А), метилирование, ацилирование, фосфорилирование, метилирование лизиновых и аргининовых остатков, ацетилирование и нитрозилирование тиольных групп и тирозиновых остатков и т. д.). Кольцевой полирибонуклеотид может содержать любую применимую модификацию, такую как модификация сахарного фрагмента, нуклеинового основания или межнуклеозидной связи (например, фосфатного остатка, участвующего в образовании связи/фосфодиэфирной связи/фосфодиэфирного остова). Один или несколько атомов пиримидинового нуклеинового основания могут быть заменены или замещены необязательно замещенным амином, необязательно замещенным тиолом, необязательно замещенным алкилом (например, метилом или этилом) или галогеном (например, хлором или фтором). В определенных вариантах осуществления модификации (например, одна или несколько модификаций) присутствуют в каждом сахарном фрагменте и каждой межнуклеозидной связи. Модификации могут представлять собой модификации по типу замены рибонуклеиновых кислот (РНК) на дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), треозо-нуклеиновые кислоты (ТНА), гликоль-нуклеиновые кислоты (GNA), пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA), запертые нуклеиновые кислоты (LNA) или их гибридные формы. Дополнительные модификации описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну N(6)-метиладенозиновую модификацию (m6A) для повышения эффективности трансляции.

В некоторых вариантах осуществления модификация 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.

Термин "псевдоурдин" в другом варианте осуществления относится к m¹acr³Ψ (1-метил-3-(3-амино-3-карбоксивпропил)псевдоурдину). В другом варианте осуществления термин относится к m¹Ψ (1-метилпсевдоурдину). В другом варианте осуществления термин относится к Ψm (2'-О-метилпсевдоурдину). В другом варианте осуществления термин относится к m5D (5-метилдигидроурдину). В другом варианте осуществления термин относится к m³Ψ (3-метилпсевдоурдину). В другом варианте осуществления

термин относится к псевдоуридиновому компоненту, не подвергнутому дополнительной модификации. В другом варианте осуществления термин относится к монофосфату, дифосфату или трифосфату любого из вышеупомянутых псевдоуридинов. В другом варианте осуществления термин относится к любому другому псевдоуридину, известному из уровня техники. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления химические модификации рибонуклеотидов кольцевого полирибонуклеотида могут приводить к усилению ускользания от иммунологического надзора. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование (моно-, ди- и три-), конъюгацию, инвертированные связи и т. д.), 3'-концевые модификации (конъюгацию, ДНК-нуклеотиды, инвертированные связи и т. д.), 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.

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. Неограничивающие примеры кольцевого полирибонуклеотида включают кольцевой полирибонуклеотид с модифицированными остовами или неприродными межнуклеозидными связями, как, например, с модифицированными или замененными фосфодиэфирными связями. Кольцевые полирибонуклеотиды, имеющие модифицированные остовы, включают, среди прочих, те, которые не имеют атома фосфора в остове. Для целей настоящей заявки и, как иногда упоминается в уровне техники, модифицированные РНК, которые не имеют атома фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут рассматриваться как олигонуклеозиды. В конкретных вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид будет содержать рибонуклеотиды с атомом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы кольцевых полирибонуклеотидов могут включать в себя, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, 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 имеют инвертированную полярность, где соседние пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5'-5'-3' или 2'-5'-5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть отрицательно или положительно заряжен.

Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в состав кольцевого полирибонуклеотида, могут иметь модификацию межнуклеозидной связи (например, фосфатного остова). В данном документе применительно к полинуклеотидному остову фразы "фосфат" и "фосфодиэфир" используются взаимозаменяемо. Фосфатные группы остова могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких атомов кислорода другим 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 фосфотиоат, фосфоселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные сложные эфиры, гидрофосфонаты, фосфорамидаты, фосфодиамидаты, 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 фосфотиоаты) и углерода (мостиковые метиленфосфонаты).

α -тиозамещенный фосфатный компонент предусмотрен для придания стабильности РНК- и ДНК-полимерам посредством неприродных связей фосфотиоатного остова. Фосфотиоатная ДНК и РНК характеризуется повышенной устойчивостью к воздействию нуклеаз и, как следствие, более длительным периодом полужизни в клеточной среде. Фосфотиоат, связанный с кольцевым полирибонуклеотидом, как ожидается, будет приводить к ослаблению врожденного иммунного ответа благодаря более слабому связыванию/активации молекул врожденного клеточного иммунитета.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеозид включает α -тионуклеозид (например, 5'-О-(1-тиофосфат)-аденозин, 5'-О-(1-тиофосфат)-цитидин (α -тио-цитидин), 5'-О-(1-тиофосфат)-гуанозин, 5'-О-(1-тиофосфат)-уридин или 5'-О-(1-тиофосфат)-псевдоуридин). Другие межнуклеозидные связи могут включать межнуклеозидные связи, которые не содержат атом фосфора.

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-Д-арабинопентофуранозил)-цитозин, децитабин, 5-фторурацил, флударабин, флоксуридин, гемцитабин, комбинацию тегафура и урацила, тегафур ((R,S)-5-фтор-1-(тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H-дион)), троксацитабин, тезацитабин, 2'-дезоксид-2'-метилиденцитидин (DMDC) и 6-меркаптопурин. Дополнительные примеры включают флударабина фосфат, N4-бегеноил-1-бета-Д-арабинофуранозилцитозин, N4-октадецил-1-бета-Д-арабинофуранозилцитозин, N4-пальмитоил-1-(2-С-циано-2-дезоксид-бета-Д-арабинопентофуранозил)цитозин и P-4055 (сложный эфир цитарабина и 5'-элаидиновой кислоты).

Кольцевой полирибонуклеотид может быть однородно модифицированным по всей длине молекулы. Например, один или несколько или все типы нуклеотидов (например, встречающиеся в природе нуклеотиды, пурины или пиримидины или любые один или несколько или все из A, G, U, C, I, рU) могут быть однородно модифицированными в кольцевом полирибонуклеотиде или в указанной 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 вирусной РНК. Включение инозина также может опосредовать улучшение стабильности/снижение разрушения РНК.

В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в кольцевом полирибонуклеотиде (или в указанной области его последовательности) являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления модификация может включать мбА, который может усиливать экспрессию; инозин, который может ослаблять иммунный ответ; псевдоуридин, который может повышать стабильность РНК или

обеспечивать сквозное прочитывание при трансляции (стоп-кодон = кодирующий потенциал), m⁵C, который может увеличивать стабильность; а также 2,2,7-триметилгуанозин, который способствует субклеточной транслокации (например, ядерной локализации).

Различные модификации сахарного фрагмента, модификации нуклеотидов и/или межнуклеозидных связей (например, структур остова) могут существовать в различных положениях в кольцевом полирибонуклеотиде. Среднему специалисту в данной области будет понятно, что аналоги нуклеотидов или другие модификации могут быть расположены в любом(любых) положении(положениях) кольцевого полирибонуклеотида, так чтобы функция кольцевого полирибонуклеотида значительно 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 A, 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 1% 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%).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, предусмотренный в данном документе, представляет собой модифицированный кольцевой полирибонуклеотид. Например, полностью модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит все или по сути все модифицированные аденозиновые остатки, все или по сути все модифицированные уридиновые остатки, все или по сути все модифицированные гуаниновые остатки, все или по сути все модифицированные цитидиновые остатки или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, предусмотренный в данном документе, представляет собой гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид. Гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид может содержать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и может содержать часть, состоящую из смежных немодифицированных нуклеотидов. Данная немодифицированная часть гибридно-

модифицированного кольцевого полирибонуклеотида может содержать по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15 или 20 смежных немодифицированных нуклеотидов или любое число в промежутке между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная часть гибридно-модифицированного кольцевого полирибонуклеотида содержит по меньшей мере приблизительно 30, 40, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 250, 280, 300, 320, 350, 380, 400, 420, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 или 1000 смежных немодифицированных нуклеотидов или любое число в промежутке между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более немодифицированных частей. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 7%, 8%, 10%, 12%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99%, но менее 100%, нуклеотидов, являющихся модифицированными. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная часть содержит сайт связывания. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная часть содержит сайт связывания, имеющий конфигурацию, позволяющую ему связываться с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная часть содержит IRES.

В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид характеризуется более низкой иммуногенностью, чем соответствующий немодифицированный кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид характеризуется иммуногенностью, в по меньшей мере приблизительно 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более низкой по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления иммуногенность, описанную в данном документе, оценивают по уровню экспрессии, или передаче сигнала, или активации по меньшей мере одного из RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR и IFN-бета. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид характеризуется более высоким показателем периода полужизни, чем соответствующий немодифицированный

кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид характеризуется показателем периода полужизни, в по меньшей мере приблизительно 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более высоким по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления период полужизни измеряется путем введения кольцевого полирибонуклеотида или соответствующего кольцевого полирибонуклеотида в клетку и измерения уровня введенного кольцевого полирибонуклеотида или соответствующего кольцевого полирибонуклеотида внутри клетки.

В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей гибридно-модифицированного кольцевого полирибонуклеотида характеризуются эффективностью трансляции, сходной или более высокой по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей гибридно-модифицированного кольцевого полирибонуклеотида характеризуются эффективностью трансляции, в по меньшей мере приблизительно 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8 или 3 раза более высокой по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей гибридно-модифицированного кольцевого полирибонуклеотида характеризуются более высокой эффективностью трансляции по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим часть, содержащую модифицированный нуклеотид (например, часть соответствует немодифицированной части гибридно-модифицированного кольцевого полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида имеют конфигурацию, позволяющую им обладать более высокой эффективностью трансляции по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим первую часть, содержащую более 10% или по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько экспрессионных последовательностей гибридно-модифицированного кольцевого полирибонуклеотида характеризуются эффективностью трансляции, в по меньшей мере приблизительно 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8,

4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более высокой по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим часть, содержащую модифицированный нуклеотид (например, часть соответствует немодифицированной части гибридно-модифицированного кольцевого полирибонуклеотида). Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления эффективность трансляции измеряется в клетке, содержащей кольцевой полирибонуклеотид или соответствующий кольцевой полирибонуклеотид, либо в системе трансляции *in vitro* (например, в лизате ретикулоцитов кролика).

В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт связывания, который является немодифицированным, например, который не содержит модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт связывания, имеющий конфигурацию, позволяющую ему связываться с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью, который является немодифицированным, например, который не содержит модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит участок внутренней посадки рибосомы (IRES), который является немодифицированным, например, который не содержит модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит в сайте связывания не более 10% нуклеотидов, представляющих собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит в сайте связывания, имеющем конфигурацию, позволяющую ему связываться с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью, не более 10% нуклеотидов, представляющих собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит в участке внутренней посадки рибосомы (IRES) не более 10% нуклеотидов, представляющих собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит модифицированные нуклеотиды по всей своей длине, за исключением сайта связывания. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит модифицированные нуклеотиды по всей своей длине, за исключением сайта связывания, имеющего конфигурацию, позволяющую ему связываться с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит модифицированные нуклеотиды по всей своей длине, за исключением элемента IRES. В

других вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит модифицированные нуклеотиды по всей своей длине, за исключением элемента IRES и одной или нескольких других частей. Без ограничения какой-либо теорией считается, что немодифицированный элемент IRES делает гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид трансляционно компетентным, например, таким, в котором одна или несколько его экспрессионных последовательностей характеризуются эффективностью трансляции, сходной или более высокой по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, не содержащим каких-либо модифицированных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид содержит модифицированные нуклеотиды, например, 5'-метилцитидин и псевдоуридин, по всей длине кольцевого полирибонуклеотида, за исключением элемента IRES или сайта связывания, имеющего конфигурацию, позволяющую ему связываться с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью. В таких случаях гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид характеризуется более низкой иммуногенностью по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, который не содержит 5'-метилцитидин и псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид характеризуется иммуногенностью, в по меньшей мере приблизительно 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более низкой по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления иммуногенность, описанную в данном документе, оценивают по экспрессии, или передаче сигнала, или активации по меньшей мере одного из RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR и IFN-бета. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид характеризуется более высоким показателем периода полужизни, чем соответствующий немодифицированный кольцевой полирибонуклеотид, например, соответствующий кольцевой полирибонуклеотид, который не содержит 5'-метилцитидин и псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид характеризуется более высоким показателем периода полужизни, который является в по меньшей мере приблизительно 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более высоким по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления период полужизни

измеряется путем введения кольцевого полирибонуклеотида или соответствующего кольцевого полирибонуклеотида в клетку и измерения уровня введенного кольцевого полирибонуклеотида или соответствующего кольцевого полирибонуклеотида внутри клетки.

В некоторых случаях гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, характеризуется сходной иммуногенностью по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, который в остальном является таким же, но полностью модифицированным. Например, гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид, который содержит 5'-метилцитидин и псевдоуридин по всей своей длине, за исключением элемента IRES, может характеризоваться сходной иммуногенностью или более низкой иммуногенностью по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, который в остальном является таким же, но содержит 5'-метилцитидин и псевдоуридин по всей своей длине и не содержит немодифицированные цитидин и уридин. В некоторых вариантах осуществления гибридно-модифицированный кольцевой полирибонуклеотид, который содержит 5'-метилцитидин и псевдоуридин по всей своей длине, за исключением элемента IRES, характеризуется эффективностью трансляции, сходной или более высокой по сравнению с эффективностью трансляции соответствующего кольцевого полирибонуклеотида, который в остальном является таким же, но содержит 5'-метилцитидин и псевдоуридин по всей своей длине и не содержит немодифицированные цитидин и уридин.

Конъюгация кольцевых полирибонуклеотидов

siRNA согласно настоящему изобретению может быть конъюгирована, например, с химическим соединением (например, малой молекулой), антителом или его фрагментом, пептидом, белком, аптамером, лекарственным средством или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления малая молекула может быть конъюгирована с siRNA с образованием тем самым siRNA, содержащей малую молекулу.

siRNA согласно настоящему изобретению может содержать конъюгационный компонент для обеспечения возможности конъюгации. Конъюгационный компонент может быть включен, например, во внутреннем сайте кольцевого полинуклеотида или на 5'-конце, 3'-конце или во внутреннем сайте линейного полинуклеотида. Конъюгационный компонент может быть включен химическим или ферментативным способом. Например, конъюгационный компонент может быть включен во время твердофазного синтеза олигонуклеотидов, котранскрипционно (например, с помощью выносливой РНК-полимеразы) или посттранскрипционно (например, с помощью РНК-метилтрансферазы). Конъюгационный компонент может представлять собой модифицированный нуклеотид

или аналог нуклеотида, например, бромдезоксиуридин. Конъюгационный компонент может содержать реакционноспособную группу или функциональную группу, например, азидную группу или алкиновую группу. Конъюгационный компонент может быть способен подвергаться хемоселективной реакции. Конъюгационный компонент может представлять собой гаптенную группу, например, содержащую дигоксигенин, 2,4-динитрофенил, биотин, авидин или выбранную из азолов, нитроарильных соединений, бензофуразанов, тритерпенов, мочевины, тиомочевины, ротенонов, оксазолов, тиазолов, кумаринов, циклолигнанов, гетеробиарильных соединений, азоарильных соединений или бензодиазепинов. Конъюгационный компонент может содержать диарилэтенный фотопереключател, способный подвергаться обратимой электроциклической перегруппировке. Конъюгационный компонент может содержать нуклеофил, карбанион и/или α,β -ненасыщенное карбонильное соединение.

circRNA может быть конъюгирована посредством химической реакции, например, с применением клик-химии, лигирования по Штаудингеру, образования связи C-C, катализируемого Pd (например, реакции Сузуки-Мияуры), реакции присоединения по Михаэлю, метатезиса олефинов или реакции Дильса-Альдера с инверсной подачей электронов. Для клик-химии могут использоваться пары функциональных групп, которые быстро и селективно вступают в реакцию ("клик-реакцию") друг с другом при подходящих условиях реакции. Неограничивающие примеры реакций клик-химии включают азид-алкиновое циклоприсоединение, катализируемое медью 1,3-диполярное азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC), ускоряемую напряжением азид-алкиновую реакцию клик-химии (SPAAC) и тетразин-алкеновое лигирование.

Неограничивающие примеры функционализированных нуклеотидов включают азид-модифицированные аналоги UTP, 5-азидометил-UTP, 5-азидо-C3-UTP, 5-азидо-PEG4-UTP, 5-этинил-UTP, DBCO-PEG4-UTP, винил-UTP, 8-азидо-ATP, 3'-азидо-2',3'-ddATP, 5-азидо-PEG4-CTP, 5-DBCO-PEG4-CTP, N6-азидогексил-3'-dATP, 5-DBCO-PEG4-dCpG и 5-азидопропил-UTP. В некоторых вариантах осуществления circRNA содержит по меньшей мере один 5-азидометил-UTP, 5-азидо-C3-UTP, 5-азидо-PEG4-UTP, 5-этинил-UTP, DBCO-PEG4-UTP, винил-UTP, 8-азидо-ATP, 5-азидо-PEG4-CTP, 5-DBCO-PEG4-CTP или 5-азидопропил-UTP.

Отдельный выбранный модифицированный нуклеотид (например, модифицированный A, C, G, U или T, содержащий азид в положении 2') может быть сайт-специфически включен при оптимизированных условиях (например, посредством твердофазного химического синтеза). Множество нуклеотидов, содержащих азид в

положении 2', могут быть включены, например, посредством замены нуклеотида во время реакции транскрипции *in vitro* (например, замены UTP на 5-азидо-C3-UTP).

Конъюгат *circRNA* может быть получен с помощью катализируемой медью клик-реакции, например, катализируемого медью 1,3-диполярного азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) функционализированной алкином малой молекулы и функционализированной азидом полирибонуклеиновой кислоты. Линейная РНК может быть конъюгирована с малой молекулой. Например, линейная РНК может быть модифицирована на своем 3'-конце с помощью дериватизированного азидом нуклеотида под действием поли(А)-полимеразы. Азид может быть конъюгирован с малой молекулой посредством катализируемой медью или ускоряемой напряжением азид-алкиновой клик-реакции, и линейная РНК может быть циркуляризована.

Конъюгат *circRNA* может быть получен с помощью реакции Штаудингера. Например, кольцевая РНК, содержащая функционализированный азидом нуклеотид, может быть конъюгирована с функционализированной алкином малой молекулой в присутствии трифенилфосфин-3,3',3''-трисульфоновой кислоты (TPPTS).

Конъюгат *circRNA* может быть получен с помощью реакции Сузуки-Мияуры. Например, *circRNA*, содержащая галогенированный аналог нуклеотида, может быть подвергнута реакции Сузуки-Мияуры в присутствии когнатного реакционноспособного партнера. *circRNA*, содержащая 5-йодуридинтрифосфат (IUTP), например, может использоваться в каталитической системе с Pd(OAc)₂ и 2-аминопиримидин-4,6-диолом (ADHP) или диметиламинозамещенным ADHP (DMADHP) для функционализации меченной йодуридином *circRNA* в присутствии разнообразных субстратов, представляющих собой бороновую кислоту и ее сложные эфиры. В другом примере *circRNA*, содержащая 8-бромгуанозин, может подвергаться реакции с арилбороновыми кислотами в присутствии каталитической системы, образованной Pd(OAc)₂ и водорастворимым трифенилфосфин-3,3',3''-трисульфонатным лигандом.

Конъюгат *circRNA* может быть получен с помощью реакции присоединения по Михаэлю, например, посредством реакции между богатым электронами донором Михаэля и α,β -ненасыщенным соединением (акцептором Михаэля).

Структура

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит структуру высшего порядка, например, вторичную или третичную структуру. В некоторых вариантах осуществления комплементарные сегменты кольцевого полирибонуклеотида сворачиваются в двухнитевой сегмент, удерживаясь вместе посредством водородных связей в парах, например, А-У и С-Г. В некоторых вариантах осуществления спирали,

также известные как стебли, образуются внутри молекулы и имеют двухнитевой сегмент, соединенный с концевой петлей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет по меньшей мере один сегмент с псевдодвухнитевой вторичной структурой. В некоторых вариантах осуществления сегмент, имеющий псевдодвухнитевую вторичную структуру, имеет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более) сегментов, имеющих псевдодвухнитевую вторичную структуру. В некоторых вариантах осуществления сегменты отделены друг от друга 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 более нуклеотидами.

Существует 16 возможных пар оснований, однако фактически могут образовываться шесть из этих пар оснований (AU, GU, GC, UA, UG, CG). Остальные называются ошибками спаривания и встречаются в спиральных с очень низкой частотой. В некоторых вариантах осуществления структура кольцевого полирибонуклеотида не может быть легко нарушена без влияния на его функцию и летальных последствий, что обеспечивает отбор, направленный на поддержание вторичной структуры. В некоторых вариантах осуществления первичная структура стеблей (т. е. их нуклеотидная последовательность) по-прежнему может варьироваться при сохранении спиральных областей. Природа оснований является вторичной по отношению к высшей структуре, и замены возможны при условии, что они позволяют сохранить вторичную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет по меньшей мере один сегмент с псевдоспиральной структурой. В некоторых вариантах осуществления сегмент, имеющий псевдоспиральную структуру, имеет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более) сегментов, имеющих псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления сегменты отделены друг от друга 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 более нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну из U-богатой или A-богатой последовательности или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления U-

богатые и/или А-богатые последовательности расположены таким образом, что образуется тройная псевдоспиральная структура. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет двойную псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более) сегментов, имеющих двойную псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну из С-богатой и/или G-богатой последовательности. В некоторых вариантах осуществления С-богатые и/или G-богатые последовательности расположены таким образом, что образуется тройная псевдоспиральная структура. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет внутримолекулярную тройную псевдоспиральную структуру, которая способствует стабилизации.

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сайт связывания с miRNA, по меньшей мере один сайт связывания с lncRNA и/или по меньшей мере один мотив tRNA.

Доставка

Кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может быть включен в фармацевтические композиции с носителем для доставки.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены, например, с включением фармацевтического наполнителя или носителя. Фармацевтический носитель может представлять собой мембрану, липидный бислой и/или полимерный носитель, например, липосому или частицу, такую как наночастица, например, липидная наночастица, и доставляться посредством известных способов 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); электропорацию или другие способы разрушения мембран (например, нуклеофекцию), слияние и вирусную доставку (например, с помощью лентивируса, ретровируса, аденовируса, AAV).

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 растением, насекомым, бактерией, грибом, позвоночным, млекопитающим (например, человеком) или другим организмом или клеткой.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является неиммуногенным у хозяина. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид вызывает уменьшенный ответ иммунной системы хозяина или неспособен его вызывать по сравнению с ответом, запускаемым эталонным соединением, например, линейным полинуклеотидом, соответствующим описанному кольцевому полирибонуклеотиду, немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом или кольцевым полирибонуклеотидом, в котором отсутствует инкриптоген. Некоторые виды иммунного ответа включают в себя без ограничения виды гуморального иммунного ответа (например, выработку антигенспецифических антител) и виды клеточноопосредованного иммунного ответа (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 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 увеличиваются или уменьшаются в присутствии кольцевого полирибонуклеотида, то кольцевой полирибонуклеотид, или продукт экспрессии, или они оба идентифицируются как эффективные в отношении увеличения или уменьшения темпов роста хозяина.

Способы получения

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе и может быть получена с использованием технологии рекомбинантной ДНК или химического синтеза.

В объем настоящего изобретения входит то, что молекула ДНК, используемая для образования кольцевой РНК, может содержать последовательность ДНК из встречающейся в природе исходной последовательности нуклеиновой кислоты, ее модифицированный вариант или последовательность ДНК, кодирующую синтетический полипептид, обычно не обнаруживаемый в природе (например, химерные молекулы или слитые белки). Молекулы ДНК могут быть модифицированы с использованием различных методик, в том числе без ограничения классических методик мутагенеза и методик рекомбинантных ДНК, таких как сайт-направленный мутагенез, химическая обработка молекулы нуклеиновой

кислоты с целью индукции мутаций, расщепление фрагмента нуклеиновой кислоты ферментом рестрикции, лигирование фрагментов нуклеиновой кислоты, амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или мутагенез выбранных областей последовательности нуклеиновой кислоты, синтез смесей олигонуклеотидов и лигирование групп смесей для "создания" смеси молекул нуклеиновых кислот и их комбинаций.

Кольцевой полирибонуклеотид может быть получен, например, с помощью химического синтеза и ферментативного синтеза. В некоторых вариантах осуществления линейную первичную конструкцию или линейную mRNA можно подвергнуть циклизации или конкатемеризации для создания кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Механизм циклизации или конкатемеризации можно осуществлять с помощью таких способов, как, без ограничения, химические, ферментативные способы или способы рибозимного катализа. Новообразовавшаяся 5'- или 3'-связь может представлять собой внутримолекулярную связь или межмолекулярную связь.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение предусматривает композиции в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Фармацевтические композиции могут необязательно содержать одно или несколько дополнительных активных веществ, например, терапевтически и/или профилактически активные вещества. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть стерильными и/или апирогенными. Общие соображения относительно составления и/или изготовления фармацевтических средств можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005, включенной в данный документ посредством ссылки. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ получения фармацевтической композиции, описанной в данном документе, включающий получение кольцевого полирибонуклеотида.

Хотя описания фармацевтических композиций, предусмотренных 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, животным, отличным от человека, и млекопитающим, отличным от человека. 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 в себя 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, можно получать с помощью любого способа, известного или разработанного в будущем в области фармакологии. Как правило, такие способы получения включают стадию объединения активного ингредиента с наполнителем и/или одним или несколькими другими вспомогательными ингредиентами и затем, при необходимости и/или при желании, разделения, придания формы и/или упаковки продукта.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть представлены в виде стандартных лекарственных форм, подходящих для однократного введения точно отмеренных доз. В стандартной лекарственной форме состав разделен на однократные дозы, содержащие подходящие количества одного или нескольких соединений. Однократная дозировка может быть представлена в форме упаковки, в которой содержатся дискретные количества состава. Неограничивающими примерами являются упакованные лекарственные формы для инъекций, флаконы или ампулы. Композиции в виде водной суспензии могут быть упакованы в однодозовые контейнеры без возможности повторного закрывания. Многодозовые контейнеры с возможностью повторного закрывания могут использоваться, например, в комбинации с консервантом или без него. Составы для инъекций могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах с консервантом.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую (а) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью, например, РНК, ДНК, белком, мембраной клетки и т. д.; и (b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель; при этом мишень и кольцевой полирибонуклеотид образуют комплекс, при этом мишень не представляет собой микроРНК.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания представляет собой первый сайт связывания, и мишень представляет собой первую мишень. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую (а) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий: (i) первый сайт

связывания, который связывается с первой мишенью; и (ii) второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью; и (b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель; при этом первый сайт связывания отличается от второго сайта связывания, при этом первая мишень и вторая мишень представляют собой микроРНК.

В некоторых вариантах осуществления первая мишень содержит первый мотив связывания с кольцевым полирибонуклеотидом (circRNA). В некоторых вариантах осуществления вторая мишень содержит второй мотив связывания с кольцевым полирибонуклеотидом (circRNA). В некоторых вариантах осуществления первая мишень, вторая мишень и кольцевой полирибонуклеотид образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления первая мишень и вторая мишень взаимодействуют друг с другом. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует клеточный процесс при контакте с клеткой. В некоторых вариантах осуществления образование комплекса приводит к модулированию клеточного процесса при контакте с клеткой. В таких вариантах осуществления клеточный процесс ассоциирован с патогенезом заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид модулирует клеточный процесс, ассоциированный с первой или второй мишенью, при контакте с клеткой. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая мишени взаимодействуют друг с другом в составе комплекса. В некоторых вариантах осуществления клеточный процесс ассоциирован с патогенезом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления клеточный процесс является отличным от трансляции кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления первая мишень содержит молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), и мишень содержит белок. В некоторых вариантах осуществления комплекс модулирует управляемую транскрипцию молекулы ДНК, эпигенетическое ремоделирование молекулы ДНК или разрушение молекулы ДНК.

В некоторых вариантах осуществления первая мишень содержит первый белок, и вторая мишень содержит второй белок. В таких вариантах осуществления комплекс модулирует разрушение первого белка, транслокацию первого белка или передачу сигнала или модулирует образование комплекса, образующегося путем непосредственного взаимодействия между первым и вторым белками (например, ингибирует образование комплекса или способствует ему).

В некоторых вариантах осуществления первая мишень содержит первую молекулу рибонуклеиновой кислоты (РНК), и вторая мишень содержит вторую молекулу РНК. В таких вариантах осуществления комплекс может модулировать разрушение первой молекулы РНК.

В некоторых вариантах осуществления мишень содержит белок, и вторая мишень содержит молекулу РНК. В таких вариантах осуществления комплекс модулирует транслокацию белка или ингибирует образование комплекса, образуемого путем непосредственного взаимодействия между белком и молекулой РНК.

В некоторых вариантах осуществления первая мишень представляет собой рецептор, и вторая мишень представляет собой субстрат рецептора. В таких вариантах осуществления комплекс ингибирует активацию рецептора. Используемый в данном документе термин "рецептор" может относиться к молекуле белка, которая получает химические сигналы из среды за пределами клетки. Химические сигналы могут включать без ограничения органические соединения, являющиеся малыми молекулами (например, аминокислоты и их производные, например, глутамат, глицин, гамма-масляную кислоту), липиды, белок или полипептиды, молекулы ДНК и РНК и ионы. Рецептор может присутствовать на клеточной мембране, в цитоплазме или в клеточном ядре. Химические сигналы, которые связываются с рецептором, могут, как правило, называться "субстратом" рецептора. При связывании с химическим сигналом рецептор может обуславливать некоторую форму клеточного ответа посредством инициации одного или нескольких клеточных процессов, например, сигнальных путей. Рецептор, предусмотренный в данном документе, может представлять собой любой тип рецептора, известный специалисту в данной области, в том числе: (1) ионотропные рецепторы, которые могут являться мишенями для нейромедиаторов быстрого действия, таких как ацетилхолин (никотиновые рецепторы) и ГАВА; и активация таких рецепторов приводит к изменениям в движении ионов через мембрану. Они могут иметь гетеромерную структуру, при этом каждая субъединица состоит из внеклеточного лигандсвязывающего домена и трансмембранного домена, при этом трансмембранный домен, в свою очередь, содержит четыре трансмембранные альфа-спирали. Лигандсвязывающие полости могут располагаться в области раздела между субъединицами; (2) рецепторы, сопряженные с G-белком, которые могут включать рецепторы для некоторых гормонов и нейромедиаторов медленного действия, например, дофаминовые, метаболитные глутаматные рецепторы. Они могут состоять из семи трансмембранных альфа-спиралей. Петли, соединяющие альфа-спирали, могут образовывать внеклеточные и внутриклеточные домены; (3) связанные с киназами и родственные киназам рецепторы (или рецепторные тирозинкиназы), которые могут состоять из внеклеточного домена, содержащего лигандсвязывающий сайт, и внутриклеточного домена, часто имеющего функцию фермента, связанных с помощью одной трансмембранной альфа-спирали. Инсулиновый рецептор представляет собой пример данного типа рецепторов, для которого инсулин может являться соответствующим

субстратом; (4)(https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor) ядерные рецепторы, которые могут располагаться в ядре либо в цитоплазме и мигрировать в ядро после связывания со своими лигандами. Они могут состоять из С-концевой лигандсвязывающей области, сердцевинного ДНК-связывающего домена (DBD) и N-концевого домена, который содержит область *AF1* (активации функции 1). Рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов являются примерами таких рецепторов, и их соответствующие субстраты могут включать разнообразные стероиды и гормоны.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую (а) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью; и (b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель; при этом кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным, при этом мишень не представляет собой микроРНК.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую (а) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью, при этом мишень содержит первый мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и (b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель; при этом кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным, при этом мишень представляет собой микроРНК.

В таких вариантах осуществления мишень содержит молекулу ДНК. В таких вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования транскрипции молекулы ДНК. В таких вариантах осуществления мишень содержит белок. В таких вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию взаимодействия белка с другими молекулами. В таких вариантах осуществления белок представляет собой рецептор, и связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к активации рецептора. В таких вариантах осуществления белок представляет собой первый фермент, кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со вторым ферментом, и связывание первого и второго ферментов с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию ферментативной активности первого и второго ферментов. В таких вариантах осуществления мишень содержит молекулу матричной РНК (mRNA). В таких вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования трансляции молекулы mRNA. В таких вариантах

осуществления мишень содержит рибосому. В таких вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования процессу трансляции. В таких вариантах осуществления мишень содержит кольцевую молекулу РНК. В таких вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к секвестрации кольцевой молекулы РНК. В таких вариантах осуществления связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к секвестрации мишени.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую (а) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с клеточной мембраной клетки-мишени; и при этом клеточная мембрана клетки-мишени содержит первый мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и (b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй мембраной второй клетки-мишени, где вторая клеточная мембрана второй клетки-мишени содержит второй РНК-связывающий мотив. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид связывается как с клеточной мембраной в клетке-мишени, так и со второй клеточной мембраной второй клетки-мишени, и происходит модулирование слияния клеток с участием первой и второй клеток-мишеней.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью, и связывание как первой, так и второй мишеней с кольцевым полирибонуклеотидом индуцирует конформационное изменение в первой мишени, за счет чего индуцируется передача сигнала в нисходящем направлении от первой мишени в первой клетке. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным.

В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота дополнительно содержит по меньшей мере один структурный элемент, выбранный из: а) инкриптогена; b) сплайсингового элемента; с) регуляторной последовательности; d) репликативной последовательности; e) псевдодвухнитевой вторичной структуры и f) экспрессионной последовательности. В таких вариантах осуществления псевдоспиральная структура содержит по меньшей мере один двухнитевой сегмент РНК с по меньшей мере одним сегментом, отличным от двухнитевого. В таких вариантах осуществления псевдоспиральная структура содержит первую последовательность и вторую

последовательность, связанные с помощью повторяющейся последовательности, например, А-богатой последовательности. В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит сплайсинговый элемент.

В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну модифицированную нуклеиновую кислоту. В таких вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из 2'-О-метил-, 2'-О-метоксиэтил- (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил-, 2'-дезоксид-, Т-дезоксид-2'-фтор-, 2'-О-аминопропил- (2'-О-АP), 2'-О-диметиламиноэтил- (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил- (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтил- (2'-О-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидомодифицированной (2'-О-NMA) нуклеиновой кислоты, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), нуклеиновой кислоты с этиленовым мостиком (ENA), пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA), 1',5'-ангидрогекситмодифицированной нуклеиновой кислоты (HNA), морфолиновой нуклеиновой кислоты, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор-N3-P5'-фосфорамидита. Кольцевые полирибонуклеотиды могут представлять собой полностью модифицированные кольцевые полирибонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления вводимые кольцевые полирибонуклеотиды представляют собой гибридно-модифицированные кольцевые полирибонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит модифицированные нуклеотиды и немодифицированный IRES.

В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит по меньшей мере одну модифицированную нуклеиновую кислоту, например, псевдоуридин и N(6)-метиладенозин (m6A). В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит сайт связывания с белком, например, для белка, связывающего рибонуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит сайт связывания с иммунным белком, например, для ускользания от ответов с участием CTL.

В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота характеризуется в по меньшей мере 2 раза более низкой иммуногенностью, чем ее эквивалент, в котором отсутствует инкриптоген, как оценивается по экспрессии, или передаче сигнала, или активации по меньшей мере одного из RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR и IFN-бета. В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота имеет размер в диапазоне от приблизительно 20 оснований до приблизительно 20 т. о. В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота синтезируется посредством циркуляризации линейного

полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевая полирибонуклеиновая кислота является в значительной степени устойчивой к разрушению.

Пути применения

Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут вводиться в клетку, ткань или организм субъекта, нуждающегося в этом, например, с целью модулирования клеточной функции или клеточного процесса, например, экспрессии гена в клетке, ткани или организме субъекта. Настоящее изобретение также предусматривает способы модулирования клеточной функции или клеточного процесса, например, экспрессии гена, включающие введение в клетку, ткань или организм субъекта, нуждающегося в этом, кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Вводимые кольцевые полирибонуклеотиды могут представлять собой модифицированные кольцевые полирибонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления вводимые кольцевые полирибонуклеотиды представляют собой полностью модифицированные кольцевые полирибонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления вводимые кольцевые полирибонуклеотиды представляют собой гибридно-модифицированные кольцевые полирибонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления вводимые кольцевые полирибонуклеотиды представляют собой немодифицированные кольцевые полирибонуклеотиды.

Варианты осуществления по абзацам

[1] Фармацевтическая композиция, содержащая:

- (a) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью, например, РНК, ДНК, белком, мембраной клетки и т. д.; и
 - (b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель;
- при этом мишень и кольцевой полирибонуклеотид образуют комплекс, и при этом мишень не представляет собой микроРНК.

[2] Фармацевтическая композиция, содержащая:

- (a) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий:
 - (i) первый сайт связывания, который связывается с первой мишенью, и
 - (ii) второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью; и
 - (b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель;
- при этом первый сайт связывания отличается от второго сайта связывания, и при этом как первая мишень, так и вторая мишень представляют собой микроРНК.

[3] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [1], где сайт связывания содержит аптамерную последовательность.

[4] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [2], где первый сайт связывания содержит первую аптамерную последовательность, и второй сайт связывания содержит вторую аптамерную последовательность.

[5] Фармацевтическая композиция согласно пункту [3], где аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью.

[6] Фармацевтическая композиция согласно пункту [4], где первая аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с первой мишенью, и вторая аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается со второй мишенью.

[7] Фармацевтическая композиция согласно пункту [1], где сайт связывания представляет собой первый сайт связывания, и мишень представляет собой первую мишень.

[8] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [3], [5] и [7], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью.

[9] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6], [7] и [8], где первая мишень содержит первый мотив связывания с кольцевым полирибонуклеотидом (circRNA).

[10] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[9], где вторая мишень содержит второй мотив связывания с кольцевым полирибонуклеотидом (circRNA).

[11] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[10], где первая мишень, вторая мишень и кольцевой полирибонуклеотид образуют комплекс.

[12] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[11], где первая и вторая мишени взаимодействуют друг с другом.

[13] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1], [3], [5] и [7]-[12], где комплекс модулирует клеточный процесс.

[14] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[13], где первая и вторая мишени являются одинаковыми, и первый и второй сайты связывания связываются с разными сайтами связывания в первой мишени и второй мишени.

[15] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[13], где первая мишень и вторая мишень являются разными.

[16] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[15], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит один или несколько дополнительных сайтов связывания, которые связываются с третьей или последующими мишенями.

[17] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[16], где одна или несколько мишеней являются одинаковыми, и один или несколько дополнительных сайтов связывания связываются с разными сайтами связывания в одной или нескольких мишенях.

[18] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1], [3], [5] и [7]-[17], где образование комплекса приводит к модулированию клеточного процесса.

[19] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[18], где кольцевой полирибонуклеотид модулирует клеточный процесс, ассоциированный с первой или второй мишенью, при контакте с первой и второй мишенями.

[20] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[19], где первая и вторая мишени взаимодействуют друг с другом в составе комплекса.

[21] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [13]-[20], где клеточный процесс ассоциирован с патогенезом заболевания или состояния.

[22] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [13]-[21], где клеточный процесс является отличным от трансляции кольцевой полирибонуклеиновой кислоты.

[23] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[22], где первая мишень содержит молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), и вторая мишень содержит белок.

[24] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1], [3], [5] и [7]-[23], где комплекс модулирует управляемую транскрипцию молекулы ДНК, эпигенетическое ремоделирование молекулы ДНК или разрушение молекулы ДНК.

[25] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[24], где первая мишень содержит первый белок, и вторая мишень содержит второй белок.

[26] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1], [3], [5] и [7]-[25], где комплекс модулирует разрушение первого белка, транслокацию первого белка или передачу сигнала или модулирует функцию нативного белка, ингибирует или модулирует образование комплекса, образуемого путем непосредственного взаимодействия между первым и вторым белками.

[27] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[26], где первая мишень или вторая мишень представляет собой убиквитинлигазу.

[28] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[27], где первая мишень содержит первую молекулу рибонуклеиновой кислоты (РНК), и вторая мишень содержит вторую молекулу РНК.

[29] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [28], где комплекс модулирует разрушение первой молекулы РНК.

[30] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[29], где первая мишень содержит белок, и вторая мишень содержит молекулу РНК.

[31] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1], [3], [5] и [7]-[30], где комплекс модулирует транслокацию белка или ингибирует образование комплекса, образуемого путем непосредственного взаимодействия между белком и молекулой РНК.

[32] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [2], [4], [6] и [7]-[31], где первая мишень представляет собой рецептор, и вторая мишень представляет собой субстрат рецептора.

[33] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1], [3], [5] и [7]-[32], где комплекс ингибирует активацию рецептора.

[34] Фармацевтическая композиция, содержащая:

(а) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью; и

(b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель;

при этом кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным, и при этом мишень не представляет собой микроРНК.

[35] Фармацевтическая композиция, содержащая:

(а) кольцевую полирибонуклеиновую кислоту, содержащую сайт связывания, который связывается с мишенью, где мишень содержит мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и

(b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель;

при этом кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным, и при этом мишень представляет собой микроРНК.

[36] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [34] и [35], где сайт связывания содержит аптамерную последовательность, имеющую вторичную структуру, которая связывается с мишенью.

[37] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [34] и [36], где мишень содержит молекулу ДНК.

[38] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [34]-[37], где связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования транскрипции молекулы ДНК.

[39] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [34] и [36]-[38], где мишень содержит белок.

[40] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [39], где связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию взаимодействия белка с другими молекулами.

[41] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [39]-[40], где белок представляет собой рецептор, и при этом связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к активации рецептора.

[42] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [39]-[41], где белок представляет собой первый фермент, при этом кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со вторым ферментом, и при этом связывание первого и второго ферментов с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию ферментативной активности первого и второго ферментов.

[43] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [39] и [40], где белок представляет собой убиквитинлигазу.

[44] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [34], [36] и [38], где мишень содержит молекулу матричной РНК (mRNA).

[45] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [44], где связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования трансляции молекулы mRNA.

[46] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [34], [36], [39] и [40], где мишень содержит рибосому.

[47] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [34]-[46], где связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к модулированию препятствования процессу трансляции.

[48] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [34], [36] и [38], где мишень содержит кольцевую молекулу РНК.

[49] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [48], где связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к секвестрации кольцевой молекулы РНК.

[50] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [35], [36], [38], и [47], где связывание мишени с кольцевым полирибонуклеотидом приводит к секвестрации молекулы микроРНК.

[51] Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мембраной клетки (например, мембраной клеточной стенки, мембраной органеллы и т. д.), при этом мембрана клетки содержит мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и

(b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

[52] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [51], где сайт связывания содержит аптамерную последовательность, имеющую вторичную структуру, которая связывается с мембраной клетки (например, мембраной клеточной стенки, мембраной органеллы и т. д.).

[53] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [51] и [52], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй мишенью, при этом вторая мишень содержит второй РНК-связывающий мотив.

[54] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [53], где кольцевой полирибонуклеотид связывается с мембраной клетки и второй мишенью.

[55] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [51]-[54], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит второй сайт связывания, который связывается со второй клеточной мишенью, и при этом связывание клеточной мишени и второй клеточной мишени с кольцевым полирибонуклеотидом индуцирует конформационное изменение в клеточной мишени, за счет чего индуцируется передача сигнала в нисходящем направлении от клеточной мишени.

[56] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1]-[55], где кольцевой полирибонуклеотид является трансляционно некомпетентным или трансляционно дефектным.

[57] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1]-[56], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит по меньшей мере один структурный элемент, выбранный из группы, состоящей из:

- a) инкриптогена;
- b) сплайсингового элемента;
- c) регуляторной последовательности;
- d) репликативной последовательности;

- e) псевдодвухнитевой вторичной структуры;
- f) псевдоспиральной структуры и
- g) экспрессионной последовательности.

[58] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [57], где псевдоспиральная структура содержит по меньшей мере один двухнитевой сегмент РНК с по меньшей мере одним сегментом, отличным от двухнитевого.

[59] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [57] и [58], где псевдоспиральная структура содержит первую последовательность и вторую последовательность, связанные с помощью повторяющейся последовательности.

[60] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [57]-[59], где инкриптоген содержит сплайсинговый элемент.

[61] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1]-[60], где кольцевая полирибонуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну модифицированную нуклеиновую кислоту.

[62] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [61], где по меньшей мере одна модифицированная нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из 2'-О-метил-, 2'-О-метоксиэтил- (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил-, 2'-дезоксидеокси-, Т-дезоксидеокси-2'-фтор-, 2'-О-аминопропил- (2'-О-АP), 2'-О-диметиламиноэтил- (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил- (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтил- (2'-О-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидомодифицированной (2'-О-NMA) нуклеиновой кислоты, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), нуклеиновой кислоты с этиленовым мостиком (ENA), пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA), 1',5'-ангидрогекситмодифицированной нуклеиновой кислоты (HNA), морфолиновой нуклеиновой кислоты, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор-N3-P5'-фосфорамидита.

[63] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [57]-[62], где инкриптоген содержит по меньшей мере одну модифицированную нуклеиновую кислоту.

[64] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [57]-[63], где инкриптоген содержит сайт связывания с белком.

[65] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [57]-[64], где инкриптоген содержит сайт связывания с иммунным белком.

[66] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [57]-[65], где кольцевая полирибонуклеиновая кислота характеризуется в по меньшей мере 2 раза более низкой иммуногенностью, чем ее эквивалент, в котором отсутствует инкриптоген, как оценивается по экспрессии, или передаче сигнала, или активации по меньшей мере одного из RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR и IFN-бета.

[67] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1]-[66], где кольцевая полирибонуклеиновая кислота имеет размер от приблизительно 20 оснований до приблизительно 20 т. о.

[68] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1]-[67], где кольцевая полирибонуклеиновая кислота синтезирована посредством циркуляризации линейного полинуклеотида.

[69] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [1]-[68], где кольцевая полирибонуклеиновая кислота является в значительной степени устойчивой к разрушению.

[70] Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью, при этом мишень содержит мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и

(b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель, при этом кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и первую часть, которая содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 смежных немодифицированных нуклеотидов.

[71] Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) кольцевой полирибонуклеотид, содержащий сайт связывания, который связывается с мишенью, при этом мишень содержит мотив связывания с рибонуклеиновой кислотой (РНК); и

(b) фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель, при этом кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и первую часть, которая содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 смежных нуклеотидов, и при этом в первой части отсутствует псевдоурidin или 5'-метилцитидин.

[72] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70] и [71], где сайт связывания содержит аптамерную последовательность, имеющую вторичную структуру, которая связывается с мишенью.

[73] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[72], где кольцевой полирибонуклеотид характеризуется более низкой иммуногенностью, чем соответствующий немодифицированный кольцевой полирибонуклеотид.

[74] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[72], где кольцевой полирибонуклеотид характеризуется иммуногенностью, в по меньшей мере

приблизительно 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более низкой по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом, как оценивается по экспрессии, или передаче сигнала, или активации по меньшей мере одного из группы, состоящей из RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR и IFN-бета.

[75] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[74], где кольцевой полирибонуклеотид характеризуется более высоким показателем периода полужизни, чем соответствующий немодифицированный кольцевой полирибонуклеотид.

[76] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[74], где кольцевой полирибонуклеотид характеризуется показателем периода полужизни, в по меньшей мере приблизительно 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более высоким по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом.

[77] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [75] и [76], где период полужизни измеряется путем введения кольцевого полирибонуклеотида или соответствующего немодифицированного кольцевого полирибонуклеотида в клетку и измерения уровня введенного кольцевого полирибонуклеотида или соответствующего кольцевого полирибонуклеотида внутри клетки.

[78] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[77], где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из N(6)метиладенозина (m6A), 5'-метилцитидина и псевдоуридина.

[79] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[77], где по меньшей мере одна модифицированная нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из 2'-О-метил-, 2'-О-метоксиэтил- (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил-, 2'-дезоксигуанидин-2'-фтор-, 2'-О-аминопропил- (2'-О-АП), 2'-О-диметиламиноэтил- (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил- (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтил- (2'-О-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидомодифицированной (2'-О-NMA) нуклеиновой кислоты, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), нуклеиновой кислоты с этиленовым мостиком (ENA), пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA), 1',5'-ангидрогекситмодифицированной нуклеиновой кислоты (HNA), морфолиновой нуклеиновой кислоты, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор-N3-P5'-фосфорамидита.

[80] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[79], где по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или

99% нуклеотидов кольцевого полирибонуклеотида представляют собой модифицированные нуклеотиды.

[81] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[80], где кольцевой полирибонуклеотид содержит сайт связывания, который связывается с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью, состоящий из немодифицированных нуклеотидов.

[82] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[81], где кольцевой полирибонуклеотид содержит участок внутренней посадки рибосомы (IRES), состоящий из немодифицированных нуклеотидов.

[83] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[80], где сайт связывания состоит из немодифицированных нуклеотидов.

[84] Фармацевтическая композиция согласно абзацу [83], где сайт связывания содержит IRES, состоящий из немодифицированных нуклеотидов.

[85] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[84], где первая часть содержит сайт связывания, который связывается с белком, ДНК, РНК или клеточной мишенью.

[86] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[85], где первая часть содержит IRES.

[87] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[86], где кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей.

[88] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [82]-[87], где кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей и IRES, и при этом кольцевой полирибонуклеотид содержит 5'-метилцитидин, псевдоуридин или их комбинацию за пределами IRES.

[89] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[88], где одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида имеют конфигурацию, позволяющую им обладать более высокой эффективностью трансляции по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом.

[90] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[89], где одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида характеризуются эффективностью трансляции, в по меньшей мере приблизительно 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8 или 3 раза более высокой по сравнению с соответствующим немодифицированным кольцевым полирибонуклеотидом.

[91] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[90], где одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида характеризуются более высокой эффективностью трансляции по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим первую часть, содержащую модифицированный нуклеотид.

[92] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[90], где одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида характеризуются более высокой эффективностью трансляции по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим первую часть, содержащую более 10% модифицированных нуклеотидов.

[93] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[92], где одна или несколько экспрессионных последовательностей кольцевого полирибонуклеотида характеризуются эффективностью трансляции, в по меньшей мере приблизительно 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0 раза более высокой по сравнению с соответствующим кольцевым полирибонуклеотидом, имеющим первую часть, содержащую модифицированный нуклеотид.

[94] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [89]-[93], где эффективность трансляции измеряется в клетке, содержащей кольцевой полирибонуклеотид или соответствующий кольцевой полирибонуклеотид, либо в системе трансляции *in vitro* (например, в лизате ретикулоцитов кролика).

[95] Фармацевтическая композиция согласно любому из абзацев [70]-[94], где кольцевой полирибонуклеотид представляет собой кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из пунктов [0]-[69].

[96] Способ лечения, включающий введение фармацевтической композиции согласно любому из абзацев [1]-[95] субъекту, у которого имеется заболевание или состояние.

[97] Способ получения фармацевтической композиции, включающий получение кольцевого полирибонуклеотида согласно любому из абзацев [1]-[95].

[98] Кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из абзацев [1]-[95], составленный в носителе, например, мембране или липидном бислое.

[99] Способ получения кольцевого полирибонуклеотида согласно любому из абзацев [1]-[95], включающий циркуляризацию линейного полирибонуклеотида, имеющего такую же последовательность нуклеиновой кислоты, как и у кольцевого полирибонуклеотида.

[100] Сконструированная клетка, содержащая композицию согласно любому из пунктов [1]-[95].

[101] Способ обеспечения связывания с мишенью в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, при этом аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с мишенью, который поддается выявлению в течение по меньшей мере 5 дней после доставки.

[102] Способ обеспечения связывания с мишенью в клетке, при этом способ включает:

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая связывается с мишенью, и при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с мишенью, который поддается выявлению в течение по меньшей мере 5 дней после доставки.

[103] Способ согласно любому из абзацев [101] и [102], где мишень выбрана из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты, малой молекулы, белка, углевода и липида.

[104] Способ согласно любому из абзацев [101]-[103], где мишень представляет собой белок, регулирующий активность гена.

[105] Способ согласно абзацу 104, где белок, регулирующий активность гена, представляет собой фактор транскрипции.

[106] Способ согласно абзацу [103], где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

[107] Способ согласно любому из абзацев [101]-[106], где комплекс модулирует экспрессию гена.

[108] Способ согласно любому из абзацев [101]-[107], где комплекс модулирует управляемую транскрипцию молекулы ДНК, эпигенетическое ремоделирование молекулы ДНК или разрушение молекулы ДНК.

[109] Способ согласно любому из абзацев [101]-[108], где комплекс модулирует разрушение мишени, транслокацию мишени или передачу сигнала к мишени.

[110] Способ согласно любому из абзацев [107]-[109], где экспрессия гена ассоциирована с патогенезом заболевания или состояния.

[111] Способ согласно любому из абзацев [101]-[110], где комплекс поддается выявлению в течение по меньшей мере 7, 8, 9 или 10 дней после доставки.

[112] Способ согласно любому из абзацев [101]-[111], где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид присутствует в течение по меньшей мере пяти дней после доставки.

[113] Способ согласно любому из абзацев [101]-[112], где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид присутствует в течение по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 дней после доставки.

[114] Способ согласно любому из абзацев [101]-[113], где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид представляет собой немодифицированный трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид.

[115] Способ согласно любому из абзацев [101]-[114], где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид имеет псевдодвухнитевую вторичную структуру.

[116] Способ согласно любому из абзацев [101]-[115], где аптамерная последовательность дополнительно имеет третичную структуру, которая связывается с мишенью.

[117] Способ согласно любому из абзацев [101]-[116], где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

[118] Способ согласно абзацу [117], где эукариотическая клетка представляет собой клетку человека.

[119] Способ обеспечения связывания с фактором транскрипции в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с фактором транскрипции и модулирует экспрессию гена.

[120] Способ обеспечения связывания с фактором транскрипции в клетке, при этом способ включает:

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид содержит

аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции, и при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с фактором транскрипции и модулирует экспрессию гена.

[121] Способ обеспечения секвестрации фактора транскрипции в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид секвестрирует фактор транскрипции посредством связывания с фактором транскрипции с образованием комплекса в клетке.

[122] Способ обеспечения секвестрации фактора транскрипции в клетке, при этом способ включает:

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции, и при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид секвестрирует фактор транскрипции посредством связывания с фактором транскрипции с образованием комплекса.

[123] Способ согласно любому из абзацев [121] и [122], где жизнеспособность клетки снижается после образования комплекса.

[124] Способ повышения чувствительности клетки к цитотоксическому средству, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и

доставку цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с фактором транскрипции в клетке;

за счет чего обеспечивается повышение чувствительности клетки к цитотоксическому средству по сравнению с клеткой, в которой отсутствует трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид.

[125] Способ повышения чувствительности клетки к цитотоксическому средству, при этом способ включает:

доставку цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с фактором транскрипции в клетке;

за счет чего обеспечивается повышение чувствительности клетки к цитотоксическому средству по сравнению с клеткой, в которой отсутствует трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид.

[126] Способ согласно любому из абзацев [124] и [125], где повышение чувствительности клетки к цитотоксическому средству приводит к снижению жизнеспособности клетки после доставки цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида.

[127] Способ согласно абзацу [126], где снижение жизнеспособности клетки представляет собой снижение на 40% или больше через по меньшей мере два дня после доставки цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида.

[128] Способ обеспечения связывания с патогенным белком в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с патогенным белком; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с патогенным белком для разрушения патогенного белка.

[129] Способ обеспечения связывания с патогенным белком в клетке, при этом способ включает:

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая связывается с патогенным белком; и при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с патогенным белком для разрушения патогенного белка.

[130] Способ обеспечения связывания с молекулой рибонуклеиновой кислоты в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, комплементарную последовательности молекулы рибонуклеиновой кислоты; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с молекулой рибонуклеиновой кислоты в клетке.

[131] Способ обеспечения связывания с молекулой рибонуклеиновой кислоты в клетке, при этом способ включает:

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая связывается с молекулой рибонуклеиновой кислоты; при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с молекулой рибонуклеиновой кислоты в клетке.

[132] Способ обеспечения связывания с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты и модулирует экспрессию гена.

[133] Способ обеспечения связывания с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетке, при этом способ включает:

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая связывается с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты; при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты и модулирует экспрессию гена.

[134] Способ обеспечения связывания с малой молекулой в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с малой молекулой; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с малой молекулой и модулирует клеточный процесс (например, разрушение белка, передачу сигнала в клетке, экспрессию гена и т. д.).

[135] Способ обеспечения связывания с малой молекулой в клетке, при этом способ включает:

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид содержит аптамерную последовательность, которая связывается с малой молекулой; при этом трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с малой молекулой и модулирует клеточный процесс (например, разрушение белка, передачу сигнала в клетке, экспрессию гена и т. д.).

[136] Способ согласно любому из абзацев [134] и [135], где малая молекула представляет собой органическое соединение с молекулярной массой, составляющей не более 900 дальтонов, и модулирует клеточный процесс.

[137] Способ согласно любому из абзацев [134]-[136], где малая молекула представляет собой лекарственное средство.

[138] Способ согласно любому из абзацев [134] и [135], где малая молекула представляет собой флуорофор.

[139] Способ согласно любому из абзацев [134]-[136], где малая молекула представляет собой метаболит.

[140] Композиция, содержащая трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид, содержащий аптамерную последовательность, при этом аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью.

[141] Фармацевтическая композиция, содержащая трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид, содержащий аптамерную последовательность, при этом аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью; и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

[142] Клетка, содержащая трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из абзацев [101]-[141].

[143] Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение композиции согласно любому из абзацев [101]-[140] или фармацевтической композиции согласно абзацу [141].

[144] Полинуклеотид, кодирующий трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид согласно любому из абзацев [101]-[141].

[145] Способ получения трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида согласно любому из абзацев [101]-[141].

Все литературные источники и публикации, цитируемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылки.

Следующие примеры представлены для дополнительной иллюстрации некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, например, с использованием элементов модели, однако не предполагают ограничения объема настоящего изобретения; из их иллюстративной природы будет понятно, что в качестве альтернативы можно применять другие процедуры, способы или методики, известные специалистам в данной области.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Кольцевая РНК, связывающая ДНК, для регуляции экспрессии генов

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с ДНК для регуляции экспрессии генов.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит последовательность в пределах модельного гена-мишени, в данном случае гена дигидрофолатредуктазы (DHFR). Обнаруживаемая во всех организмах, DHFR играет критически важную роль в регуляции количества тетрагидрофолата в клетке. Тетрагидрофолат и его производные являются существенно важными для синтеза пурина и тимидилата, которые важны для пролиферации и роста клеток. DHFR играет центральную роль в синтезе предшественников нуклеиновых кислот. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с геном DHFR, подавляя его транскрипцию.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит DHFR-связывающую последовательность 5'-АСАААУГГГГАСГАГГГГГСГГГГСГГСС-3' (SEQ ID NO: 5).

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего DHFR-связывающую последовательность, описанную выше. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки

РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Как показано на **фиг. 5C**, связывание одной кольцевой РНК с геномной ДНК DHFR оценивается с помощью нескольких способов, в том числе CHART-qPCR, которая позволяет оценить прямое связывание РНК с геномной ДНК, qPCR, специфичной для транскрипта DHFR, а также анализов пролиферации клеток и роста клеток. Ожидается, что активное связывание кольцевой РНК с геном DHFR приведет к снижению транскрипции DHFR, снижению синтеза пурина и тимидилата, а также к снижению пролиферации клеток и роста клеток.

Пример 2. Кольцевая РНК, связывающая dsDNA, для регуляции экспрессии генов

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с dsDNA для регуляции экспрессии генов.

Как показано на **фиг. 5D**, не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит последовательность, которая связывается с модельным геном-мишенью, в данном случае с последовательностями-мишенями трансформирующего фактора роста бета-1 (TGF- β). TGF- β секретируется многими типами клеток. После связывания с рецептором TGF- β рецептор фосфорилируется и активирует сигнальный каскад, который приводит к активации различных нижележащих субстратов и регуляторных белков. В следующем примере описано связывание кольцевой РНК с генами-мишенями TGF- β для подавления их транскрипции.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит TGF- β -связывающую последовательность-мишень 5'-CGGAGAGCAGAGAGGGAGCG-3' (SEQ ID NO: 6).

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего TGF- β -связывающую последовательность. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с dsDNA оценивают посредством триплексного анализа иммунного захвата. В данном случае образование тройных структур РНК-ДНК оценивают с использованием меченой биотином молекулы ssRNA, представляющей собой триплекс-образующий олигонуклеотид (TFO) (контрольной последовательности либо нацеливающейся последовательности 5'-CGGAGAGCAGAGAGGGAGCG-3' (SEQ ID NO: 7)) для соосаждения последовательностей ДНК-мишеней из клеток или из ядер, выделенных из клеток. ДНК, полученную путем соосаждения с биотинилированными нацеливающимися или контрольными TFO, секвенируют для определения последовательностей ДНК, обогащенных после соосаждения комплекса РНК-dsDNA.

Альтернативные способы демонстрации связывания РНК-ДНК включают CHART-qPCR и анализ сдвига подвижности в геле, где нацеливающийся ssRNA-олигонуклеотид (5'-CGGAGAGCAGAGAGGGAGCG-3' (SEQ ID NO: 7)) взаимодействует с олигонуклеотидом-мишенью dsDNA (5'-AGAGAGAGGGAGAGAG-3' (SEQ ID NO: 8) и 3'-TCTCTCTCCCTCTCTC-5' (SEQ ID NO: 9)), но не с контрольными ДНК-олигонуклеотидами.

Дополнительные оценки функциональных изменений, индуцированных после связывания РНК с мишенью, включают изменения в генах-мишенях TGF- β , в том числе TGFB2, TGFBR1 и/или SMAD2, измеренные с помощью qPCR.

Пример 3. Кольцевая РНК, связывающая ДНК, для регуляции экспрессии генов

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с ДНК для ингибирования связывания фактора транскрипции.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит последовательность связывания с последовательностью-мишенью, в данном случае последовательностью связывания с фактором транскрипции гена гамма-глобина. Фетальный гемоглобин является основным белком, участвующим в транспорте кислорода, у человеческого плода в течение последних семи месяцев развития в матке и сохраняется у новорожденного в течение примерно до 6 месяцев после рождения. Фетальный гемоглобин связывает кислород с большим сродством, чем гемоглобин взрослых, обеспечивая развивающемуся плоду лучший доступ к кислороду из кровотока матери. У новорожденных фетальный гемоглобин почти полностью замещается гемоглобином взрослых примерно через 6 месяцев после рождения.

GATA-1 является составной частью репрессорного комплекса GATA-1-FOG-1-Mi2b, который связывается с мотивами GATA -567 G_{γ} -глобина/-566 A_{γ} -глобина. В следующем примере описано связывание кольцевой РНК с мотивами GATA -567 G_{γ} -

глобина/-566 γ -глобина (с координатами в GenBank 33992-33945 из файла доступа GI455025 и координатами в GenBank 38772-38937 из файла доступа GI455025 соответственно) для предотвращения связывания ингибирующих факторов транскрипции/репрессорных комплексов.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность связывания без делеций, с которой связывается комплекс ингибирующих факторов транскрипции GATA1, Mi2b или FOG1.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность связывания с фактором транскрипции. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с ДНК оценивают посредством способа прямого связывания ДНК, такого как CHART-qPCR, а функцию оценивают посредством таких способов, как активация и экспрессия фетального гемоглобина. Ожидается, что активное связывание кольцевой РНК с регуляторными элементами выше генов γ -глобина приведет к конкурентному ингибированию фактора транскрипции BCL11A или других ингибирующих факторов транскрипции для активации транскрипции HbF. Изменения уровней HbF можно измерить посредством анализа методом HPLC, анализа методом проточной цитометрии и/или qPCR.

Пример 4. Кольцевая РНК, связывающая ДНК-дуплекс

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с ДНК-дуплексом.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК может быть сконструирована таким образом, чтобы она содержала последовательность связывания с большой бороздкой ДНК. Короткие (15-мерные) РНК-олигонуклеотиды (триплекс-образующий олигонуклеотид (TFO)) могут образовывать стабильный тройной спиральный комплекс РНК:ДНК. Третья нить в триплексной структуре (то есть TFO) следует по траектории через большую бороздку ДНК-дуплекса. Специфичность и стабильность триплексной структуры достигается с

помощью водородных связей в хугстиновских парах оснований, которые отличаются от таковых, образующихся согласно каноническому уотсон-криковскому спариванию оснований в ДНК-дуплексе. TFO связывается с богатой пурином нитью дуплекса-мишени по большой бороздке.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего полипуриновую последовательность из 10-15 оснований. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с ДНК оценивают посредством способа прямого связывания ДНК, такого как CHART-qPCR, которая позволяет оценить прямое связывание РНК с геномной ДНК. Альтернативные способы для оценки связывания кольцевой РНК с dsDNA включают триплексный анализ иммунного захвата и анализ сдвига подвижности в геле.

Пример 5. Кольцевая РНК, связывающая и секвестрирующая РНК-транскрипты

В данном примере описаны связывание с РНК-транскриптами и их секвестрация кольцевой РНК.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит одну или несколько новых последовательностей связывания для РНК-транскриптов. Молекулы РНК с экспансией CGG-трактов служат мишенями для связывания кольцевой РНК. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с областью повтора РНК для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность, комплементарную 50-220 экспансированным повторам 5'-CGG-3' в FMR1.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего 50-220 экспансированных повторов FMR1. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК

(QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с mRNA FMR1 оценивают с помощью анализа олигонуклеотидов методом соосаждения и qPCR, в котором модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные кольцевой РНК, используются для соосаждения mRNA FMR1, которая подвергается обратной транскрипции и амплифицируется с помощью qPCR. Связывание также оценивают путем колокализации двух флуоресцентных олигонуклеотидов, один из которых является специфичным по отношению к mRNA FMR1, а другой является комплементарным по отношению к кольцевой РНК, и оценивания с помощью FISH для РНК.

Пример 6. Кольцевая РНК, связывающая и секвестрирующая РНК-транскрипты

В данном примере описаны связывание с РНК-транскриптами и их секвестрация кольцевой РНК.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит одну или несколько новых последовательностей связывания для РНК-транскриптов. В SCA8 используется экспансированный CTG-повтор. CTG-повтор встречается в гене, который транскрибируется, но не транслируется. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с областью повтора mRNA для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность, комплементарную 50-120 экспансированным повторам 5'-CUG-3' в SCA8.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего 50-120 экспансированных повторов SCA8. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio,

Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с mRNA SCA1 оценивают с помощью анализа олигонуклеотидов методом соосаждения и qPCR, в котором модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные кольцевой РНК, используются для соосаждения экспансированных повторов SCA8, которые подвергаются обратной транскрипции и амплифицируются с помощью qPCR. FISH для РНК также применяют для оценки связывания путем колокализации двух флуоресцентных олигонуклеотидов, один из которых является специфичным по отношению к mRNA SCA8, а другой является комплементарным по отношению к кольцевой РНК, что оценивается с помощью FISH для РНК.

Пример 7. Кольцевая РНК, связывающая и секвестрирующая РНК-транскрипты

В данном примере описаны связывание с РНК-транскриптами и их секвестрация кольцевой РНК.

Синтетическая кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит одну или несколько новых последовательностей связывания для РНК-транскриптов. Ген гентингина (НТТ) содержит сегмент из 6-35 глутаминовых остатков в своей форме дикого типа. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с областью повтора mRNA для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность, комплементарную 40-120 экспансированным повторам 5'-CAG-3' в НТТ.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы Т7 из сегмента ДНК, содержащего 40-120 экспансированных повторов НТТ. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы Т4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 Т4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с РНК НТТ представляет собой оценивание с помощью анализа олигонуклеотидов методом соосаждения и qPCR, в котором модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные кольцевой РНК, используются для соосаждения РНК НТТ, которая подвергается обратной транскрипции и амплифицируется с помощью qPCR. FISH для РНК также применяют для оценки связывания путем колокализации двух флуоресцентных олигонуклеотидов, один из которых является специфичным по отношению к НТТА, а другой является комплементарным по отношению к кольцевой РНК, что оценивается с помощью FISH для РНК.

Пример 8. Кольцевая РНК, связывающая и секвестрирующая РНК-транскрипты и фермент

В данном примере описано одновременное связывание с РНК-транскриптами и белком и их секвестрация кольцевой РНК для способствования разрушению РНК.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит одну или несколько новых последовательностей связывания для транскриптов, а также белка для способствования разрушению транскриптов. Белок атрофин-1 кодируется ATN1 и используется в качестве модельной системы. Кодируемый белок содержит сериновый повтор, область чередующихся кислых и основных аминокислот, а также варибельный глутаминовый повтор. Ген ATN1 имеет сегмент ДНК, называемый тринуклеотидным CAG-повтором.

В эукариотических клетках большинство mRNA имеют 5'-монометилгуанозиную кэп-структуру и 3'-поли(А)-хвост, которые важны для трансляции и стабильности mRNA. Удаление 5'-кэп-структуры (декэпирование) является предпосылкой для распада основы mRNA с 5'-конца. Белок Dcp2 был идентифицирован как основной фермент, декэпирующий mRNA в клетках. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с областью повтора mRNA для секвестрации и с белком Dcp2 для декэпирования mRNA.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность, комплементарную 40-120 экспансированным повторам 5'-CAG-3' в ATN1 и кэп-структуре РНК для распознавания с помощью Dcp2.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы Т7 из сегмента ДНК, содержащего 40-120 экспансированных повторов ATN1 и кэп-структуру РНК для распознавания с помощью Dcp2. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с РНК ATN1 представляет собой оценивание с помощью анализа олигонуклеотидов методом соосаждения и qPCR, в котором модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные кольцевой РНК, используются для соосаждения РНК ATN1, которая подвергается обратной транскрипции и амплифицируется с помощью qPCR. Функцию декэпирования оценивают с помощью qSL-RT-PCR, в которой объединены лигирование с помощью шунта и количественная RT-PCR (Blewett, et al., RNA, 2011, Mar, 17(3): 535-543).

Пример 9. Кольцевая РНК для замещения mRNA

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с mRNA-мишенью, при котором создается сайт расщепления для рибозима.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит последовательность, которая связывается с mRNA изоформы M2 пируваткиназы. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с изоформой-мишенью M2 пируваткиназы (PK), что приводит к ее расщеплению.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательности, комплементарные изоформе M2 пируваткиназы, которые будут приводить к образованию сайта расщепления для рибозима VS в мишени. Кольцевая РНК дополнительно содержит последовательности для транс-действующего рибозима VS и последовательность, кодирующую изоформу M1 пируваткиназы.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность, комплементарную изоформе M2, рибозим VS и последовательность, кодирующую M1. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки

РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание с mRNA M2 РК и ее сопутствующее разрушение, опосредованные кольцевой РНК, оценивают с помощью RT-PCR. Восстановленную экспрессию mRNA M1 РК оценивают аналогичным образом. Кроме того, экспрессию белков M1 РК и M2 РК оценивают с помощью вестерн-блоттинга. Свидетельства функциональных изменений, индуцированных после связывания и расщепления РНК-мишени, включают анализы пролиферации клеток.

Пример 10. Кольцевая РНК для целенаправленного расщепления mRNA

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с модельной mRNA-мишенью с созданием сайта расщепления для рибозима.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит последовательность, которая связывается с mRNA SRSF1. В следующем примере описано связывание кольцевой РНК с mRNA-мишенью SRSF1, что приводит к ее расщеплению.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательности, комплементарные mRNA tSRSF1, которые будут приводить к образованию сайта расщепления для рибозима VS в мишени. Кольцевая РНК дополнительно содержит последовательности для транс-действующего рибозима VS и последовательность, кодирующую изоформу M1 пируваткиназы. Используются другие транс-действующие рибозимы, такие как рибозимы HDV, рибозимы типа "головки молотка", интроны группы I и/или группы II.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность, комплементарную SRSF1, и рибозим VS. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание с mRNA SRSF1 и ее сопутствующее разрушение, опосредованные кольцевой РНК, оценивают с помощью RT-PCR. Экспрессию белка SRSF1 оценивают с

помощью вестерн-блоттинга. Дополнительные свидетельства изменений, индуцированных после связывания и расщепления РНК-мишени, включают анализы пролиферации клеток.

Пример 11. Кольцевая РНК, секвестрирующая кольцевую РНК

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с кольцевой РНК.

Кольцевая РНК может присутствовать в определенных линиях клеток. Одним из таких примеров является *circ-Dnmt1*. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с *circ-Dnmt1*.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность, комплементарную *circ-Dnmt1* для ингибирования ее взаимодействий РНК-белок.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы Т7 из сегмента ДНК, содержащего соответствующие последовательности. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы Т4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 Т4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с *circ-Dnmt1* осуществляют путем соосаждения кольцевой РНК с использованием биотинилированного олигонуклеотида, комплементарного области кольцевой РНК, с последующей RT-PCR. Дополнительно, для визуализации комплексов кольцевая РНК-*circDnmt1* применяют анализ сдвига электрофоретической подвижности.

Пример 12. Кольцевая РНК, секвестрирующая две miRNA

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с двумя отдельными miRNA.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность, комплементарную двум модельным miRNA, в данном случае miR-9 и miR-1269.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы Т7 из сегмента ДНК, содержащего соответствующие последовательности. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652),

следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с miR-9 и miR-1269 осуществляют путем соосаждения кольцевой РНК с использованием биотинилированного олигонуклеотида, комплементарного области кольцевой РНК, с последующей RT-PCR. Дополнительно, для визуализации комплексов кольцевая РНК-miRNA-miRNA применяют анализ сдвига электрофоретической подвижности.

Пример 13. Кольцевая РНК, связывающая и секвестрирующая по меньшей мере два отдельных РНК-транскрипта

В данном примере описаны связывание и секвестрация по меньшей мере двух модельных РНК-транскриптов кольцевой РНК.

Синтетическая кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит две или более новые последовательности связывания для РНК-транскриптов. В SCA8 используется экспансированный CTG-повтор. Ген FMR1 содержит экспансированные CGG-повторы. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с областью повтора РНК-транскриптов для секвестрации.

Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с областью повтора РНК для секвестрации FMR1 либо SCA8 с экспансированными повторами.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность, комплементарную 50-220 экспансированным повторам 5'-CGG-3' в FMR1, и последовательность, комплементарную 50-120 экспансированным повторам 5'-CUG-3' в SCA8.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего экспансированные повторы. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью

ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с mRNA FMR1 или SCA1 оценивают с помощью анализа олигонуклеотидов методом соосаждения и qPCR, в котором модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные кольцевой РНК, используются для соосаждения mRNA FMR1 или SCA1, которая подвергается обратной транскрипции и амплифицируется с помощью qPCR. Связывание также оценивают путем колокализации двух флуоресцентных олигонуклеотидов, один из которых является специфичным по отношению к mRNA FMR1 или SCA1, а другой является комплементарным по отношению к кольцевой РНК, и флуоресценцию оценивают с помощью FISH для РНК.

Пример 14. Кольцевая РНК, связывающая белок

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с белком для секвестрации.

TAR-ДНК-связывающий белок-43 (TDP-43) представляет собой многофункциональный гетерогенный рибонуклеопротеин, участвующий в процессинге и стабилизации mRNA. TDP-43 содержит два РНК-распознающих мотива (RRM), сигнал ядерной локализации и последовательность ядерного экспорта, опосредующие транспорт в ядро и из ядра, а также С-концевой богатый глицином домен (GRD), участвующий во взаимодействиях и функциях белка TDP-43. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с TDP-43 для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит TDP-43-связывающие РНК-мотивы: 5'-(UG)_nUA(UG)_m-3', 5'-GAGAGAGCGCGUGUGUGUGUGUGUGGUGGUGCAUA-3' (SEQ ID NO: 10) или (UG)₆ и последовательность связывания с белком для С-концевого богатого глицином домена для конкурентного связывания с TDP-43 и ингибирования его связывания/последующих функций.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего РНК-мотив для TDP-43 и последовательность связывания с белком для С-концевого богатого глицином домена. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio,

Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с TDP-43 оценивают *in vitro* с помощью EMSA (анализа сдвига электрофоретической подвижности РНК). Если TDP-43 связан с circRNA, то скорость миграции во время гель-электрофореза ниже, чем таковая для несвязанной кольцевой РНК. Кроме того, для оценки связывания транскриптов в клеточных экстрактах применяют RIP (иммунопреципитацию РНК) с использованием антитела к TDP-43 в сочетании с qPCR, специфичной для кольцевой РНК. Для оценки того, связывается ли кольцевая РНК с TDP-43 для секвестрации, анализируют локализацию TDP-43 в клетках, обработанных с использованием и без использования кольцевой РНК. Если кольцевая РНК секвестрирует TDP-43, то ожидается, что локализация TDP-43 в цитоплазме будет сохраняться. Кроме того, ожидается, что секвестрация TDP43 кольцевой РНК будет приводить к увеличению выживаемости.

Пример 15. Кольцевая РНК, связывающая белок

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с белком для секвестрации.

Фактор 8 процессинга/сплайсинга пре-mRNA представляет собой белок, который у людей кодируется геном PRPF8 и является компонентом как U2-, так и U12-зависимых сплайсосом, а также, как было обнаружено, является существенно важным для каталитической стадии II в процессе сплайсинга пре-mRNA. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с PRPF8 для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит PRPF8-связывающий РНК-мотив 5'-

AUUGCCUAUAGAACUUAUAACGAACAUGGUUCUUGCCUUUUACCAGAACCAUCCG
GGUGUUGUCUCCAUAGA-3' (SEQ ID NO: 11) для конкурентного связывания с PRPF8 и ингибирования его функции.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего PRPF8-связывающую последовательность. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio,

Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с PRPF8 представляет собой EMSA (анализ сдвига электрофоретической подвижности РНК). Если PRPF8 связан с кольцевой РНК, то скорость миграции во время гель-электрофореза ниже, чем таковая для несвязанной кольцевой РНК. Кроме того, для оценки связывания транскриптов в клеточных экстрактах применяют RIP (иммунопреципитацию РНК) с использованием антитела к PRPF8 в сочетании с qPCR, специфичной для кольцевой РНК. Для оценки того, секвестрирует ли кольцевая РНК PRPF8 и изменяет ли она функцию клетки, оценивают экспрессию маркеров поверхности стволовых клеток, таких как CD44+/CD24+, с помощью FACS после доставки кольцевой РНК.

Пример 16. Кольцевая РНК, связывающая белок

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с модельным белком для секвестрации.

Гомолог LIN28A человека представляет собой РНК-связывающий белок (RBP) с N-концевым доменом холодового шока (CSD) и двумя C-концевыми доменами типа "цинковых пальцев" CysCysHisCys (CCHC). LIN28A человека является преимущественно цитоплазматическим и связывается с клеточными компонентами, такими как рибосомы, Р-тельца и стрессовые гранулы. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с LIN28A для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность *preEm-let-7f* 5'-GGGGUAGUGAUUUUACCCUGGAGAU-3' (SEQ ID NO: 12) — последовательность РНК с мотивом связывания с GGAG LIN28A для конкурентного связывания с LIN28A.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность связывания с LIN28A. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки

РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с LIN28A представляет собой EMSA (анализ сдвига электрофоретической подвижности РНК). Если LIN28A связан с кольцевой РНК, то скорость миграции во время гель-электрофореза ниже, чем таковая для несвязанной кольцевой РНК. Кроме того, для оценки связывания транскриптов в клеточных экстрактах применяют RIP (иммунопреципитацию РНК) с использованием антитела к LIN28A в сочетании с qPCR, специфичной для кольцевой РНК, и для оценки колокализации в клетках применяют иммунофлуоресценцию LIN28A в комбинации с FISH для кольцевой РНК. Для оценки того, связывается ли кольцевая РНК с LIN28A для секвестрации и изменения функции клетки, кольцевую РНК доставляют в клетки человека. После обработки с помощью кольцевой РНК уровни экспрессии зрелого LET-7g измеряют с помощью q-RT-PCR. Кроме того, у обработанных клеток измеряют рост клеток с помощью МТТ-способа.

Пример 17. Кольцевая РНК, связывающая белок

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с модельным белком для секвестрации.

CUG-связывающий белок 1 (CUGBP1) регулирует экспрессию генов на уровнях альтернативного сплайсинга, разрушения mRNA и трансляции. Сеть посттранскрипционной регуляции включает РНК-связывающий белок, представляющий собой CUG-связывающий белок 1 (CUGBP1), также называемый представителем 1 семейства CUGBP- и ELAV-подобных белков (CELF1), который связывается с GU-богатым элементом (GRE), находящимся в 3'-UTR транскриптов-мишеней, и опосредует разрушение GRE-содержащих транскриптов. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с CUGBP1 для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит по меньшей мере один РНК-мотив, содержащий UGU(G/U)UGU(G/U)UGU, который распознается CUGBP1 и конкурентно связывается с CUGBP1.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность связывания с CUGBP1. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с CUGBP1 представляет собой EMSA (анализ сдвига электрофоретической подвижности РНК). Если CUGBP1 связан с кольцевой РНК, то скорость миграции во время гель-электрофореза ниже, чем таковая для несвязанной кольцевой РНК. Кроме того, для оценки связывания транскриптов в клеточных экстрактах применяют RIP (иммунопреципитацию РНК) с использованием антитела к CUGP1 в сочетании с qPCR, специфичной для кольцевой РНК, и для оценки колокализации в клетках применяют иммунофлуоресценцию CUGP1 в комбинации с FISH для кольцевой РНК. Для оценки того, связывается ли кольцевая РНК с CUGBP1 для секвестрации и изменения функции клетки, кольцевую РНК доставляют в клетки, и пролиферацию клеток можно измерять с помощью колориметрического МТТ-анализа.

Пример 18. Кольцевая РНК, связывающая белок

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с модельным белком для секвестрации.

GEMIN5 представляет собой РНК-связывающий белок (RBP), который является преимущественно цитоплазматическим белком с С-концевым доменом, содержащим неканонический сайт связывания с РНК из двух частей, состоящий из доменов RBS1 и RBS2. Кроме того, GEMIN5 связывается с 7-метилгуанозиновым (m7G) кэпом, присутствующим в транскриптах, полученных с помощью РНК-полимеразы II, и подавляет трансляцию, зависящую от участка внутренней посадки рибосомы. GEMIN5 может контролировать общий синтез белка путем его прямого связывания с рибосомой, выступая в качестве платформы, служащей распределительным узлом для различных сетей взаимодействий РНК-белок. В следующем примере описано связывание кольцевой РНК с GEMIN5 для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит домен 5 последовательности IRES вируса ящура (FMDV) и конкурентно связывается с GEMIN5.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность связывания с GEMIN5. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific,

EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с GEMIN5 представляет собой EMSA (анализ сдвига электрофоретической подвижности РНК). Если GEMIN5 связан с кольцевой РНК, то скорость миграции во время гель-электрофореза ниже, чем таковая для несвязанной кольцевой РНК. Кроме того, для оценки связывания транскриптов в клеточных экстрактах применяют RIP (иммунопреципитацию РНК) с использованием антитела к GEMIN5 в сочетании с qPCR, специфичной для кольцевой РНК, и для оценки колокализации в клетках применяют иммунофлуоресценцию GEMIN5 в комбинации с FISH для кольцевой РНК. Для оценки того, секвестрирует ли кольцевая РНК GEMIN5 и изменяет ли она трансляцию, кольцевую РНК добавляют для анализа трансляции *in vitro*. Трансляцию кольцевой РНК, кодирующей люциферазу, с IRES FMDV измеряют в присутствии и в отсутствие белка GEMIN5 с использованием и без использования кольцевой РНК. Эффект секвестрации GEMIN5 в отношении трансляции, опосредованной белком GEMIN5, измеряют с помощью считывания показателей люминесценции.

Пример 19. Кольцевая РНК, связывающая два белка

В данном примере описано одновременное связывание кольцевой РНК с двумя модельными белками.

Убиквитинлигаза E3 MDM2 связывает и убиквитинирует белки, такие как p53, маркируя их для разрушения протеасомой. В следующем примере описано одновременное связывание кольцевой РНК с MDM2 и p53 для усиления MDM2-зависимого убиквитинирования p53, как изображено на **фиг. 16**.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность РНК FOX3, которая связывается с MDM2 и p53.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего соответствующую последовательность. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652),

следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с MDM2 и p53 осуществляют путем анализа сдвига электрофоретической подвижности для визуализации каждого комплекса РНК-белок или, в качестве альтернативы, путем соосаждения кольцевой РНК с использованием биотинилированного олигонуклеотида, комплементарного области кольцевой РНК, с последующим иммуноблоттингом. Кроме того, убиквитинирование p53 с помощью MDM2 посредством связывания с кольцевой РНК анализируют с помощью иммуноблоттинга с антителами к убиквитину или с помощью масс-спектрометрии.

Пример 20. Кольцевая РНК, связывающая ДНК и белок

В данном примере описано одновременное связывание кольцевой РНК с ДНК и модельным белком, в данном случае СВР/p300.

Белки СВР/p300 связываются с энхансерными областями посредством взаимодействия с eRNA. Связывание РНК с СВР/p300, в свою очередь, приводит к повышению гистонацетилтрансферазной (НАТ) активности СВР. Кроме того, СВР и p300 связываются с другими НАТ, а также с факторами транскрипции и компонентами аппарата транскрипции.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит СВР/p300-связывающую область eRNA eMdm2, а также область, комплементарную геномному локусу-мишени.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего соответствующие последовательности. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio,

Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с СВР/p300 и ДНК представляет собой соосаждение кольцевой РНК с использованием биотинилированного олигонуклеотида, комплементарного области кольцевой РНК, с последующим иммуноблоттингом и ПЦР. Дополнительно, для визуализации комплексов кольцевая РНК-белок-ДНК применяют анализ сдвига электрофоретической подвижности. Иммунопреципитацию хроматина (ChIP) с антителами к H3K27ac проводят для выявления изменений в ацетилировании гистонов в локусе, представляющем интерес, и выявления связывания между кольцевой РНК, СВР и областью генома, представляющей интерес. Кроме того, повышенную экспрессию из молчащего геномного локуса анализируют с помощью qPCR или нозерн-блоттинга/вестерн-блоттинга.

Пример 21. Кольцевая РНК, связывающая вирусную mRNA и miRNA

В данном примере описано одновременное связывание кольцевой РНК с вирусной mRNA и miRNA.

Вирус простого герпеса 1 типа (HSV-1) кодирует несколько miRNA, регулирующих транскрипцию вируса. HSV-1-miR-H27 связывается с mRNA регулятора транскрипции хозяина, представляющего собой Kelch-подобный белок 24 (KLHL24), для индукции транскрипции немедленно-ранних и ранних генов вируса.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательности, комплементарные HSV-1-miR-H27 и KLHL24.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего соответствующие последовательности. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с обоими транскриптами осуществляют путем соосаждения кольцевой РНК с использованием биотинилированного олигонуклеотида, комплементарного области кольцевой РНК, с последующей RT-PCR. Дополнительно, для визуализации комплексов кольцевая РНК-mRNA-miRNA можно применять анализ сдвига электрофоретической подвижности.

Пример 22. Кольцевая РНК, связывающаяся с липидной мембраной

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с липидной мембраной.

Кольцевая РНК может быть разработана таким образом, чтобы она специфично связывалась с липидными мембранами. В следующем примере описано связывание кольцевой РНК с мембраной. Путем опосредования связывания с клеточными мембранами кольцевая РНК способна обеспечивать приведение соседних клеток в непосредственную близость друг к другу.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит по меньшей мере один РНК-мотив (последовательности, описанные в данном документе), который разработан так, что он связывается с мембраной:

GUGAUGGCGCCUACGUCGAAGAAAGGAGUCUCAAGGGAAGGAGCGUAUUAU
GGUCGAUGAAUCGGUCAUGUCGUCAGGGU (SEQ ID NO: 13);

GAGUCAUAGGACGCUCGCUCUUGCGACCAUGGGGCACGGGGAGCCCACUGC
AUGGAUCU AUCGUAU CAUAGUGCGGU (SEQ ID NO: 14);

GUAGCUUCCAUGAGACUUGAUCGGGGUCAUGGCUCUAGGCAUCGGAGAAG
CUGACUAACU UGGUCACGUCGUACCUGGU (SEQ ID NO: 15);

GGACGCGUACGAAGGGCUGAUAGGGCAGAGCUCCAACUAUGCGUCCAGCU
CGUGCAGUGGAUCGGGUCGUGCCUGGU (SEQ ID NO: 16) и

CUUUGUCGGCCGAACUCGCUGUUUAACUGCCCGGCGAGAUCGCAGGGUGU
UGUGCUAUU CGCGUGCCGUGUG (SEQ ID NO: 17).

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы Т7 из сегмента ДНК, содержащего один или несколько РНК-мотивов связывания с липидами. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получали путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы Т4 (New England Bio, Inc., M0202M), и кольцевую РНК выделяли после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью

электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с липидной мембраной представляет собой инкубирование кольцевых РНК с липосомами. Липосомы фракционируют с помощью колонки с Sephacryl S-1000. Все несвязавшиеся РНК отбрасывают. Связавшуюся кольцевую РНК оценивают посредством qPCR или нозерн-блоттинга.

Пример 23. Кольцевая РНК для доставки siRNA

В данном примере описана доставка некоторых siRNA с помощью кольцевой РНК.

Не встречающаяся в природе кольцевая РНК сконструирована так, что она содержит последовательности siRNA, которые связываются с модельной mRNA-мишенью, кодирующей транстиретин (TTR). В следующем примере описано связывание siRNA, полученных из кольцевой РНК, с mRNA-мишенью TTR для ингибирования трансляции белка транстиретина.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательности, комплементарные mRNA TTR (например, *auggaaucacucugguuactt*), которые связываются с mRNA транстиретина, что приводит к расщеплению этой mRNA.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность, комплементарную TTR. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Для образования кольцевой РНК два конца РНК, несущих 5'-фосфат и 3'-ОН, разрабатывают с дополнительными фланкирующими комплементарными последовательностями. Эти комплементарные последовательности гибридизируются, в результате чего образуется разорванная кольцевая молекула. Данный разрыв закрывается ДНК-лигазой T4. Качество кольцевой РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или геле для PAGE или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с mRNA TTR оценивают путем соосаждения кольцевой РНК с использованием биотинилированного олигонуклеотида, комплементарного конкретной последовательности в кольцевой молекуле, с последующей RT-PCR. Функцию siRNA оценивают путем измерения уровней mRNA-мишени TTR с помощью RT-PCR в

обработанных клетках по сравнению с необработанными клетками. Экспрессию белка TTR оценивают с помощью вестерн-блоттинга.

Пример 24. Полученная кольцевая РНК с модифицированными нуклеотидами, избирательно связывающая белки

В данном примере продемонстрировано получение модифицированного кольцевого полирибонуклеотида, который имел возможность связываться с белками. Кроме того, в данном примере продемонстрировано, что кольцевая РНК, сконструированная с модификациями нуклеотидов, которые обеспечивают избирательное взаимодействие с белками, участвующими в мониторинге иммунной системы, характеризуется сниженной иммуногенностью по сравнению с немодифицированной РНК.

Получали кольцевую РНК, не встречающуюся в природе, сконструированную таким образом, чтобы она характеризовалась полным или частичным включением модифицированных нуклеотидов. Как показано в следующем примере, полноразмерную модифицированную линейную РНК или гибридную молекулу, состоящую из модифицированной и немодифицированной линейной РНК, циркуляризовали, и оценивали образование белкового каркаса посредством измерения экспрессии nLuc. Кроме того, избирательно модифицированная кольцевая РНК характеризовалась сниженными взаимодействиями с белками, которые активируют гены, связанные с иммунитетом (q-PCR для экспрессии MDA5, OAS и IFN-бета), в клетках BJ по сравнению с немодифицированной кольцевой РНК.

Получали кольцевую РНК с последовательностью EMCV WT-Nluc-стоп-кодон-спейсер. Для модификации посредством замены в ходе реакции транскрипции *in vitro* добавляли модифицированные нуклеотиды псевдоуридин и метилцитозин или m6A вместо стандартных немодифицированных нуклеотидов уридина и цитозина или аденозина соответственно. IRES EMCV WT синтезировали отдельно от ORF nLuc. IRES EMCV WT синтезировали с использованием модифицированных (полностью модифицированных) либо немодифицированных (гибридно-модифицированных) нуклеотидов. В отличие от этого, последовательность ORF nLuc синтезировали в ходе реакции транскрипции *in vitro* для всей последовательности с использованием модифицированных нуклеотидов псевдоуридина и метилцитозина или m6A вместо стандартных немодифицированных нуклеотидов уридина и цитозина или аденозина соответственно. После синтеза модифицированного или немодифицированного IRES и модифицированной ORF эти два олигонуклеотида лигировали друг с другом с помощью ДНК-лигазы T4. Как показано на **фиг. 9А**, получали полностью модифицированные (верхняя конструкция) или гибридно-модифицированные (нижняя конструкция) кольцевые РНК.

Для измерения эффективности образования белкового каркаса измеряли экспрессию pLuc с модифицированных или гибридно-модифицированных конструкций. После введения 0,1 пмоль линейной и кольцевой РНК путем трансфекции в фибробласты ВJ в течение 6 ч. экспрессию pLuc измеряли через 6 ч., 24 ч., 48 ч. и 72 ч. после трансфекции.

Как показано на **фиг. 9В** и **фиг. 9С**, полностью модифицированная кольцевая РНК характеризовалась значительно сниженной способностью к связыванию с белками по сравнению с немодифицированной кольцевой РНК согласно измерению выхода белка при трансляции. В отличие от этого, гибридная модификация продемонстрировала такое же или увеличенное связывание с белками, например, с аппаратом трансляции белка.

Для дополнительного измерения эффективности образования белкового каркаса полностью модифицированную кольцевую РНК вводили путем трансфекции в клетки, и измеряли образование белкового каркаса для иммунных белков. Отслеживание уровня образования белкового каркаса для иммунных белков, которые активируют гены врожденного иммунного ответа, проводили в клетках ВJ, трансфицированных немодифицированной кольцевой РНК или полностью модифицированной кольцевой РНК с псевдоуридиновыми и метилцитозиновыми либо m6A-модификациями. Общую РНК выделяли из клеток с помощью фенольного реагента для экстракции (Invitrogen) и подвергали обратной транскрипции с получением cDNA. Анализ генов, связанных с иммунитетом, проводили методом qRT-PCR с помощью смеси для количественной ПЦР с использованием красителей (BioRad).

Как показано на **фиг. 10А-С**, определенные с помощью qRT-PCR уровни генов, связанных с иммунитетом, из клеток ВJ, трансфицированных полностью модифицированными кольцевыми РНК — кольцевыми РНК, полностью модифицированными как псевдоуридином, так и метилцитозином либо m6A — продемонстрировали снижение уровней экспрессии MDA5, OAS и IFN-бета по сравнению с клетками, трансфицированными немодифицированной кольцевой РНК, что указывает на сниженное образование белкового каркаса между модифицированными кольцевыми РНК и иммунными белками, которые активируют гены, связанные с иммуногенностью. Таким образом, модификация кольцевой РНК по сравнению с немодифицированной кольцевой РНК оказывала влияние на образование белкового каркаса. Избирательная модификация обеспечивала возможность связывания с аппаратом трансляции белка, тогда как полная модификация приводила к снижению связывания с белками, которые активируют гены, связанные с иммуногенностью, в трансфицированных клетках-реципиентах.

Пример 25. Кольцевая РНК с модифицированными нуклеотидами, характеризующаяся сниженной иммуногенностью

В данном примере продемонстрировано получение модифицированного кольцевого полирибонуклеотида, продуцирующего белковый продукт. Кроме того, в данном примере продемонстрировано, что кольцевая РНК, сконструированная с модификациями нуклеотидов, характеризуется сниженной иммуногенностью по сравнению с немодифицированной РНК.

Получали кольцевую РНК, не встречающуюся в природе, сконструированную таким образом, чтобы она обладала одним или несколькими желаемыми свойствами и характеризовалась полным или частичным включением в ее состав модифицированных нуклеотидов. Как показано в следующем примере, полноразмерную модифицированную линейную РНК или гибридную молекулу, состоящую из модифицированной и немодифицированной линейной РНК, циркуляризовали, и оценивали экспрессию nLuc. Кроме того, было показано, что модифицированная кольцевая РНК характеризуется сниженной активацией генов, связанных с иммунитетом (согласно экспрессии MDA5, OAS и IFN-бета, определенной с помощью q-PCR), в клетках VJ по сравнению с немодифицированной кольцевой РНК.

Получали кольцевую РНК с последовательностью EMCV WT-nLuc-стоп-кодон-спейсер. Для модификации посредством замены в ходе реакции транскрипции *in vitro* добавляли модифицированные нуклеотиды псевдоурин и метилцитозин или m6A вместо стандартных немодифицированных нуклеотидов уридина и цитозина или аденозина соответственно. IRES EMCV WT синтезировали отдельно от ORF nLuc. IRES EMCV WT синтезировали с использованием модифицированных (полностью модифицированных) либо немодифицированных (гибридно-модифицированных) нуклеотидов. В отличие от этого, последовательность ORF nLuc синтезировали в ходе реакции транскрипции *in vitro* для всей последовательности с использованием модифицированных нуклеотидов псевдоуридина и метилцитозина или m6A вместо стандартных немодифицированных нуклеотидов уридина и цитозина или аденозина соответственно. После синтеза модифицированного или немодифицированного IRES и модифицированной ORF эти два олигонуклеотида лигировали друг с другом с помощью ДНК-лигазы T4. Как показано на **фиг. 9**, получали гибридно-модифицированные кольцевые РНК.

Для измерения эффективности экспрессии гибридно-модифицированную кольцевую РНК вводили путем трансфекции в клетки, и измеряли экспрессию иммунных белков. Отслеживание уровней экспрессии генов врожденного иммунного ответа проводили в клетках VJ, трансфицированных немодифицированной кольцевой РНК или гибридно-модифицированными кольцевыми РНК с псевдоуридиновыми и метилцитозиновыми либо m6A-модификациями. Общую РНК выделяли из клеток с

помощью фенольного реагента для экстракции (Invitrogen) и подвергали обратной транскрипции с получением cDNA. Анализ генов, связанных с иммунитетом, проводили методом qRT-PCR с помощью смеси для количественной ПЦР с использованием красителей (BioRad).

Как показано на **фиг. 11**, определенные с помощью qRT-PCR уровни генов, связанных с иммунитетом, из клеток ВJ, трансфицированных гибридно-модифицированными кольцевыми РНК — кольцевыми РНК, гибридно-модифицированными псевдоуридином и метилцитозином — продемонстрировали снижение уровней экспрессии RIG-I, MDA5, IFN-бета и OAS по сравнению с клетками, трансфицированными немодифицированной кольцевой РНК, что указывает на сниженную иммуногенность данной гибридно-модифицированной кольцевой РНК, которая активирует гены, связанные с иммуногенностью. В отличие от полностью модифицированной кольцевой РНК, показанной в примере 24, кольцевая РНК, гибридно-модифицированная с помощью тбА, демонстрировала сходные уровни экспрессии RIG-I, MDA5, IFN-бета и OAS по сравнению с клетками, трансфицированными немодифицированной кольцевой РНК. Таким образом, модификация кольцевой РНК по сравнению с немодифицированной кольцевой РНК, а также уровень модификации оказывали влияние на активацию генов, связанных с иммуногенностью.

Пример 26. Кольцевая РНК, связывающая малую молекулу

В данном примере продемонстрировано связывание кольцевой РНК с малой молекулой для секвестрации/регуляции биологической активности.

Линейные РНК-аптамеры Mango флуоресцируют при связывании с малой молекулой, представляющей собой краситель ТО1-биотин. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК Mango связывается с производным тиазолового оранжевого, представляющим собой ТО1-биотин, для секвестрации/регуляции биологической активности.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала сайты связывания РНК-аптамера Mango с малой молекулой и стабилизирующий стебель: 5'-AATAGCCG GUCUACGGCC AUACCACCCU GAACGCGCCC GAUCUCGUCU GAUCUCGGAAGCUAAGCAGG GUCGGGCCUG GUUAGUACUU GGAUGGGAGA CCGCCUGGGAAUACCGGGUG CUGUAGGCGU CGACUUGCCA UGUGUAUGUG GGUACGAAGGAAGGAUUGGU AUGUGGUAUA UUCGUACCCA CAUACUCUGA UGAUCCUUCG GGAUCAUUCA UGGCAA CGGCTATT-3' (SEQ ID NO: 18), а также циркуляризационные последовательности 5'-AATAGCCG-3' (SEQ ID NO: 19) и 5'-CGGCTATT-3' (SEQ ID NO: 20).

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего РНК-мотив Mango, стебли и циркуляризационные последовательности. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH, New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. РНК, обработанную с помощью RppH, циркуляризовали с помощью ДНК-шунта, комплементарного циркуляризационным последовательностям, и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере, содержащем 0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA, осаждали этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКаз. Качество РНК оценивали с помощью PAGE с мочевиной или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с ТО1-биотином оценивали *in vitro* в клетках-фибробластах VJ с помощью флуоресцентной микроскопии. Если ТО1-биотин связывался с РНК, его флуоресценция повышалась более чем в 100 раз. В среду с культурами фибробластов VJ добавляли линейные или кольцевые аптамеры (50 нМ), а также контроль без РНК. Для обеспечения доставки РНК добавляли реагент для трансфекции липофектамин. Культуры обрабатывали ТО1-биотином, и флуоресценцию анализировали через 3 и 6 часов. Как показано на **фиг. 12**, повышенная флуоресценция/стабильность выявлялась для кольцевого аптамера как через 3, так и через 6 часов.

Более эффективная доставка и более стойкая флуоресценция наблюдались при использовании кольцевых аптамеров.

Пример 27. Кольцевая РНК, связывающая белок

В данном примере продемонстрировано связывание кольцевой РНК с белком для секвестрации.

Антигенный рецептор человека (HuR) может являться патогенным белком, например, известно, что он связывает и стабилизирует mRNA-транскрипты, связанные с раком, такие как mRNA, кодирующие протоонкогены, цитокины, факторы роста и факторы инвазии. HuR обладает центральной онкогенной активностью, обеспечивая проявление множественных раковых фенотипов. Секвестрация HuR с помощью кольцевой РНК может приводить к ослаблению онкогенного роста при множественных формах рака. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК может связываться с HuR для секвестрации.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала HuR-связывающие аптамерные РНК-мотивы: 5'-UCAUAAUCAAUUUUUUUUUUCUUUUUUUUUA UUCACAUAUUUUUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 21),

5'-AUUUUGUUUUUAA CAUUUC-3' (SEQ ID NO: 22), 5'-UCAUAAUCAAUUUUAUUUUUCUUUUUAUUUUUAUUCACAUAUUUUUGUUU UUAUUUUGUUUUUAACAUUUC-3' (SEQ ID NO: 23) для конкурентного связывания с HuR и ингибирования его связывания/последующих функций.

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего РНК-мотив для HuR и последовательность связывания с белком.

Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК Monarch (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH, New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. РНК, обработанную с помощью RppH, циркуляризовали с помощью ДНК-шунта, комплементарного циркуляризации последовательностям, и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере, содержащем 0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA, осаждали этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКаз. Качество РНК оценивали с помощью PAGE с мочевиной или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с HuR оценивали *in vitro* с помощью иммунопреципитации РНК (RIP) для HuR. Кольцевые РНК, содержащие HuR-связывающий РНК-мотив, связывались с белком HuR, тогда как кольцевые РНК, в которых отсутствует HuR-связывающий РНК-мотив, не демонстрировали связывание выше фонового уровня (фиг. 13).

Этот результат продемонстрировал избирательное связывание *circRNA* с биологической молекулой, представляющей терапевтический интерес.

Пример 28. Кольцевая РНК с малой молекулой, связывающей белок

В данном примере продемонстрирована кольцевая РНК, связанная с малой молекулой для связывания и привлечения выбранного белка.

Талидомид, являющийся лекарственным средством, одобренным для клинического применения (*таломид*), как известно, связывается с убиквитинлигазой E3, являющейся элементом клеточного аппарата разрушения белков. Благодаря конъюгированию талидомида с кольцевой РНК (например, посредством клик-химии) кольцевая РНК, конъюгированная с талидомидом, может привлекать клеточный аппарат разрушения ко второму белку, вызывающему заболевание (например, на который также нацеливается кольцевая РНК). Как показано в следующем примере, малая молекула была конъюгирована с кольцевой РНК для связывания убиквитинлигазы E3 цереблona.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала реакционноспособные уридиновые остатки (например, 5-азидо-С3-УТР) для конъюгации с функционализированными алкином малыми молекулами, которые, как известно, взаимодействуют с внутриклеточным белком, представляющим интерес.

Линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 (Lucigen). Все УТР были заменены на 5-азидо-С3-УТР (Jena Biosciences) в реакции транскрипции *in vitro* с получением функционализированной азидом РНК. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs) и подвергали обработке с помощью РНК-5'-пирофосфогидролазы (RppH, New England Biolabs) для удаления пирофосфата. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs).

Кольцевую РНК получали посредством лигирования с помощью шунта. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH (100 мкМ), и ДНК-шунт (200 мкМ) отжигали путем нагревания до 75°C в течение 5 минут и постепенного охлаждения при комнатной температуре в течение 20 минут. Реакцию лигирования проводили с помощью РНК-лигазы 2 T4 (0,2 ед/мкл, New England Biolabs) в течение 4 часов при 37°C. Лигированную смесь очищали путем осаждения этанолом. Для выделения кольцевой РНК лигированную смесь разделяли в 4% денатурирующем геле для PAGE с мочевиной. РНК в геле окрашивали с помощью SYBR Green (Thermo Fisher) и визуализировали с помощью трансиллюминатора (Transilluminators). Полосы РНК, соответствующие кольцевой РНК, вырезали и измельчали в пробирках для разрушения геля (IST Engineering). Для элюирования кольцевой РНК измельченные образцы геля с кольцевой РНК инкубировали с элюирующим буфером (0,5 М ацетат натрия, 1 мМ EDTA, 0,1% SDS) при 37°C в течение часа, и надосадочную жидкость осторожно собирали. Оставшийся элюированный измельченный гель подвергали еще одному циклу элюирования, что повторяли в общей сложности три раза. Элюирующий буфер с кольцевой РНК фильтровали через фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм для удаления остатков геля, и кольцевую РНК очищали/концентрировали путем осаждения этанолом.

Функционализированный алкином талидомид (Jena Bioscience) конъюгировали с функционализированной азидом кольцевой РНК посредством катализируемых медью азид-алкиновых реакций клик-химии (CuAAC) с помощью набора для реакций клик-химии согласно инструкциям производителя (Jena Bioscience). Кольцевую РНК, конъюгированную с талидомидом, очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs).

Свойства связывания кольцевой РНК, конъюгированной с талидомидом, анализировали с помощью соосаждения с GST с последующей qPCR для выявления РНК. Для анализа методом соосаждения с GST кольцевую РНК, конъюгированную с талидомидом (2 нМ), инкубировали с убиквитинлигазой E3 церебллоном, слитой с GST (50 нМ), которая взаимодействует с талидомидом, в течение 2 часов при комнатной температуре в присутствии 25 мМ Трис-НСl (рН 7,0), 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,5% NP-40, 5% глицерина. Функционализированную азидом кольцевую РНК, не конъюгированную с талидомидом, использовали в качестве отрицательного контроля.

Смесь РНК-белок дополнительно инкубировали в течение часа при комнатной температуре с гранулами GSH-агарозы для оценки взаимодействий GST-GSH. После трехкратного промывания связывающим буфером РНК, специфично связавшуюся с гранулами GSH, экстрагировали тризолом (Thermo Fisher). Экстрагированную кольцевую РНК подвергали обратной транскрипции и выявляли с помощью количественной RT-PCR с праймерами, специфичными по отношению к кольцевой РНК (прямой: TACGCCTGCAACTGTGTTGT (SEQ ID NO: 24), обратный: TCGATGATCTTGTCGTCGTC (SEQ ID NO: 25)).

На **фиг. 14** продемонстрировано, что кольцевая РНК, конъюгированная с малой молекулой, представляющей собой талидомид, являлась высокообогащенной в анализе методом соосаждения с GST, что демонстрирует, что кольцевая РНК содержала малую молекулу и связывалась со специфическими белками посредством малой молекулы.

Пример 29. Кольцевая РНК, связывающая малую молекулу

В данном примере продемонстрирована кольцевая РНК, связанная с малой молекулой, специфично связывающей вторичный белок.

Как показано в следующем примере, малая молекула была присоединена с помощью клик-реакции к кольцевой РНК для создания каркаса для специфичного связывания вторичных белков, например, убиквитинлигазы E3 и мишени.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала реакционноспособные уридиновые остатки (например, 5-азидо-С3-УТР или 5-этил-УТР) для конъюгации с функционализированными алкином или функционализированными азидом малыми молекулами для любых последующих функциональных применений.

Линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 (Lucigen). Все УТР были заменены на 5-азидо-С3-УТР или 5-этил-УТР (Jena Biosciences) в реакции транскрипции *in vitro* с получением соответственно функционализированной азидом или функционализированной алкином РНК. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New

England Biolabs) и подвергали обработке с помощью РНК-5'-пирофосфогидролазы (RppH, New England Biolabs) для удаления пирофосфата. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs).

Кольцевую РНК получали посредством лигирования с помощью шунта. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH (100 мкМ), и ДНК-шунт (200 мкМ) отжигали путем нагревания до 75°C в течение 5 минут и постепенного охлаждения при комнатной температуре в течение 20 минут. Реакцию лигирования проводили с помощью РНК-лигазы 2 T4 (0,2 ед/мкл, New England Biolabs) в течение 4 часов при 37°C. Лигированную смесь очищали путем осаждения этанолом.

Для выделения кольцевой РНК лигированную смесь разделяли в 6% денатурирующем геле для PAGE с мочевиной. РНК в геле окрашивали с помощью SYBR Green (Thermo Fisher) и визуализировали с помощью трансиллюминатора (Transilluminators). Полосы РНК, соответствующие кольцевой РНК, вырезали и измельчали в пробирках для разрушения геля (IST Engineering). Для элюирования кольцевой РНК измельченные образцы геля с кольцевой РНК инкубировали с элюирующим буфером (0,5 М ацетат натрия, 1 мМ EDTA, 0,1% SDS) при 37°C в течение часа, и надосадочную жидкость осторожно собирали. Оставшийся элюированный измельченный гель подвергали еще одному циклу элюирования, что повторяли в общей сложности три раза. Элюирующий буфер с кольцевой РНК фильтровали через фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм для удаления остатков геля, и кольцевую РНК очищали/концентрировали путем осаждения этанолом.

Функционализированный алкином краситель Alexa Fluor 488 или функционализированный азидом краситель Alexa Fluor 488 (Jena Bioscience) конъюгировали с функционализированной азидом кольцевой РНК посредством катализируемых медью азид-алкиновых реакций клик-химии (CuAAC) с помощью набора для реакций клик-химии согласно инструкциям производителя (Jena Bioscience). Кольцевую РНК, конъюгированную с красителем Alexa Fluor 488, очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs).

Отслеживание конъюгации с красителем проводили посредством разделения кольцевой РНК в 6% денатурирующем геле для PAGE с мочевиной. Не конъюгированную и конъюгированную с красителем Alexa Fluor кольцевую РНК параллельно разделяли в геле для сравнения. Отслеживание флуоресценции РНК в геле проводили с помощью системы визуализации iBright (Invitrogen). После отслеживания флуоресценции гель окрашивали с помощью SYBR Safe, и РНК в геле визуализировали с помощью системы визуализации iBright (Invitrogen).

Было показано, что кольцевая РНК, содержащая малую молекулу, представляющую собой Alexa Fluor 488, флуоресцирует, что демонстрирует, что кольцевая РНК может содержать функциональную малую молекулу.

Как изображено на **фиг. 15**, кольцевая РНК, конъюгированная с малой молекулой, представляющей собой талидомид, давала отдельный продукт ПЦР, как выявляется посредством флуоресценции, что демонстрирует, что кольцевая РНК, конъюгированная с малой молекулой, специфично взаимодействовала со вторичным белком.

Пример 30. Кольцевая РНК, связывающая две разные малые молекулы

В данном примере описаны два разных выбранных белка, привлекаемые кольцевой РНК, которая связана с малыми молекулами.

Талидомид, являющийся лекарственным средством, одобренным для клинического применения (*талидомид*), как известно, связывается с убиквитинлигазой E3 церебллоном, являющейся элементом клеточного аппарата разрушения белков. Благодаря конъюгированию талидомида с кольцевой РНК (например, посредством клик-химии) кольцевая РНК, конъюгированная с талидомидом, может привлекать клеточный аппарат разрушения ко второму белку, вызывающему заболевание (например, на который также нацеливается кольцевая РНК). Как показано в следующем примере, две малые молекулы (талидомид и JQ1) конъюгированы с кольцевой РНК для связывания (1) убиквитинлигазы E3 церебллона для убиквитинирования и последующего разрушения соседнего белка и (2) белков из семейства BET посредством JQ1, который представляет собой низкомолекулярный ингибитор, связывающийся с белками из семейства BET.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит реакционноспособные уридиновые остатки (например, 5-азидо-C3-UTP) для конъюгации с функционализированными алкином малыми молекулами, которые, как известно, взаимодействуют с внутриклеточным белком, представляющим интерес.

Линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 (Lucigen). Все UTP заменяют на 5-азидо-C3-UTP (Jena Biosciences) в реакции транскрипции *in vitro* с получением функционализированной азидом РНК. Синтезированную линейную РНК очищают с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs) и подвергают обработке с помощью РНК-5'-пирофосфогидролазы (RppH, New England Biolabs) для удаления пирофосфата. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, очищают с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs).

Кольцевую РНК получают посредством лигирования с помощью шунта. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH (100 мкМ), и ДНК-шунт (200 мкМ) отжигают путем нагревания до 75°C в течение 5 минут и постепенно охлаждают при комнатной температуре

в течение 20 минут. Реакцию лигирования проводят с помощью РНК-лигазы 2 T4 (0,2 ед/мкл, New England Biolabs) в течение 4 часов при 37°C. Лигированную смесь очищают путем осаждения этанолом. Для выделения кольцевой РНК лигированную смесь разделяют в 4% денатурирующем геле для PAGE с мочевиной. РНК в геле окрашивают с помощью SYBR Green (Thermo Fisher) и визуализируют с помощью трансиллюминатора (Transilluminators). Полосы РНК, соответствующие кольцевой РНК, вырезают и измельчают в пробирках для разрушения геля (IST Engineering). Для элюирования кольцевой РНК измельченные образцы геля с кольцевой РНК инкубируют с элюирующим буфером (0,5 М ацетат натрия, 1 мМ EDTA, 0,1% SDS) при 37°C в течение часа, и надосадочную жидкость осторожно собирают. Оставшийся элюированный измельченный гель подвергают еще одному циклу элюирования, что повторяют в общей сложности три раза. Элюирующий буфер с кольцевой РНК фильтруют через фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм для удаления остатков геля, и кольцевую РНК очищают/концентрируют путем осаждения этанолом.

Функционализированный алкином талидомид и функционализированный алкином JQ1 (Jena Bioscience) конъюгируют с функционализированной азидом кольцевой РНК посредством катализируемых медью азид-алкиновых реакций клик-химии (CuAAC) с помощью набора для реакций клик-химии согласно инструкциям производителя (Jena Bioscience). Для сравнения получают три разных типа кольцевых РНК, конъюгированных с малыми молекулами: РНК как с JQ1, так и с талидомидом, только с талидомидом и только с JQ1. Кольцевую РНК, конъюгированную с малой молекулой, очищают с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs).

Связывание кольцевой РНК, конъюгированной с малой молекулой, с убиквитинлигазой E3 CRBN и белками из семейства BET анализируют с помощью соосаждения с GST. Для данного эксперимента используют GST-CRBN (Abcam) и один из белков из семейства BET — белок 4, содержащий бромодомен (BRD4, BPS Biosciences). Для анализа методом соосаждения с GST кольцевую РНК, конъюгированную с талидомидом и JQ1 (2 нМ), инкубируют с GST-CRBN и BRD4 (по 50 нМ каждого) в течение 2 часов при комнатной температуре в присутствии 25 мМ Трис-НСl (рН 7,0), 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,5% NP-40, 5% глицерина. Функционализированную азидом неконъюгированную кольцевую РНК, РНК, конъюгированную с талидомидом, и РНК, конъюгированную с JQ1, используют в качестве отрицательных контролей. Смесь РНК-белок дополнительно инкубируют с гранулами GSH-агарозы для обеспечения возможности взаимодействий GST-GSH в течение часа при комнатной температуре. После трехкратного промывания связывающим буфером гранулы разделяют на две равные части. Для

отслеживания связывания белка одну часть гранул кипятят в присутствии буфера Лэммли для образцов (Bio-Rad) и подвергают вестерн-блоттингу с антителом к BRD4 (для выявления белка BRD4) и антителом к GST (для выявления GST-CRBN). Для отслеживания привлечения РНК РНК на гранулах экстрагируют тризолом (Thermo Fisher), и экстрагированную кольцевую РНК подвергают обратной транскрипции и выявляют с помощью количественной RT-PCR с праймерами, специфичными по отношению к кольцевой форме РНК (прямой: TACGCCTGCAACTGTGTTGT (SEQ ID NO: 24), обратный: TCGATGATCTTGTCGTCGTC (SEQ ID NO: 25)).

Ожидается, что кольцевая РНК, содержащая малые молекулы, представляющие собой талидомид и JQ1, является высокообогащенной при соосаждении с GST как для CRBN, так и для белка BRD4 с BET-доменом, что демонстрирует, что кольцевая РНК может не только содержать малую молекулу, но и может связываться с двумя специфическими белками с помощью данной конъюгированной малой молекулы для разрушения выбранного белка.

Пример 31. Кольцевая РНК, связывающая углеводы

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с углеводами.

Сиалилированный антиген X системы Льюис представляет собой тетрасахарид в составе гликоконъюгата с мембранными белками. Он выступает в качестве лиганда для белков селектинов во время клеточной адгезии. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с сиалилированным антигеном X системы Льюис для ингибирования клеточной адгезии.

Сконструированная кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность связывания с сиалилированным антигеном X системы Льюис (например, 5'-
CCGUA AUACGACUCACUAUAGGGGAGCUCGGUACCGAAUUCAAGGUACUCUGUGC
UUGUCGAUGUGUAUUGAUGGCACUUUCGAGUCAACGAGUUGACAGAACAAGUAG
UCAAGCUUUGCAGAGAGGAUCCUU-3' (SEQ ID NO: 26)).

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность связывания с сиалилированным антигеном X системы Льюис. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК. Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-

лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с сиалилированным антигеном X системы Льюис заключается в измерении клеточной адгезии, опосредованной сиалилированным антигеном X системы Льюис. E-селектин распознает сиалилированный антиген X системы Льюис, а поверхность клеток промиелоцитарного лейкоза линии HL60 богата сиалилированным антигеном X системы Льюис, особенно после обработки с помощью TNF- α . Рекомбинантный растворимый E-селектин (Calbiochem) добавляют в титрационный микропланшет (250 нг/лунка) в 0,05 М NaHCO₃ при pH 9,2 (10 мкг/мл) и инкубируют в течение ночи при 4°C. Затем инкубируют кольцевую РНК (10 мкг/мл), содержащую или не содержащую сайт связывания с сиалилированным антигеном X системы Льюис. Клетки промиелоцитарного лейкоза человека HL60, активированные с помощью TNF- α (10 нг/мл в течение 20 часов), инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре на планшете, промывают, и измеряют количество адгезированных клеток.

Пример 32. Кольцевая РНК, связывающая вирус

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с вирусом.

Вирус гриппа имеет два гликопротеиновых компонента мембраны, включающих гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA). На поверхности каждой вирусной частицы экспрессируется приблизительно 900 и 300 копий HA и NA соответственно. Как показано в следующем примере, сконструированная кольцевая РНК разработана для связывания с гемагглютинином для связывания вируса.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит сайт связывания с гемагглютинином (например, 5'-GGGAGAAUCCGACCAGAAGGGUUAGCAGUCGGCAUGCGGUACAGACAGACCUUCCUCUCUCCUCCUCUUCU-3' (SEQ ID NO: 27)) для связывания с поверхностью вируса гриппа.

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность связывания с гемагглютинином. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК. Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью

ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Один из способов для оценки связывания кольцевой РНК с гемагглютинином заключается в анализе ингибирующих эффектов РНК-аптамеров в отношении НА-индуцированного слияния мембран. Если гемагглютинин связан с кольцевой РНК, слияние мембран происходит с меньшей частотой, чем в случае с несвязанной кольцевой РНК.

НА-индуцированное слияние мембран исследуют с использованием мембран флуоресцентно меченных вирусов и "теней" эритроцитов человека (RBC). Мембрану вируса А/Панама/2007/1999 (H3N2) метят флуоресцентным зондом для липидов, представляющим собой октадецилродамин В (R18; Molecular Probes).

Для анализа ингибирования слияния вирус H3N2 (0,05–0,1 мг общего белка/мл), смешанный с кольцевой РНК (0,5 или 5 мМ), добавляли к мембранам "теней" на покровных стеклах, установленных в металлической камере. После слияния вируса с мембранами "теней" взаимное перемешивание липидов между мембранами вируса и мембранами "теней" индуцирует усиление флуоресценции R18.

Пример 33. Кольцевая РНК, связывающая клетки

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с различными типами клеток-мишеней.

В данном примере сконструированная кольцевая РНК разработана посредством одного из способов, описанных ранее. Кольцевая РНК и линейная РНК разработаны так, что они содержат аптамер Mango, стабилизирующий стебель и некодирующую область: аптамер для рецептора трансферрина (например, GGGGGAUCAAUCCAAGGGACCCGGAAACGCUCCCUACACCCC (SEQ ID NO: 28)). Данная аптамерная область связывается с рецептором трансферрина, что обеспечивает возможность связывания РНК с клетками, экспрессирующими рецептор. Рецептор трансферрина экспрессируется на различных типах клеток, в том числе эритроцитах и некоторых раковых клетках. В качестве отрицательного контроля РНК разработана так, что она не содержит аптамерную область.

Клетки HeLa представляют собой раковые клетки шейки матки, которые, как известно, экспрессируют рецептор трансферрина. Клетки HeLa выращивают в стандартных условиях (в среде DMEM с 10% FBS при 37°C и 5% CO₂). Клетки регулярно пересевают для поддержания экспоненциального роста. Связывание кольцевой РНК с ТО1-биотином оценивают *in vitro* в клетках HeLa с помощью флуоресцентной микроскопии. Если ТО1-

биотин связывается с РНК, то его флуоресценция повышается более чем в 100 раз. В среду с культурами HeLa добавляют кольцевую РНК, содержащую или не содержащую аптамеры (50 нМ), а также контроль без РНК. Для обеспечения доставки РНК добавляют липидный реагент для трансфекции (Thermo Fisher Scientific). Культуры обрабатывают ТО1-биотином, и флуоресценцию анализируют через 3 и 6 часов.

Пример 34. Кольцевая РНК, связывающая аптамер

В данном примере описано связывание кольцевой РНК с аптамером.

Сконструированная кольцевая РНК разработана так, что она содержит одну или несколько новых последовательностей связывания для РНК-аптамеров. РНК-аптамеры служат мишенями для связывания с кольцевой РНК благодаря комплементарности. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК комплементарно связывается с LIN28A-связывающим аптамером для секвестрации.

Кольцевая РНК разработана так, что она содержит последовательность, комплементарную последовательности LIN28A-связывающего аптамера — 5'-GGGGUAGUGAUUUUACCCUGGAGAU-3'(SEQ ID NO: 12).

Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего последовательность, комплементарную LIN28A-связывающему аптамеру. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (QIAGEN), обрабатывают щелочной фосфатазой (ThermoFisher Scientific, EF0652), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью системы для очистки РНК.

Кольцевую РНК, получаемую посредством лигирования с помощью шунта, получают путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы T4 (New England Bio, Inc., M0202M) или РНК-лигазы 2 T4 (New England Bio, Inc., M0239S), и кольцевую РНК выделяют после обогащения посредством обработки РНКазой R. Качество РНК оценивают с помощью электрофореза в агарозном геле или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с LIN28A-связывающим аптамером оценивают с помощью анализа олигонуклеотидов методом соосаждения и qPCR, в котором модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные кольцевой РНК, используются для соосаждения LIN28A-связывающего аптамера, который подвергается обратной транскрипции и амплифицируется с помощью qPCR.

Пример 35. Кольцевая РНК, связывающая фактор транскрипции

В данном примере продемонстрировано связывание кольцевой РНК с белком для секвестрации. NF-κB представляет собой семейство факторов транскрипции, которые

активируют транскрипцию и индуцируют сигнальные пути выживания. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывалась с NF-κB для секвестрации.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала NF-κB-связывающие аптамерные РНК-мотивы: 5'-ааааааааааGATCTTGAAACTGTTTTAAGGTTGGCCGATCTTаааааа-3'(SEQ ID NO: 29) для конкурентного связывания с NF-κB и ингибирования его связывания/последующих функций. К внутреннему мотиву связывания добавляли отрезки поли(А)-отрезки для (1) обеспечения способности РНК-олигонуклеотида РНК поддаваться лигированию и поддержания вторичной структуры аптамера. Правильность укладки проверяли с помощью веб-сервера RNAfold. В качестве контроля использовали скремблированную последовательность РНК (ааааааааТТСТССГААСГТГТСААСГТТТСААГАААСГТГАСААСГТТССГАААаааааа (SEQ ID NO: 30)). Данная скремблированная последовательность РНК сворачивается в 3D-структуру, сходную с аптамером, но не нацеливающуюся на какие-либо белки, как описано в Mi et al., Mol Ther. 2008 Jan; 16(1):66-73.

РНК с NF-κB-связывающим аптамерным мотивом была синтезирована коммерческим поставщиком (IDT) с 5'-монофосфатной группой и 3'-гидроксильной группой. Для лигирования РНК-олигонуклеотида использовали РНК-лигазу 1 (New England Biolabs, M0204S). Для удаления остаточной линейной РНК из образцов использовали РНКазу R в соответствии с инструкциями производителя (Lucigen, RNR07250). Дополнительно, кольцевую mRNA очищали посредством экстракции кольцевой РНК из 15% геля для PAGE с мочевиной. Кольцевую РНК элюировали из геля в буфере, содержащем 0,5 М ацетат натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA. Остатки геля или солей после экстракции из геля удаляли путем прогонки элюата через микроцентрифужную колонку (New England Biolabs, T2030S). РНК элюировали в буфере для хранения РНК (1 мМ цитрата натрия, Thermo Fisher, AM7000), и целостность РНК оценивали с помощью PAGE с мочевиной или посредством автоматизированного капиллярного гель-электрофореза (Agilent).

Для оценки сродства связывания кольцевой РНК с NF-κB проводили анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA). Один пмоль линейной или кольцевой РНК инкубировали с рекомбинантной субъединицей p50 NF-κB (Cayman Chemical, 10009818) в различных концентрациях относительно концентрации РНК (т. е. 0, 0,1, 1, 10 пмоль белка) в течение 20 минут при комнатной температуре в забуференной реакционной смеси (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂). Образцы прогоняли в 6% геле TBE с мочевиной в течение 25 минут при 200 В. Гели окрашивали с помощью SYBR Gold (Thermo

Scientific, S11494) и визуализировали с помощью системы визуализации E-Gel синего света (Thermo Scientific, 4466612).

Как продемонстрировано на **фиг. 17**, РНК со скремблированными аптамерными связывающими последовательностями не демонстрировала сродство связывания с субъединицей p50 NF-κB. Как линейный, так и кольцевой варианты NF-κB-связывающей аптамерной последовательности связывались с субъединицей p50 со сходными показателями сродства.

Связывание кольцевой РНК с NF-κB оценивали *in vitro* с помощью EMSA для NF-κB. NF-κB избирательно связывался с кольцевыми РНК, содержащими NF-κB-связывающий аптамерный РНК-мотив. Этот результат продемонстрировал, что биологические молекулы, представляющие интерес, избирательно связывались последовательностями кольцевой РНК.

Пример 36. Кольцевая РНК, секвестрирующая белок-мишень и ингибирующая его функцию

В данном примере продемонстрировано связывание кольцевой РНК с белком в клетках, и эта секвестрация приводит к ингибированию функции. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с NF-κB для секвестрации, что приводит к ингибированию выживания, активируемого NF-κB в клетках.

Кольцевая, линейная и линейная скремблированная РНК были разработаны и синтезированы так, как описано ранее.

Функцию NF-κB в линии клеток немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) A549s после доставки кольцевой РНК с NF-κB-связывающей аптамерной последовательностью определяли путем измерения жизнеспособности клеток с помощью МТТ-анализа (Thermo Scientific, V13154). Вкратце, клетки A549 трансфицировали с помощью 1 пмоль линейной, линейной скремблированной или кольцевой РНК после образования комплекса с липидным реагентом для трансфекции (Thermo Scientific, LMRNA003). Жизнеспособность измеряли с помощью МТТ-анализа, который проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Как продемонстрировано на **фиг. 18**, клетки, обработанные линейной РНК, продемонстрировали отсутствие изменения жизнеспособности в день 1 и небольшое снижение жизнеспособности в день 2 (жизнеспособность составляла 101% в день 1 и 97% в день 2). В отличие от этого, клетки, обработанные кольцевой РНК, продемонстрировали поддающееся измерению снижение жизнеспособности в день 1 и большее увеличение в день 2 (89% в день 1 и 86% в день 2).

В целом результаты продемонстрировали, что кольцевая РНК связывалась с NF-kB в клетках и ингибировала опосредованную NF-kB активацию сигнальных путей выживания.

Пример 37. Кольцевая РНК, связывающая и секвестрирующая белок, для осуществления повышения чувствительности к химиотерапевтическим средствам

В данном примере продемонстрировано связывание кольцевой РНК с белком-мишенью в клетках, что приводит к ингибированию сигнальных путей, опосредованных белком-мишенью. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК секвестрировала NF-kB в химиорезистентных клетках и ингибировала передачу сигналов, опосредованную NF-kB, тем самым восстанавливая чувствительность клеток к химиотерапевтическим средствам.

Линейная, линейная скремблированная и кольцевая РНК были разработаны и синтезированы так, как описано ранее.

Эффект секвестрации NF-kB в химиорезистентной линии клеток немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) A549s определяли после доставки кольцевой РНК, нацеливающейся на NF-kB, и воздействия химиотерапевтического средства. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-анализа (Thermo Scientific, V13154). Вкратце, клетки A549 трансфицировали с помощью 1 пмоль скремблированной линейной контрольной, линейной или кольцевой РНК после образования комплекса с липидным реагентом для трансфекции (Thermo Scientific, LMRNA003). Через 24 часа после трансфекции клетки обрабатывали с помощью 5 мкМ доксорубицина в течение дополнительных 18 часов. Жизнеспособность измеряли с помощью МТТ-анализа, который проводили в соответствии с инструкциями производителя. Обработку доксорубицином повторяли через 48 и 72 часа после трансфекции.

Как продемонстрировано на **фиг. 19**, обработка доксорубицином и скремблированной линейной РНК (контроль) не влияла на жизнеспособность клеток в линии раковых клеток легкого A549, устойчивых к доксорубицину, в день 1. Совместная обработка доксорубицином и линейной РНК приводила к снижению жизнеспособности клеток в день 2 (78% выживаемость). В отличие от этого, совместная обработка с помощью кольцевого аптамера приводила к большей гибели клеток как в день 1, так и в день 2 (79% выживаемость в день 1 и 73% выживаемость в день 2).

В целом результаты продемонстрировали, что кольцевая РНК связывалась с NF-kB в клетках и ингибировала сигнальный путь выживания, опосредованный NF-kB, тем самым повышая чувствительность клеток к химиотерапевтическому средству доксорубицину.

Пример 38. Кольцевая РНК, метящая белок-мишень для разрушения

В данном примере продемонстрировано привлечение кольцевой РНК, связанной с малыми молекулами, двух разных выбранных белков и мечение ею таким образом белка-мишени для разрушения.

Талидомид, являющийся лекарственным средством, одобренным для клинического применения (*ревлимид*), как известно, связывается с убиквитинлигазой E3, являющейся элементом клеточного аппарата разрушения белков. Благодаря конъюгированию талидомида с кольцевой РНК (например, посредством клик-химии) кольцевая РНК, конъюгированная с талидомидом, может привлекать клеточный аппарат разрушения ко второму белку, вызывающему заболевание (например, на который также нацеливается кольцевая РНК). На **фиг. 20** показано схематическое изображение иллюстративной кольцевой РНК, которая доставляется в клетки и метит белок-мишень BRD4 в клетках для разрушения системой убиквитина. Как показано в следующем примере, две малые молекулы (талидомид и JQ1) были конъюгированы с кольцевой РНК для связывания (1) убиквитинлигазы E3 цереблona для убиквитинирования и последующего разрушения соседнего белка и (2) белков из семейства BET посредством JQ1, который представляет собой низкомолекулярный ингибитор, связывающийся с белками из семейства BET.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала несколько (49 остатков) реакционноспособных уридиновых остатков (например, 5-азидо-С3-УТР) для конъюгации с функционализированными алкином малыми молекулами, которые, как известно, взаимодействуют с внутриклеточным белком, представляющим интерес.

Линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 (Lucigen). Все УТР были заменены на 5-азидо-С3-УТР (Jena Biosciences) в реакции транскрипции *in vitro* с получением функционализированной азидом РНК. Синтезированную линейную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs) и подвергали обработке с помощью РНК-5'-пирофосфогидролазы (RppH, New England Biolabs) для удаления пирофосфата. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs).

Кольцевую РНК получали посредством лигирования с помощью шунта. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH (100 мкМ), и ДНК-шунт (200 мкМ) отжигали путем нагревания до 75°C в течение 5 минут и постепенного охлаждения при комнатной температуре в течение 20 минут. Реакцию лигирования проводили с помощью РНК-лигазы 2 T4 (0,2 ед/мкл, New England Biolabs) в течение 4 часов при 37°C. Лигированную смесь очищали путем осаждения этанолом. Для выделения кольцевой РНК лигированную смесь разделяли в 4% денатурирующем геле для PAGE с мочевиной. РНК в геле окрашивали с

помощью SYBR Green (Thermo Fisher) и визуализировали с помощью трансиллюминатора (Transilluminators). Полосы РНК, соответствующие кольцевой РНК, вырезали и измельчали в пробирках для разрушения геля (IST Engineering). Для элюирования кольцевой РНК измельченные образцы геля с кольцевой РНК инкубировали с элюирующим буфером (0,5 М ацетат натрия, 1 мМ EDTA, 0,1% SDS) при 37°C в течение часа, и надосадочную жидкость осторожно собирали. Оставшийся измельченный гель подвергали еще одному циклу элюирования, что повторяли в общей сложности три раза. Элюирующий буфер с кольцевой РНК фильтровали через фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм для удаления остатков геля, и кольцевую РНК очищали/концентрировали путем осаждения этанолом.

Функционализированный алкином талидомид и/или JQ1 (тиенотриазолодиазепин, Jena Bioscience) конъюгировали с функционализированной азидом кольцевой РНК посредством катализируемых медью азид-алкиновых реакций клик-химии (CuAAC) с помощью набора для реакций клик-химии согласно инструкциям производителя (Jena Bioscience). Для сравнения три разных типа малых молекул конъюгировали с кольцевой РНК: РНК как с JQ1, так и с талидомидом, только с талидомидом или только с JQ1. Кольцевую РНК, конъюгированную с малой молекулой, очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs).

Эти различные РНК затем вводили путем трансфекции в клетки НЕК293Т для отслеживания разрушения белка-мишени с использованием липидного реагента для трансфекции (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Для трансфекции клеток НЕК293Т использовали 1 пмоль каждой РНК, и клетки высевали в 12-луночные планшеты (конечная концентрация 2 нМ). В случае с кольцевой РНК, конъюгированной как с JQ1, так и с талидомидом, 3 пмоль РНК вводили путем трансфекции в клетки НЕК293Т для тестирования эффекта различных концентраций кольцевой РНК в отношении разрушения BRD4 (конечная концентрация 6 нМ). В качестве положительного контроля использовали PROTAC dBET1 (Tocris Biosciences), который содержит как JQ1, так и талидомид и, как известно, разрушает белок BRD4 в клетках посредством привлечения CRBN (концентрация 2 мкМ, 10 мкМ). В качестве отрицательного контроля использовали носитель в отдельности и неконъюгированную кольцевую РНК. После 24 часов трансфекции клетки собирали путем добавления буфера для RIPA непосредственно на планшет.

Связывание кольцевой РНК, конъюгированной с малой молекулой, с убиквитинлигазой E3 CRBN и ее способность к разрушению белков из семейства BET анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, 12 мкг белка разделяли в 4-12%

градиентном Бис-Трис-геле (Thermo Fisher Scientific) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с использованием блот-системы для переноса (Thermo Fisher Scientific). Антитело кролика к BRD4 (Abcam) использовали для выявления белка BRD4, а антитело кролика к альфа-тубулину (Abcam) использовали для выявления альфа-тубулина в качестве контроля нагрузки. Отслеживание хемилюминесцентного сигнала от полос белка BRD4 и альфа-тубулина проводили с помощью системы визуализации Fc (LI-COR).

Уровни белка BRD4, а также альфа-тубулина в качестве контроля нагрузки также измеряли с помощью денситометрии с использованием ImageJ.

Как показано на **фиг. 21**, кольцевая РНК, содержащая малые молекулы, представляющие собой талидомид и JQ1, была способна разрушать BRD4, что демонстрируют нормализованные уровни BRD4. Данный результат продемонстрировал, что кольцевая РНК с малой молекулой связывается с двумя специфическими белками с помощью конъюгированной малой молекулы для разрушения белка-мишени.

Пример 39. Кольцевая РНК, связывающая малую молекулу дольше, чем ее линейный эквивалент

В данном примере продемонстрировано связывание кольцевой РНК с малой молекулой для секвестрации/регуляции биологической активности. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК является более стабильной, чем ее линейный эквивалент.

Линейные РНК-аптамеры Mango флуоресцируют при связывании с малой молекулой, представляющей собой краситель TO1-биотин. Как показано в следующем примере, кольцевая РНК Mango связывалась с производным тиазолового оранжевого, представляющим собой TO1-биотин, для секвестрации/регуляции биологической активности.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала сайты связывания РНК Mango с малой молекулой и стабилизирующий стебель: 5'-AATAGCCG GUCUACGGCC AUACCACCCU GAACGCGCCC GAUCUCGUCU GAUCUCGGAAGCUAAGCAGG GUCGGGCCUG GUUAGUACUU GGAUGGGAGA CCGCCUGGGAAUACCGGGUG CUGUAGGCGU CGACUUGCCA UGUGUAUGUG GGUACGAAGGAAGGAUUGGU AUGUGGUAUA UUCGUACCCA CAUACUCUGA UGAUCCUUCG GGAUCAUUCA UGGCAA CGGCTATT-3'(SEQ ID NO: 18), а также циркуляризационные последовательности: 5'-AATAGCCG-3' (SEQ ID NO: 19) и 5'-CGGCTATT-3' (SEQ ID NO: 20).

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего РНК-мотив Mango, стебли и

циркуляризационные последовательности. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH, New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. РНК, обработанную с помощью RppH, циркуляризовали с помощью ДНК-шунта, комплементарного циркуляризационным последовательностям, и РНК-лигазы 2 Т4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере, содержащем 0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA, осаждали этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКаз. Качество РНК оценивали с помощью PAGE с мочевиной или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с ТО1-биотином оценивали *in vitro* в клетках HeLa с помощью флуоресцентной микроскопии. Если ТО1-биотин связывался с РНК, его флуоресценция повышалась более чем в 100 раз. В среду с культурами фибробластов ВJ добавляли линейные или кольцевые аптамеры (50 нМ), а также контроль без РНК. Для обеспечения доставки РНК добавляли реагент для трансфекции липофектамин. Культуры обрабатывали ТО1-биотином, и флуоресценцию анализировали через 6 ч. и в дни 1-12. Как показано на **фиг. 22**, для кольцевого аптамера выявлялась повышенная флуоресценция/стабильность, при этом флуоресценция выявлялась в культуре в течение по меньшей мере 10 дней.

Пример 40. Кольцевая РНК, связывающая белок и РНК

В данном примере продемонстрировано связывание кольцевой РНК с белком и РНК для секвестрации.

Антигенный рецептор человека (HuR) может являться патогенным белком, например, известно, что он связывает и стабилизирует mRNA-транскрипты, связанные с раком, такие как mRNA, кодирующие протоонкогены, цитокины, факторы роста и факторы инвазии. HuR обладает центральной онкогенной активностью, обеспечивая проявление множественных раковых фенотипов. Секвестрация HuR с помощью кольцевой РНК может приводить к ослаблению онкогенного роста при множественных формах рака.

РНК играет центральную роль в метаболизме клетки, и молекулы РНК подвергаются множеству посттранскрипционных процессов, таких как сплайсинг, редактирование, модификация, трансляция и разрушение.

Как показано в следующем примере, кольцевая РНК связывается с HuR и РНК для секвестрации.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала HuR-связывающий РНК-мотив 5'-UCAUAAUCAА

UUUAUUUUUUUCUUUUUUUUUAUUUUUAUUCACAUAUUUUUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 31) для конкурентного связывания с HuR и ингибирования его связывания/последующих функций и РНК-связывающий мотив 5'-CGA GAC GCT ACG GAC TTA AAA TCC GTT GAC-3'(SEQ ID NO: 32).

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего РНК-мотив для HuR и последовательность связывания с белком.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала HuR-связывающий аптамерный РНК-мотив: 5'-UCAUAAUCAAAUUUAUUUUUUUCUUUUUUUUUAUUUUUAUUCACAUAUUUUUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 31) для конкурентного связывания с HuR и ингибирования его связывания/последующих функций и РНК-связывающий аптамерный мотив: 5'-CGA GAC GCT ACG GAC TTA AAA TCC GTT GAC-3' (SEQ ID NO: 32).

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего РНК-мотив для HuR и последовательность связывания с белком.

Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH, New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. РНК, обработанную с помощью RppH, циркуляризовали с помощью ДНК-шунта, комплементарного циркуляризационным последовательностям, и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере, содержащем 0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA, осаждали этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКаз. Качество РНК оценивали с помощью PAGE с мочевиной или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с HuR и РНК оценивали *in vitro* с помощью комбинации иммунопреципитации (IP) HuR и анализа методом соосаждения РНК с биотином с последующей qPCR. Белок HuR, связанный с антителом к HuR на белке G, инкубировали с кольцевой РНК, промывали и элюировали при низком pH. Связанный материал инкубировали с биотинилированной РНК, промывали и подвергали соосаждению с использованием Dynabeads, покрытых стрептавидином.

HuR связывался с кольцевыми РНК с HuR- и РНК-связывающим аптамерным мотивом и РНК, полученными в результате соосаждения со стрептавидином, с РНК-связывающими аптамерными мотивами, как показано на **фиг. 23**. Таким образом,

связывание наблюдалось, когда присутствовали два связывающих мотива — для HuR и РНК. Этот результат продемонстрировал, что биологические молекулы, представляющие интерес, связывались избирательно.

Пример 41. Кольцевая РНК, связывающая белок и ДНК

В данном примере продемонстрировано связывание кольцевой РНК с белком и ДНК для секвестрации.

Связывание ДНК белками и РНК играет ключевую роль в различных клеточных процессах, т. е. транскрипции.

Антигенный рецептор человека (HuR) играет центральную роль в судьбе mRNA и играет ключевую роль в посттранскрипционной регуляции mRNA-мишеней с центральными клеточными функциями, что делает его важным белком для патогенеза. Известно, что он связывает и стабилизирует mRNA-транскрипты, связанные с раком, и, таким образом, HuR обладает центральной онкогенной активностью, обеспечивая проявление множественных раковых фенотипов.

Нацеливание на эти контакты и конкуренцию с ними с помощью кольцевой РНК можно использовать для модулирования этих взаимодействий и контроля исходов в процессах, связанных и не связанных с заболеваниями.

Кольцевая РНК была разработана таким образом, чтобы она содержала ДНК-связывающий аптамерный РНК-мотив: 5'-CGA GAC GCT ACG GAC TTA AAA TCC GTT GAC-3' (SEQ ID NO: 32).

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH, New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. РНК, обработанную с помощью RppH, циркуляризовали с помощью ДНК-шунта, комплементарного циркуляризационным последовательностям, и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере, содержащем 0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA, осаждали этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКаз. Качество РНК оценивали с помощью PAGE с мочевиной.

Связывание кольцевой РНК с ДНК и HuR оценивали *in vitro* с помощью комбинации иммунопреципитации (IP) HuR и анализа методом соосаждения биотинилированной ДНК с последующей RT-qPCR. Кольцевую РНК, в которой отсутствует ДНК-связывающий мотив или мотив для HuR, использовали в качестве контроля специфичности.

Биотинилированная ДНК связывалась с кольцевыми РНК с помощью ДНК-связывающего аптамерного мотива.

Белок HuR, связанный с антителом к HuR на гранулах с белком G, инкубировали с кольцевой РНК, промывали и элюировали при низком рН. Связанный материал инкубировали с биотинилированной ДНК, промывали и подвергали соосаждению с использованием Dynabeads, покрытых стрептавидином. HuR связывался с кольцевыми РНК с HuR- и ДНК-связывающим аптамерным мотивом и РНК, полученными в результате соосаждения со стрептавидином, с ДНК-связывающими аптамерными мотивами, как показано на **фиг. 24**. Таким образом, связывание наблюдалось, когда присутствовали два связывающих аптамерных мотива — для HuR и ДНК. Этот результат продемонстрировал, что молекулы белка и ДНК, представляющие интерес, избирательно связывались с одной и той же кольцевой конструкцией.

Пример 42. Кольцевая РНК, продуцирующая в результате трансляции белок и связывающаяся с различными белками, которые влияют на его трансляцию

В данном примере продемонстрирована кольцевая РНК, кодирующая белок и связывающая различные белки, которые характеризуются эффектом в отношении трансляции кольцевой РНК.

Антигенный рецептор человека (HuR) играет центральную роль в судьбе mRNA и играет ключевую роль в посттранскрипционной регуляции mRNA-мишеней с центральными клеточными функциями. Таким образом, использование HuR для контроля экспрессии РНК может обеспечить контроль дозы белка, получаемого в результате трансляции.

Как показано в следующем примере, не встречающаяся в природе кольцевая РНК была сконструирована таким образом, чтобы она кодировала люциферазу *Gaussia* (GLuc) — биологически активный секретлируемый белок — и связывалась с HuR для регуляции трансляции GLuc. Эта кольцевая РНК содержала IRES, ORF, кодирующую люциферазу *Gaussia*, два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF, и 1X, 2X или 3X HuR-связывающих аптамерных мотива 5'-UCA UAA UCA AUU UAU UAU UUU CUU UUA UUU UAU UCA CAU AAU UUU GUU UUU-3' (SEQ ID NO: 33), 5'-AUU UUG UUU UUA ACA UUUC-3' (SEQ ID NO: 34), 5'-UCA UAA UCA AUU UAU UAU UUU CUU UUA UUU UAU UCA CAU AAU UUU GUU UUU AUU UUG UUU UUA ACA UUU C-3' (SEQ ID NO: 35) для связывания HuR.

Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК, содержащего РНК-мотив для HuR и последовательность связывания с белком.

Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH, New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. РНК, обработанную с помощью RppH, циркуляризовали с помощью ДНК-шунта, комплементарного циркуляризации последовательностям, и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере, содержащем 0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA, осаждали этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКаз. Качество РНК оценивали с помощью PAGE с мочевиной или посредством автоматизированного электрофореза (Agilent).

Связывание кольцевой РНК с HuR определяли с помощью анализа методом соосаждения РНК *in vitro*, как описано ранее.

Для оценки эффекта связывания с HuR и его эффекта в отношении экспрессии белка с кольцевой РНК в клетках 5×10^3 клеток HeLa успешно подвергали обратной трансфекции с помощью липидного реагента для трансфекции (Invitrogen) и 2 нМ кольцевой РНК. Активность люциферазы Gaussia отслеживали ежедневно в течение периода до 96 ч. в образцах надосадочной жидкости культур клеток в качестве меры экспрессии с использованием набора для анализа люциферазы Gaussia и следуя инструкциям производителя.

На **фиг. 25** показан более низкий уровень экспрессии секретируемого белка с кольцевой РНК с сайтами связывания аптамера с HuR. Более того, уровни экспрессии GLuc изменялись в зависимости от количества HuR-связывающих аптамерных мотивов в кольцевой РНК. Этот пример демонстрирует, что на уровень трансляции сконструированной кольцевой РНК влияли дополнительные аптамеры, связывающие белок.

Поскольку в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены теперь будут очевидны специалистам в данной области без отступления от раскрытия. Следует понимать, что при практическом осуществлении настоящего изобретения могут использоваться различные альтернативы вариантов осуществления, описанных в данном документе. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и структуры, находящиеся в пределах объема данной формулы изобретения и ее эквивалентов, охватываются ею.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обеспечения связывания с мишенью в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, где аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с мишенью, который поддается выявлению в течение по меньшей мере 5 дней после доставки.

2. Способ по п. 1, где мишень выбрана из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты, малой молекулы, белка, углевода и липида.

3. Способ по п. 1, где мишень представляет собой белок, регулирующий активность гена.

4. Способ по п. 3, где белок, регулирующий активность гена, представляет собой фактор транскрипции.

5. Способ по п. 2, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

6. Способ по п. 1, где комплекс модулирует экспрессию гена.

7. Способ по п. 1, где комплекс модулирует управляемую транскрипцию молекулы ДНК, эпигенетическое ремоделирование молекулы ДНК или разрушение молекулы ДНК.

8. Способ по п. 1, где комплекс модулирует разрушение мишени, транслокацию мишени или передачу сигнала к мишени.

9. Способ по п. 6, где экспрессия гена ассоциирована с патогенезом заболевания или состояния.

10. Способ по п. 1, где комплекс поддается выявлению в течение по меньшей мере 7, 8, 9 или 10 дней после доставки.

11. Способ по п. 1, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид присутствует в течение по меньшей мере пяти дней после доставки.

12. Способ по п. 1, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид присутствует в течение по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 дней после доставки.

13. Способ по п. 1, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид представляет собой немодифицированный трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид.

14. Способ по п. 1, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид имеет псевдодвухнитевую вторичную структуру.

15. Способ по п. 1, где аптамерная последовательность дополнительно имеет третичную структуру, которая связывается с мишенью.

16. Способ по п. 1, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

17. Способ по п. 16, где эукариотическая клетка представляет собой клетку человека.

18. Способ обеспечения связывания с фактором транскрипции в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с фактором транскрипции и модулирует экспрессию гена.

19. Способ обеспечения секвестрации фактора транскрипции в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид секвестрирует фактор транскрипции посредством связывания с фактором транскрипции с образованием комплекса в клетке.

20. Способ по п. 19, где жизнеспособность клетки снижается после образования комплекса.

21. Способ повышения чувствительности клетки к цитотоксическому средству, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с фактором транскрипции; и

доставку цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с фактором транскрипции в клетке;

за счет чего обеспечивается повышение чувствительности клетки к цитотоксическому средству по сравнению с клеткой, в которой отсутствует трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид.

22. Способ по п. 21, где повышение чувствительности клетки к цитотоксическому средству приводит к снижению жизнеспособности клетки после доставки цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида.

23. Способ по п. 22, где снижение жизнеспособности клетки представляет собой снижение на 40% или больше через по меньшей мере два дня после доставки цитотоксического средства и трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида.

24. Способ обеспечения связывания с патогенным белком в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с патогенным белком; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с патогенным белком для разрушения патогенного белка.

25. Способ обеспечения связывания с молекулой рибонуклеиновой кислоты в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, комплементарную последовательности молекулы рибонуклеиновой кислоты; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с молекулой рибонуклеиновой кислоты.

26. Способ обеспечения связывания с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с геномной молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты и модулирует экспрессию гена.

27. Способ обеспечения связывания с малой молекулой в клетке, при этом способ включает:

получение трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида, содержащего аптамерную последовательность, которая связывается с малой молекулой; и

доставку трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида в клетку, где трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид образует комплекс с малой молекулой и модулирует клеточный процесс.

28. Способ по п. 27, где малая молекула представляет собой органическое соединение с молекулярной массой, составляющей не более 900 дальтонов, и модулирует клеточный процесс.

29. Способ по п. 27, где малая молекула представляет собой лекарственное средство.

30. Способ по п. 27, где малая молекула представляет собой флуорофор.

31. Способ по п. 27, где малая молекула представляет собой метаболит.

32. Композиция, содержащая трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид, содержащий аптамерную последовательность, где аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью.

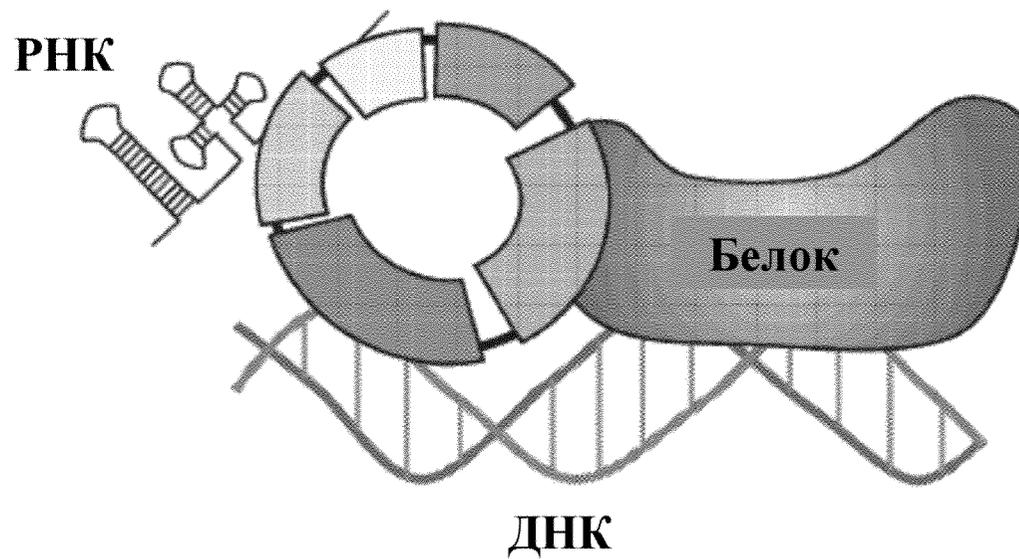
33. Фармацевтическая композиция, содержащая трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид, содержащий аптамерную последовательность, где аптамерная последовательность имеет вторичную структуру, которая связывается с мишенью; и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

34. Клетка, содержащая трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид по п. 32.

35. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение композиции по п. 32 или фармацевтической композиции по п. 33.

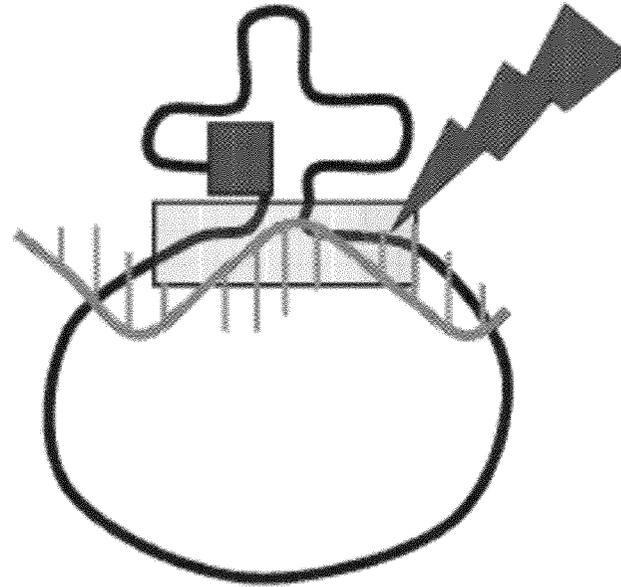
36. Полинуклеотид, кодирующий трансляционно некомпетентный кольцевой полирибонуклеотид по п. 32.

37. Способ получения трансляционно некомпетентного кольцевого полирибонуклеотида по п. 32.



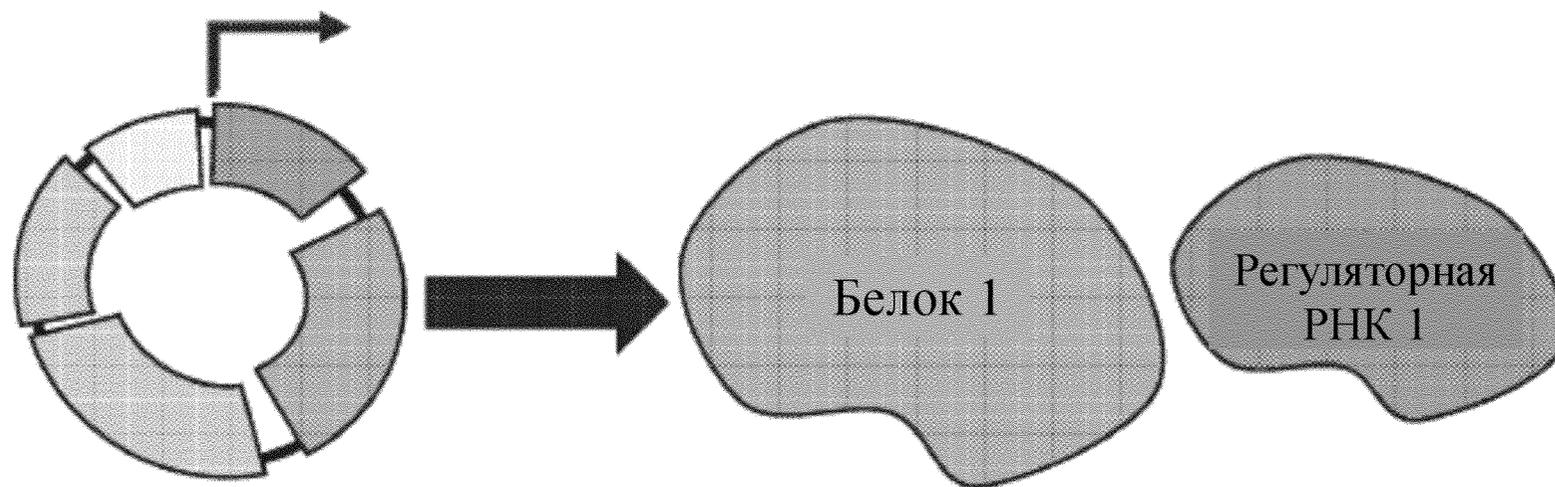
- РНК-связывающий мотив, специфичный по отношению к последовательности
- ДНК-связывающий мотив, специфичный по отношению к последовательности
- Связывающий мотив, специфичный по отношению к белку

ФИГ. 1

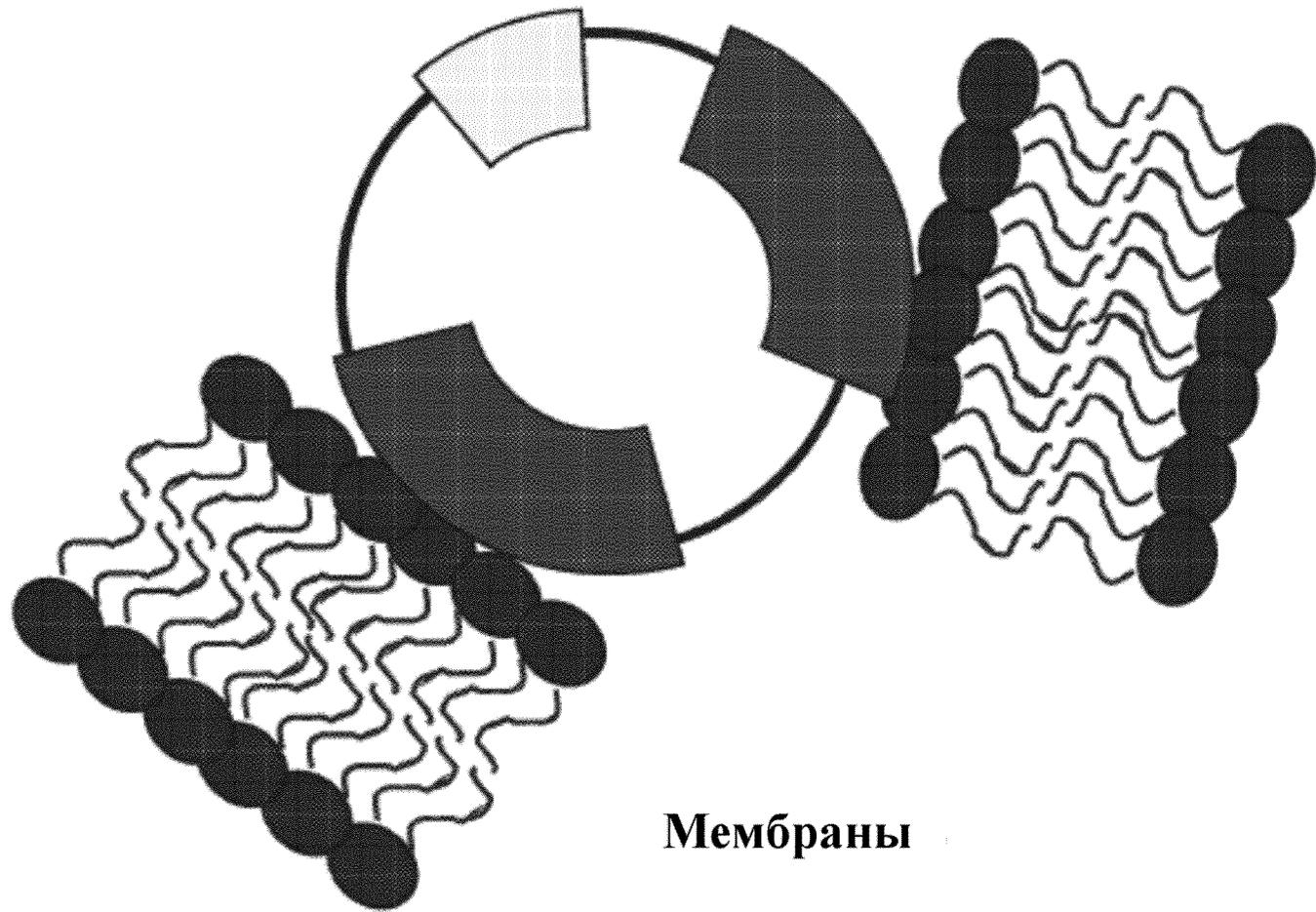


 Рибозимная активность
 Связывание с РНК, специфичное по отношению к последовательности

ФИГ. 2

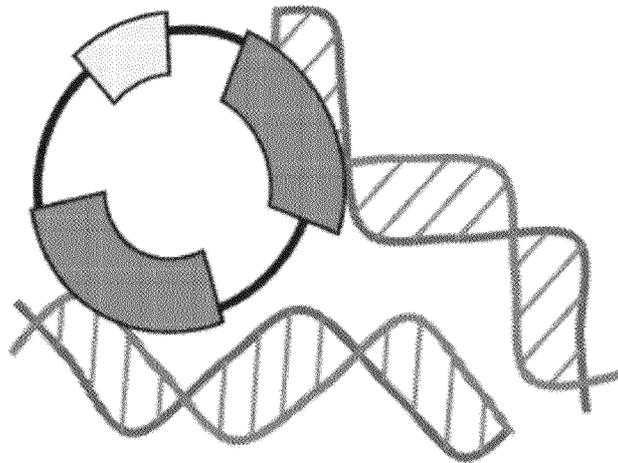


ФИГ. 3



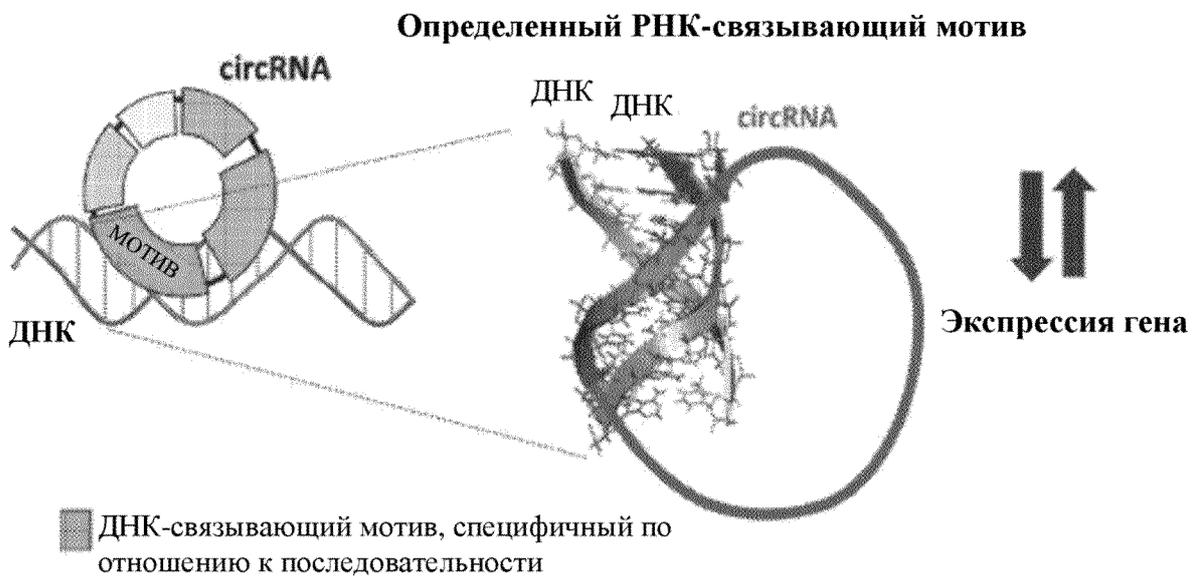
Мембраны

ФИГ. 4

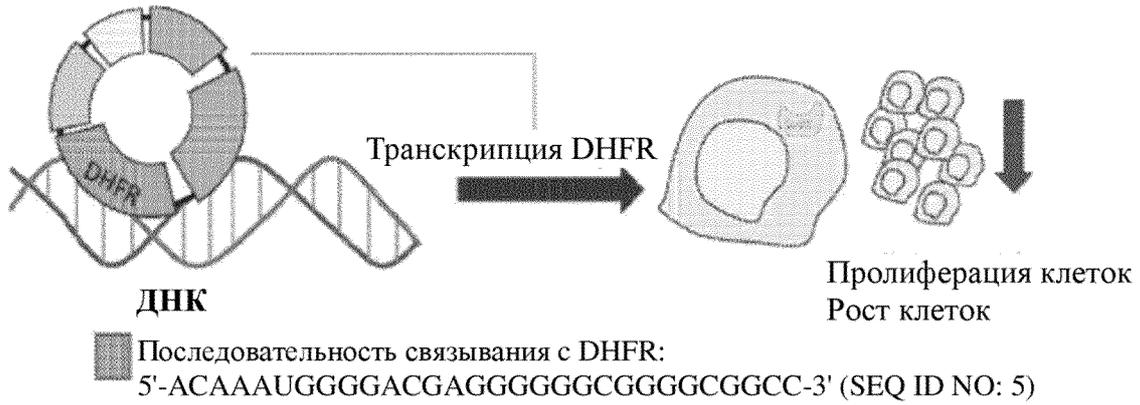


ДНК

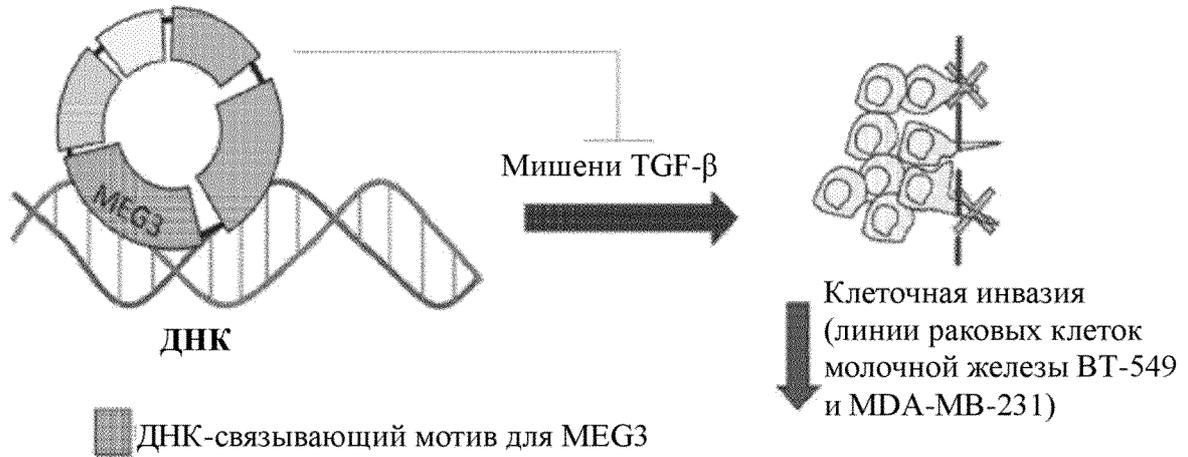
ФИГ. 5А



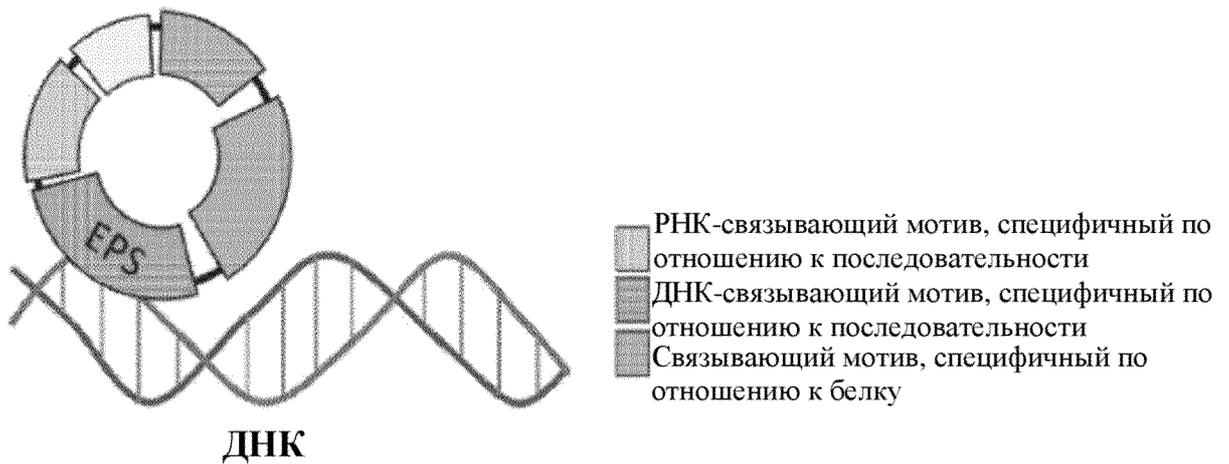
ФИГ. 5В



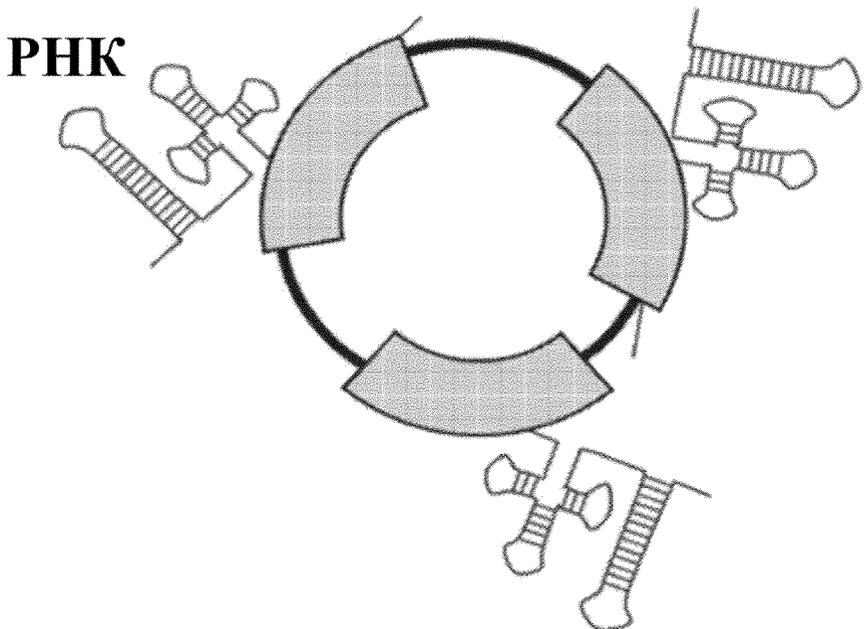
ФИГ. 5С



ФИГ. 5D

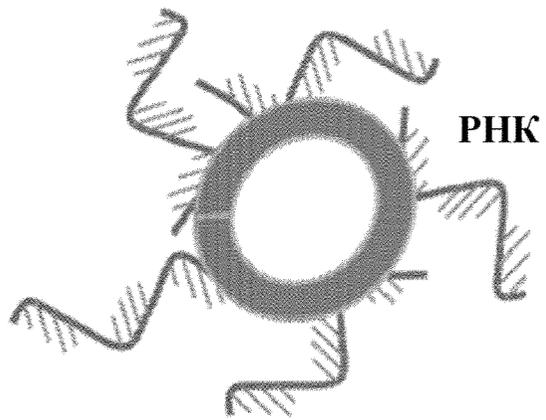


ФИГ. 5E



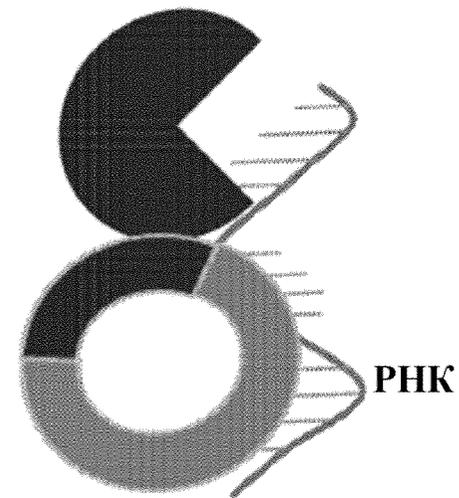
PHK

ФИГ. 6

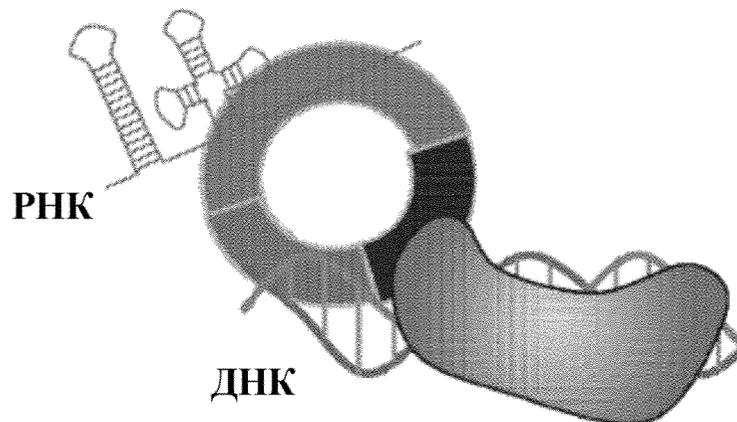


ФИГ. 7А

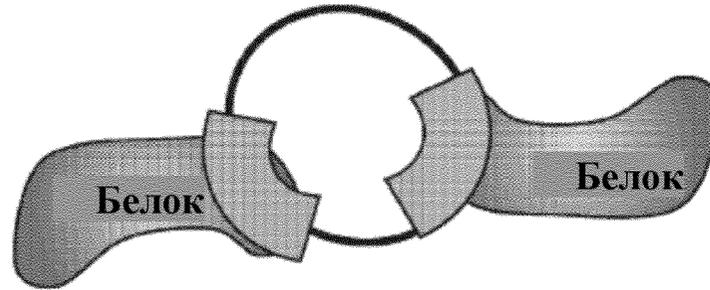
Белок



ФИГ. 7В



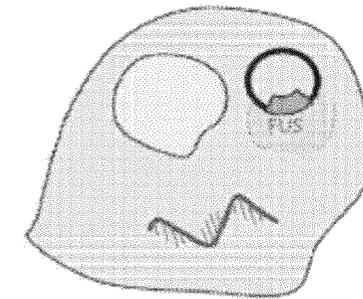
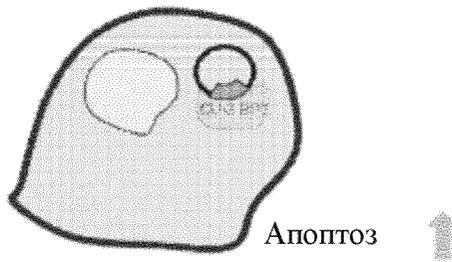
ФИГ. 7С



circRNA-ловушка для CUG-связывающего белка 1

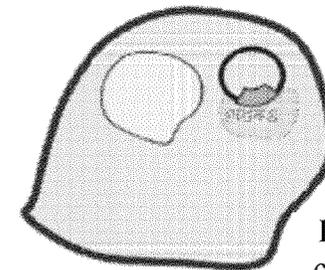
circRNA-ловушка для GEMIN5

circRNA-ловушка для FUS/TDP-43



circRNA-ловушка для LIN28A

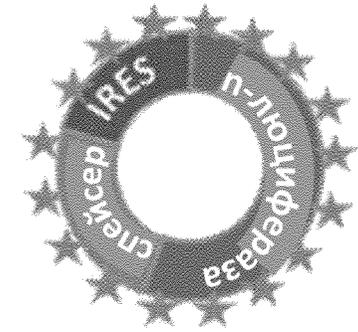
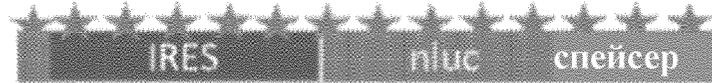
circRNA-ловушка для PRPF8



ФИГ. 8

★ = модификации

Полностью модифицированная РНК



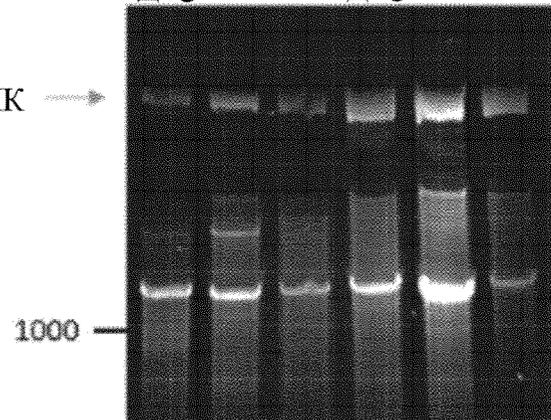
Гибридно-модифицированная РНК



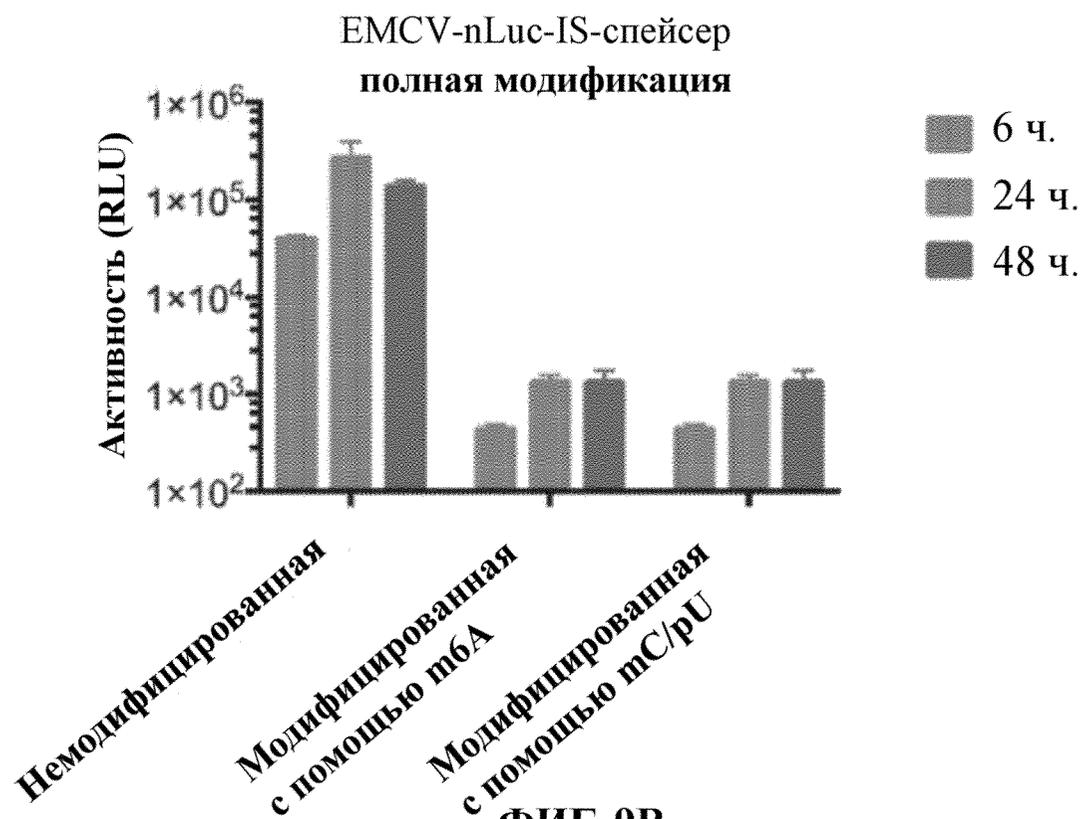
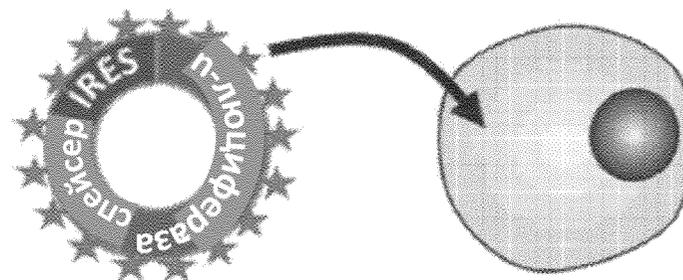
Гибридно-модифицированная Полностью модифицированная

Без модификации mC/psiU m6A Без модификации mC/psiU m6A

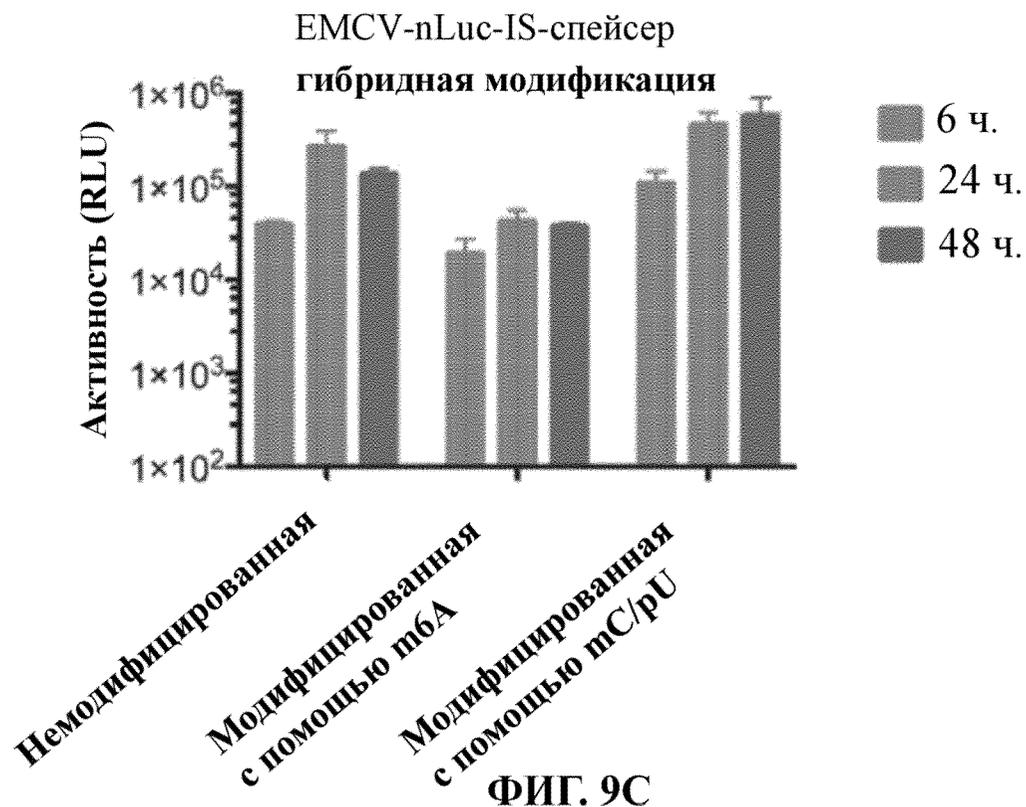
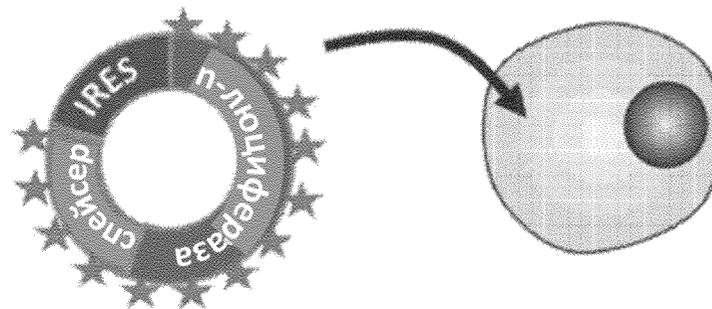
Кольцевая РНК →

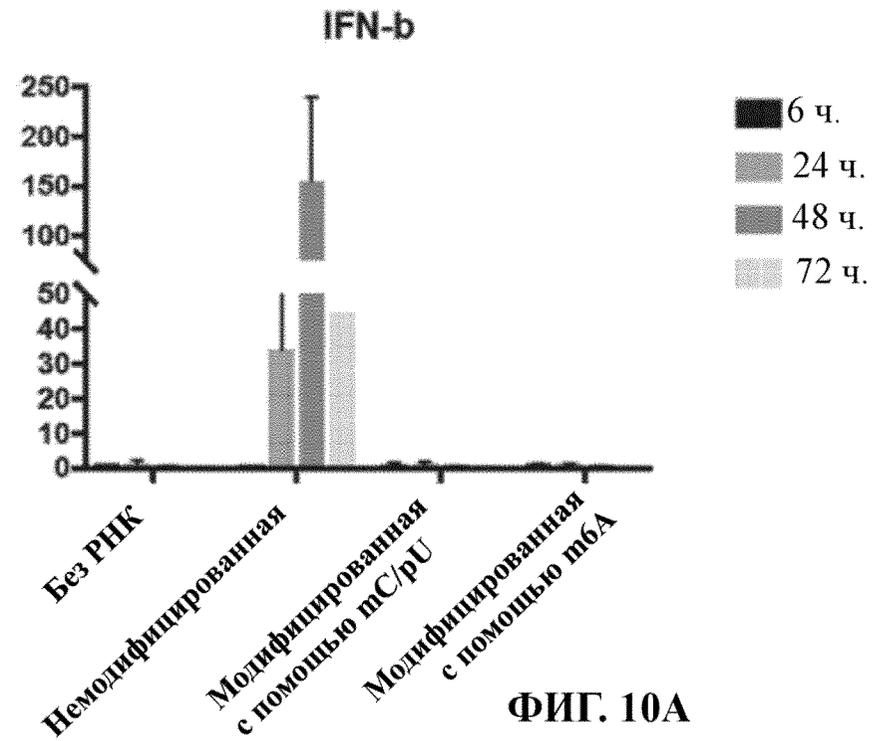
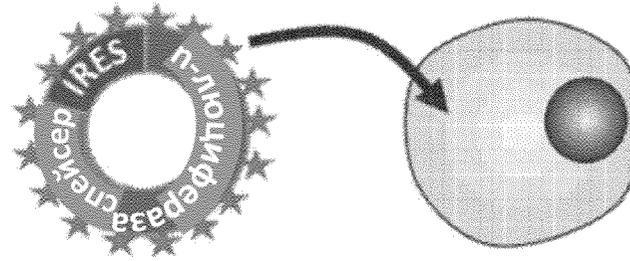


ФИГ. 9А

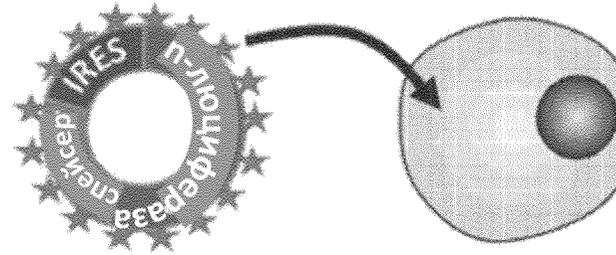


ФИГ. 9В

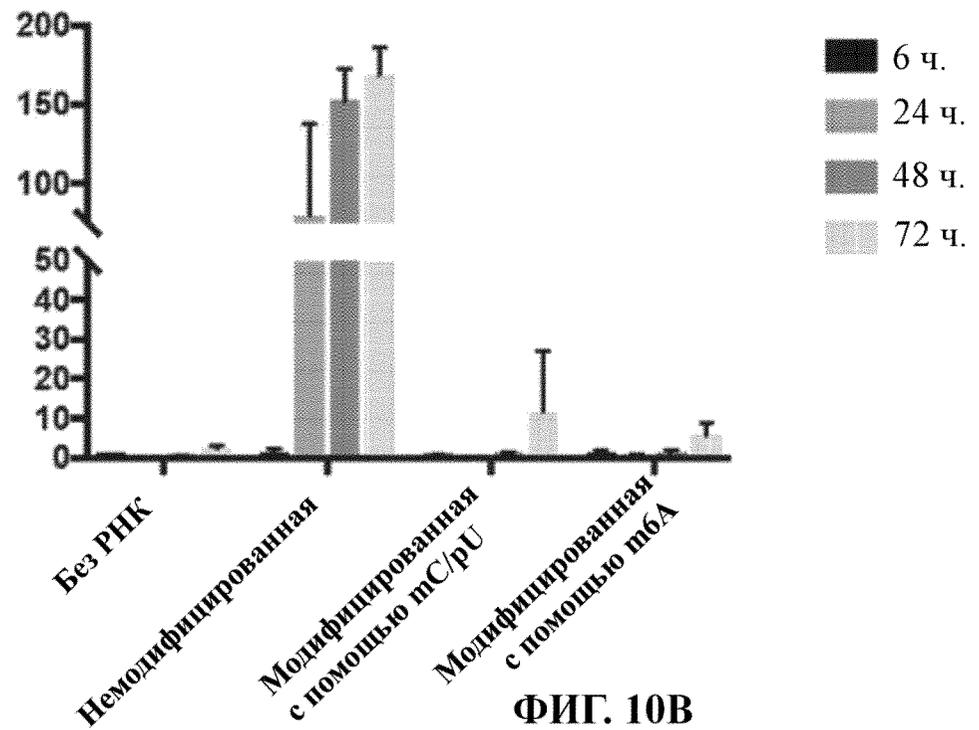




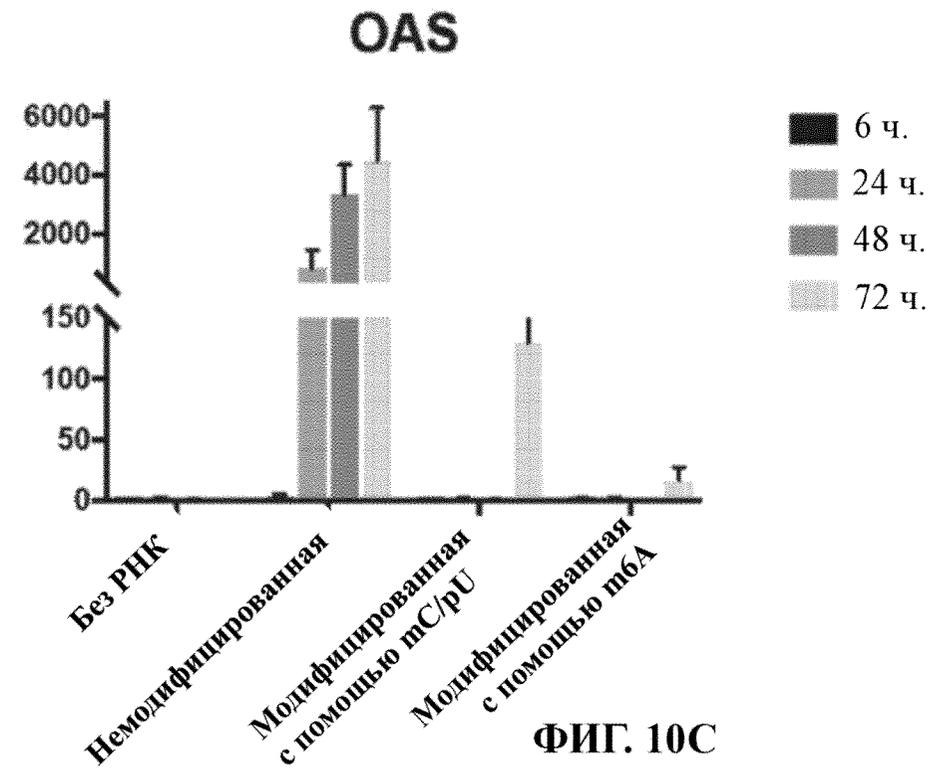
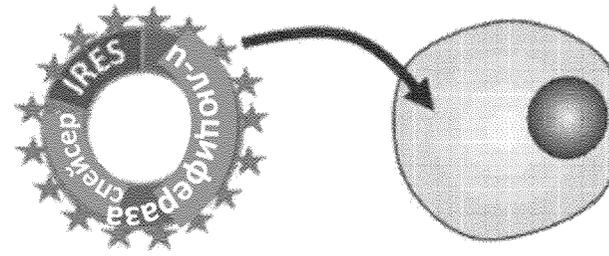
ФИГ. 10А



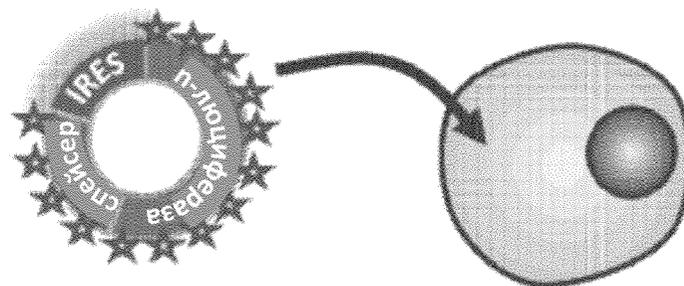
MDA5



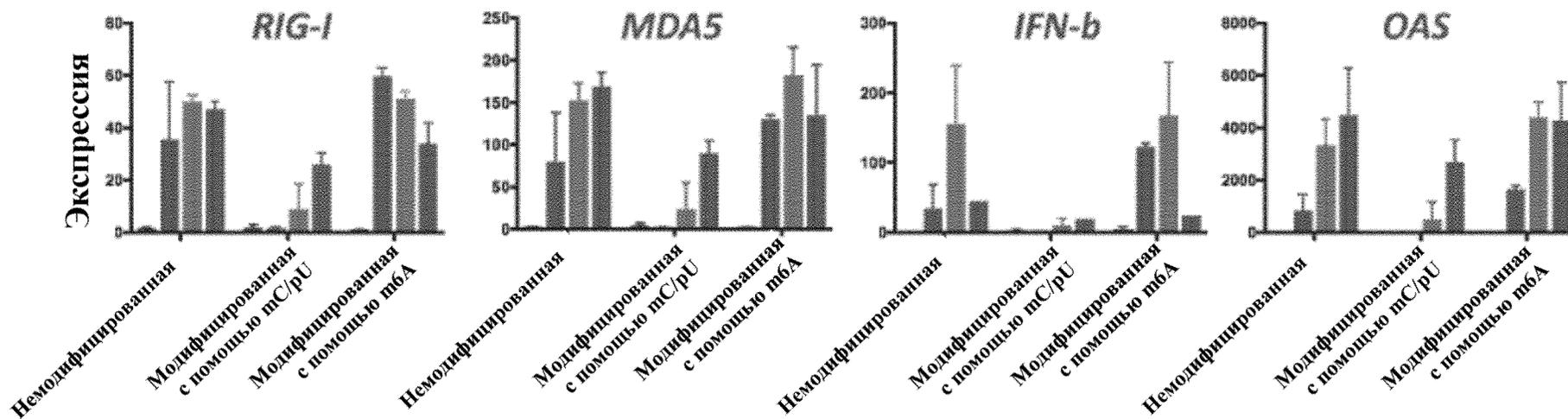
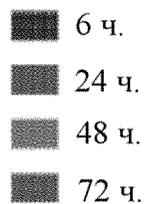
ФИГ. 10В



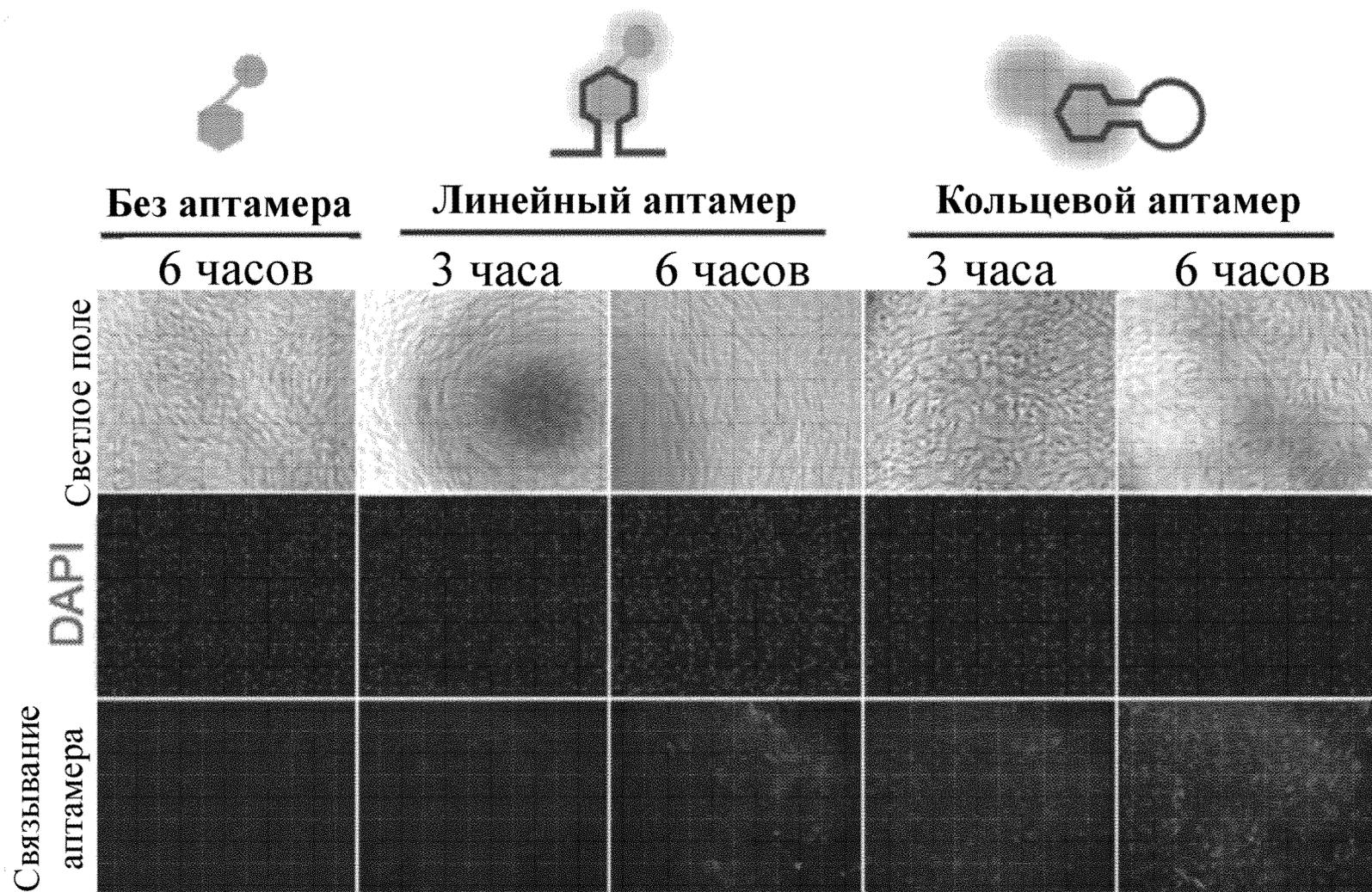
ФИГ. 10С



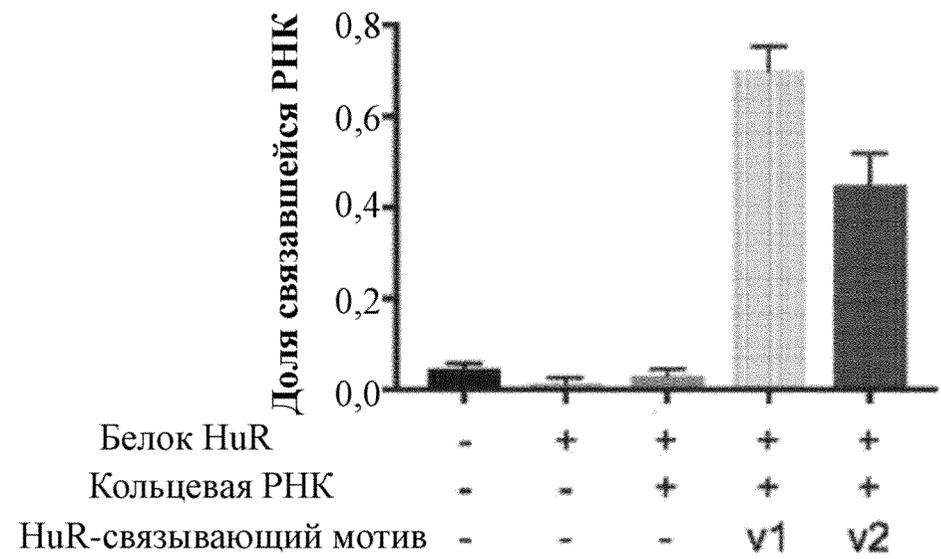
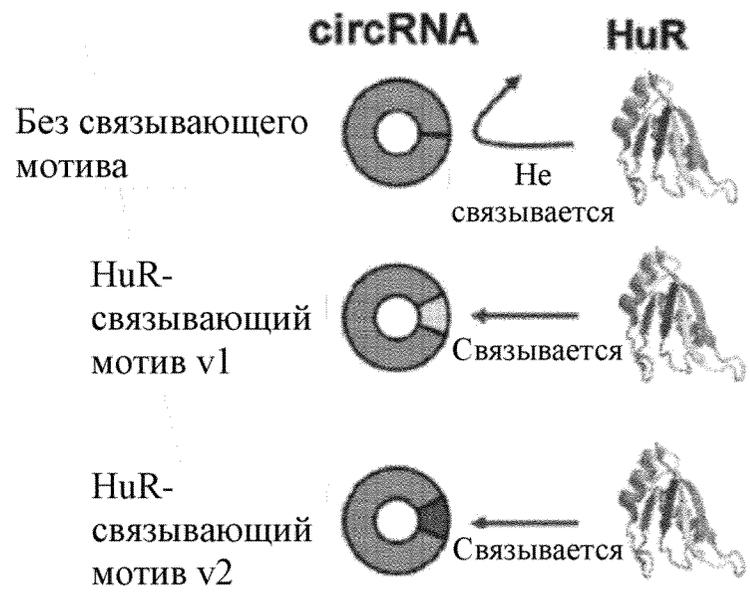
Измерение уровней экспрессии генов врожденного иммунного ответа в тканях (qPCR)



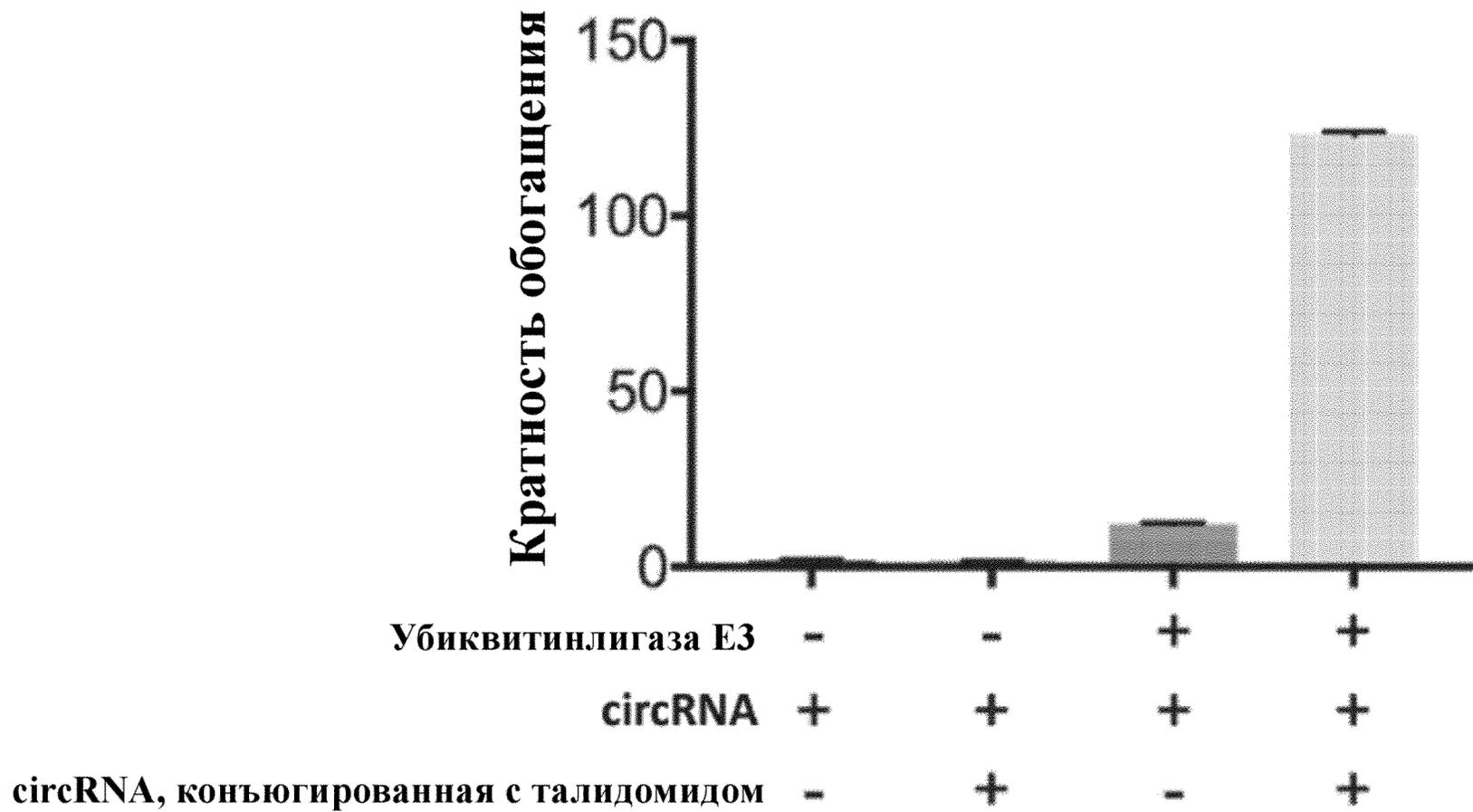
ФИГ. 11



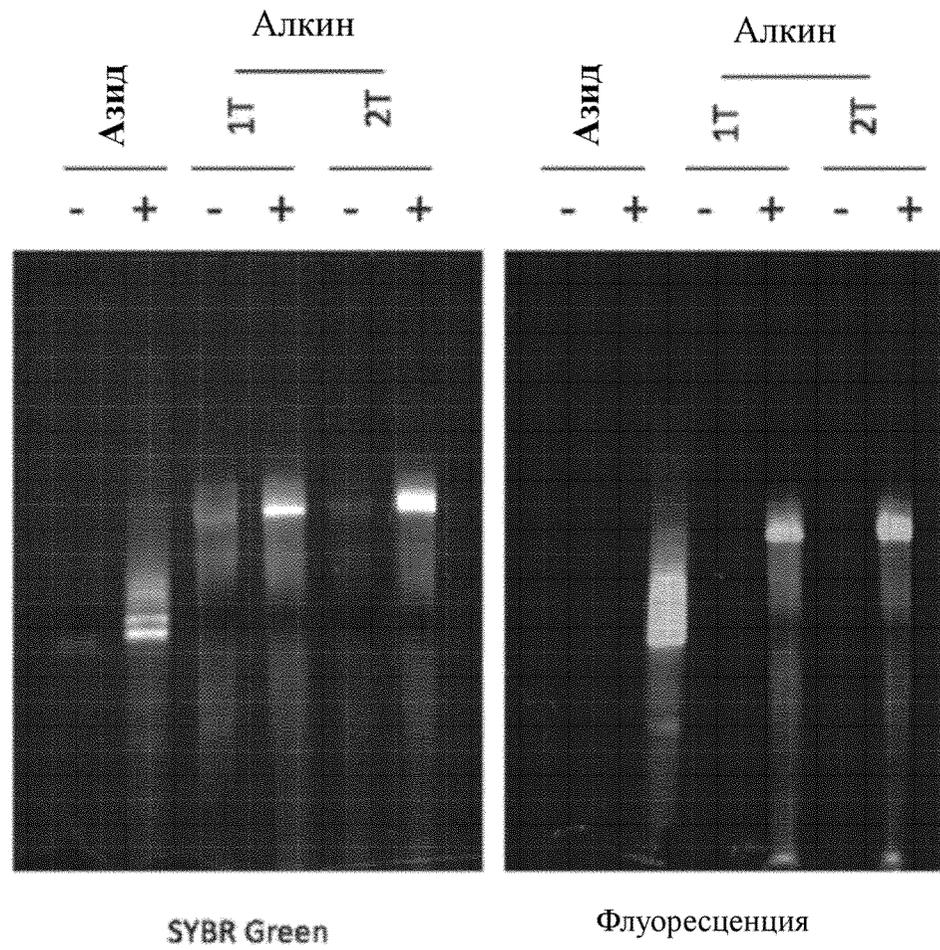
ФИГ. 12



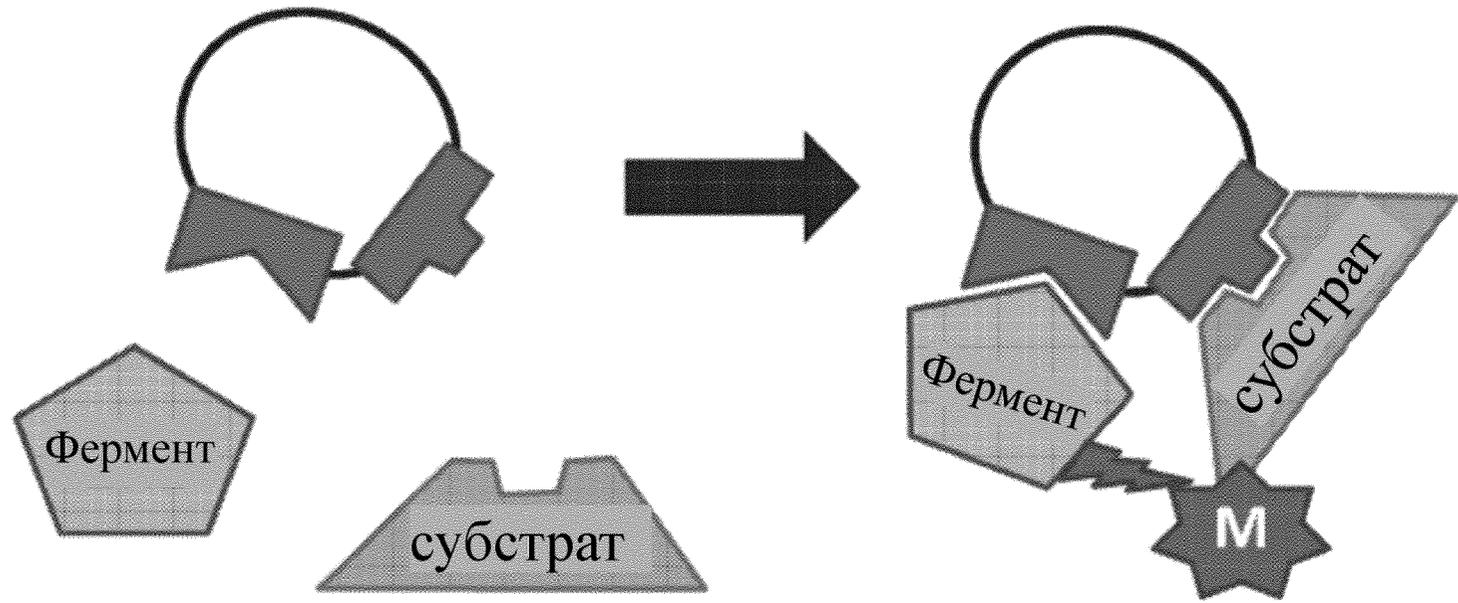
ФИГ. 13



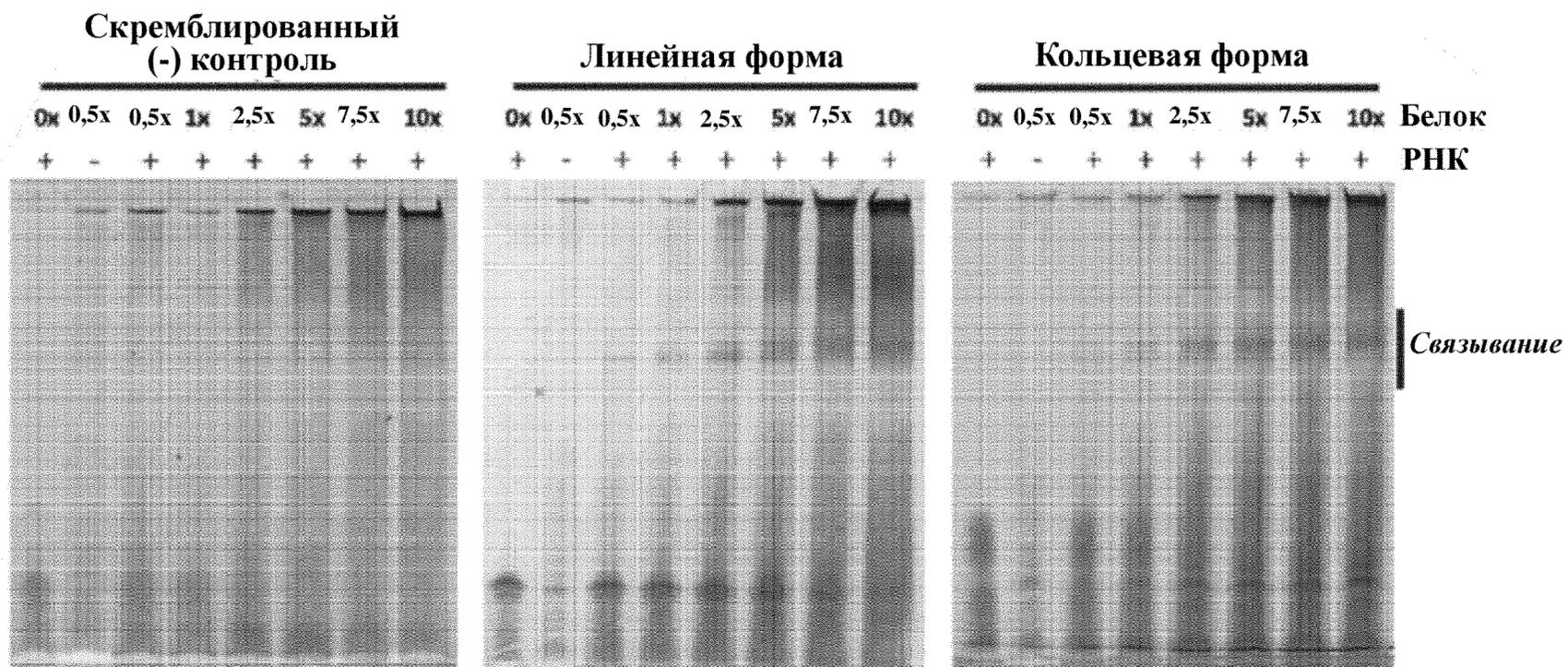
ФИГ. 14



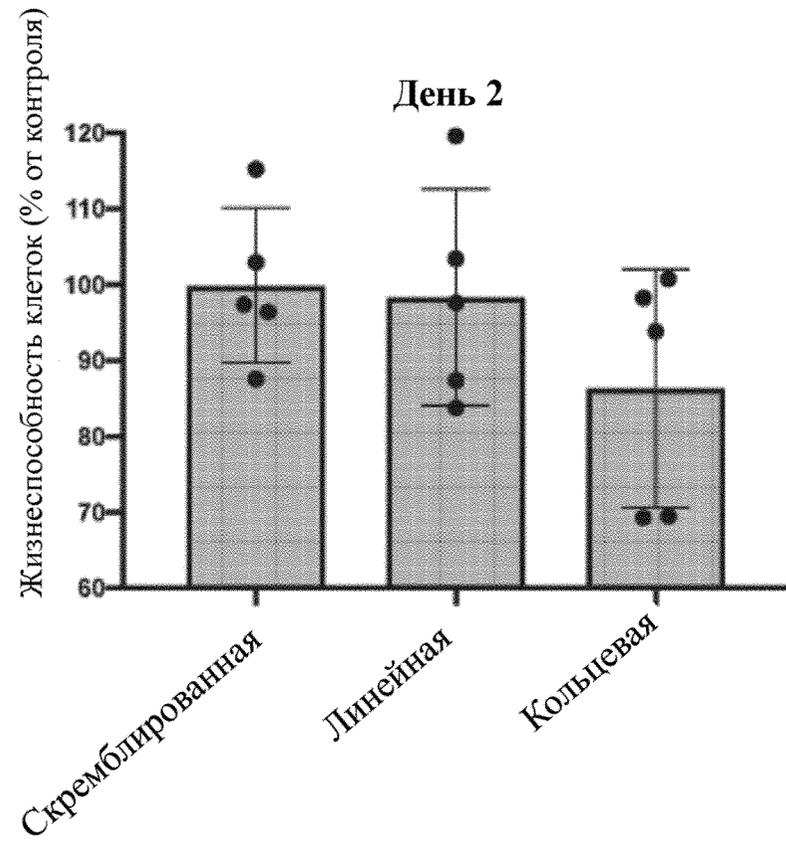
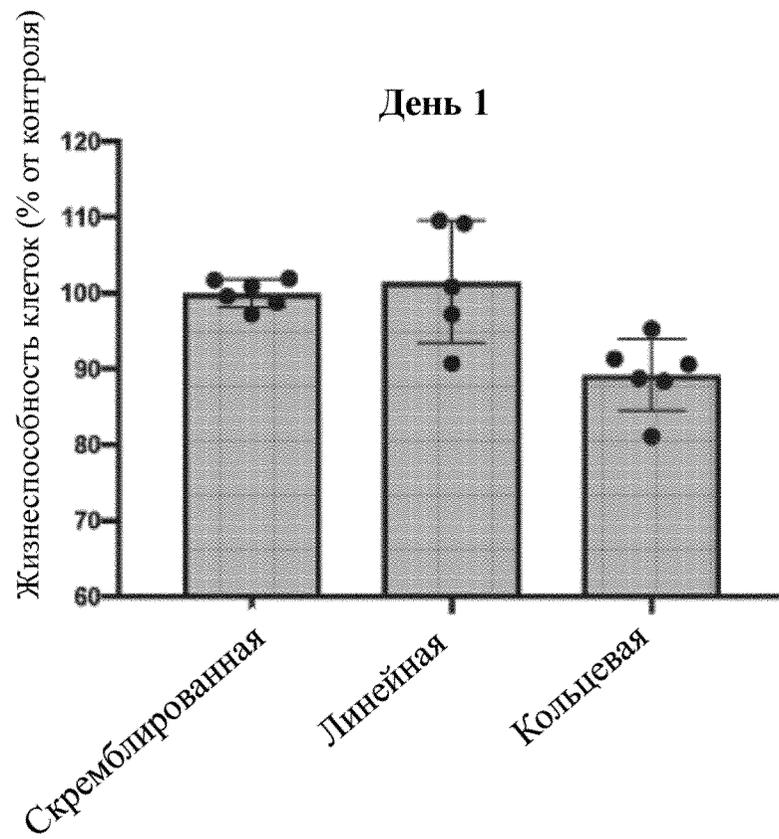
ФИГ. 15



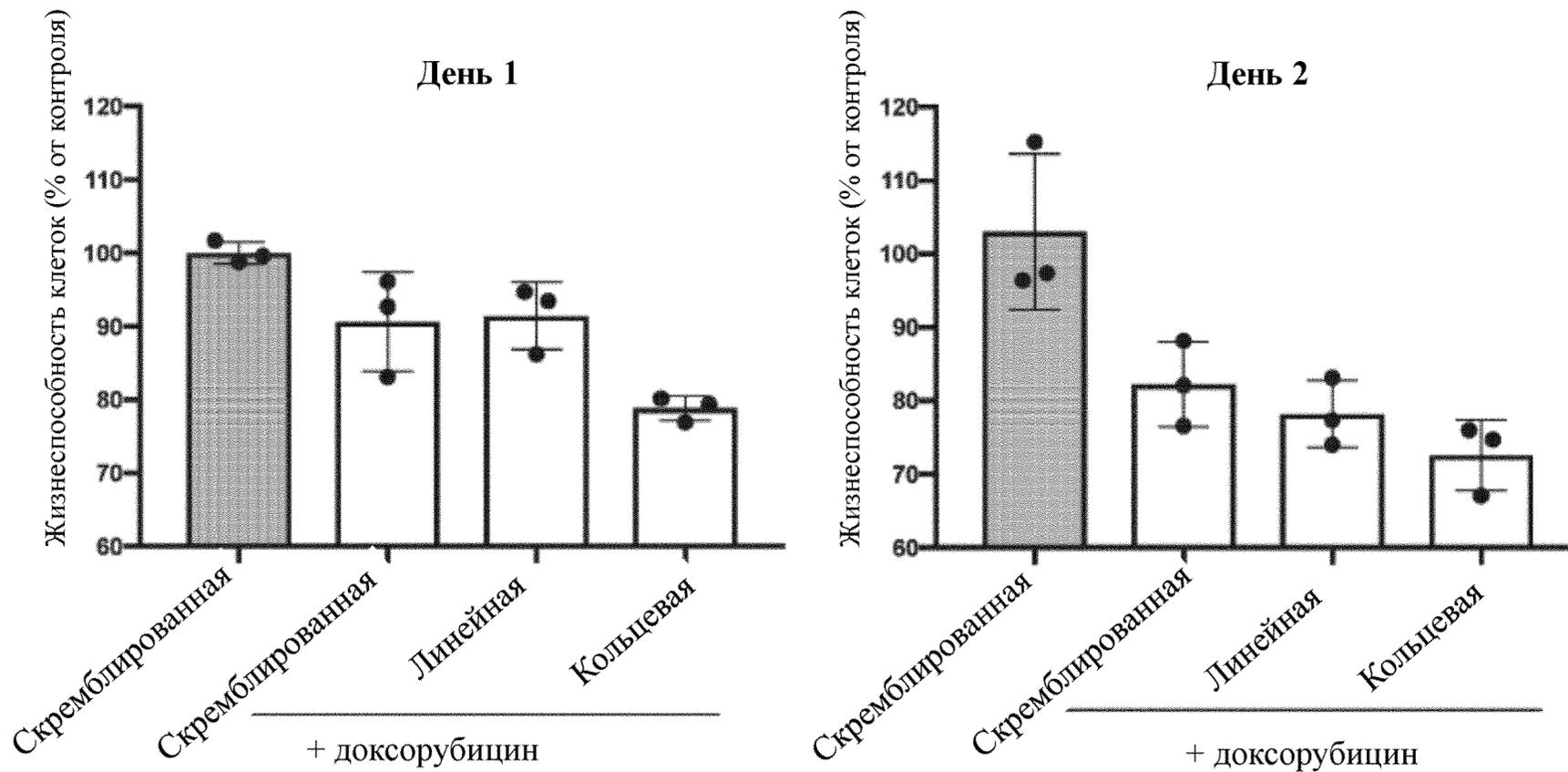
ФИГ. 16



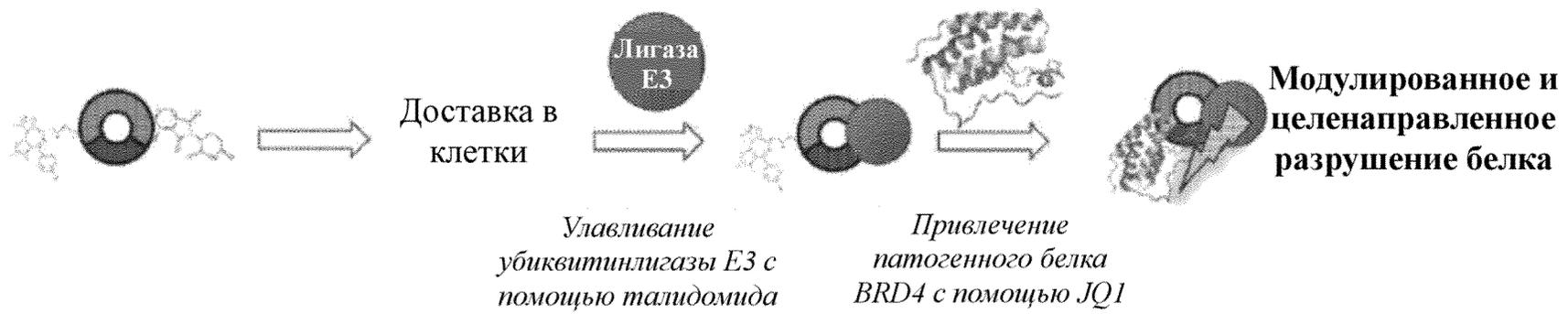
ФИГ. 17



ФИГ. 18

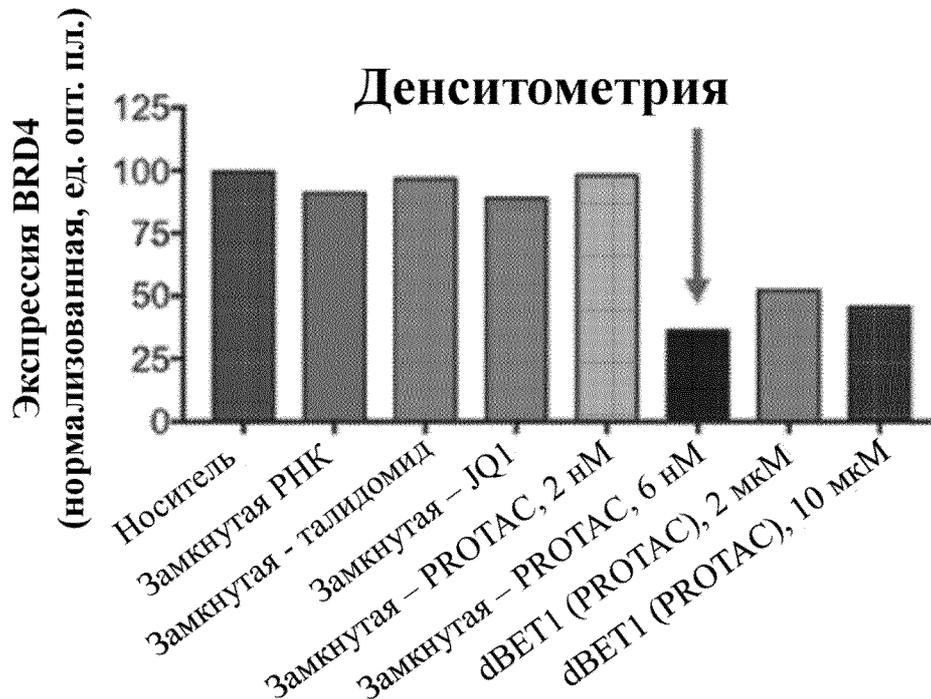
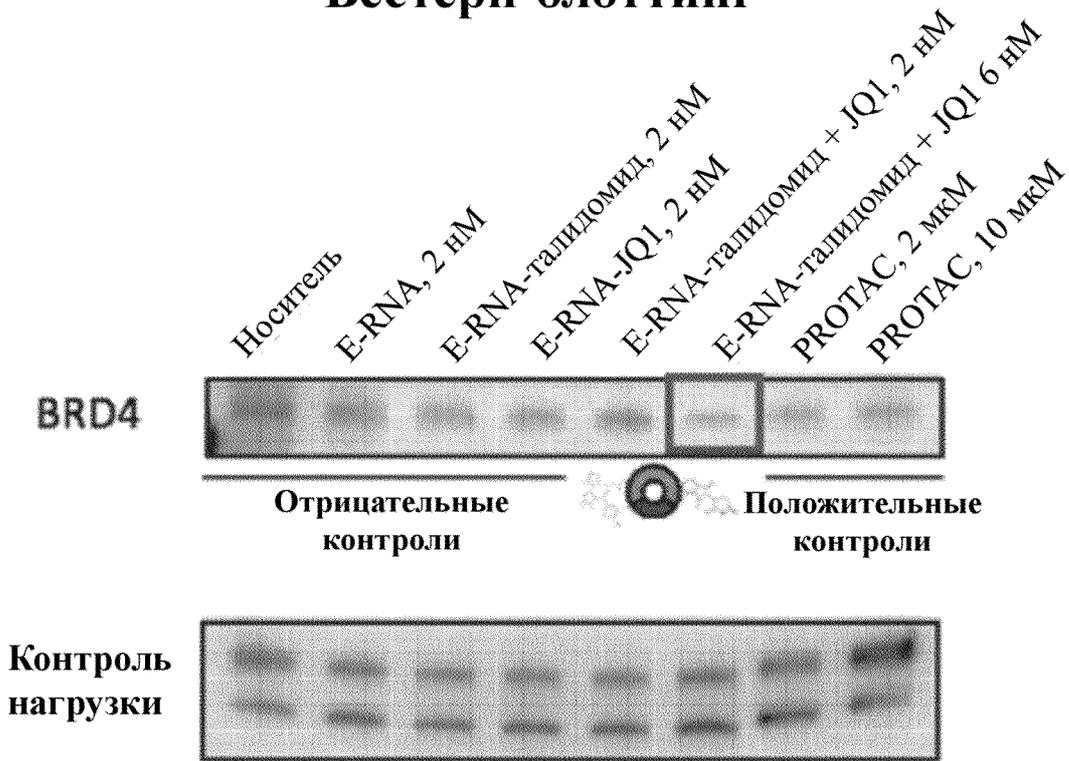


ФИГ. 19

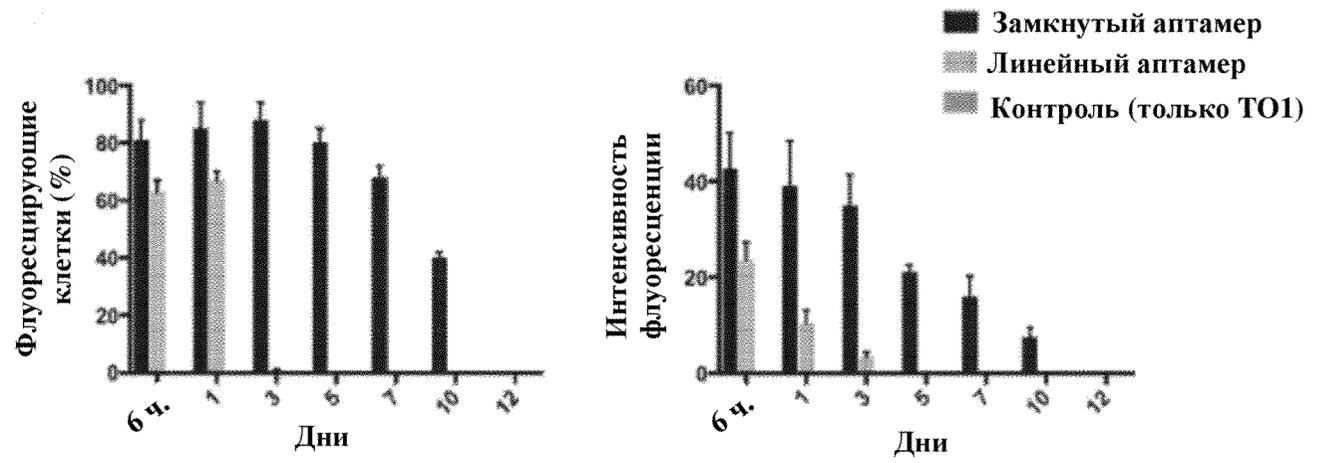
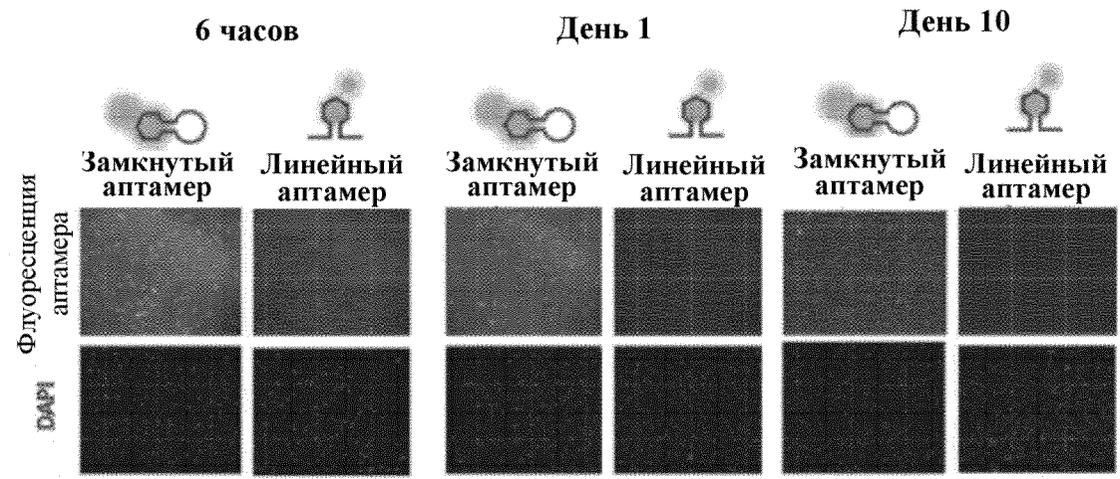


ФИГ. 20

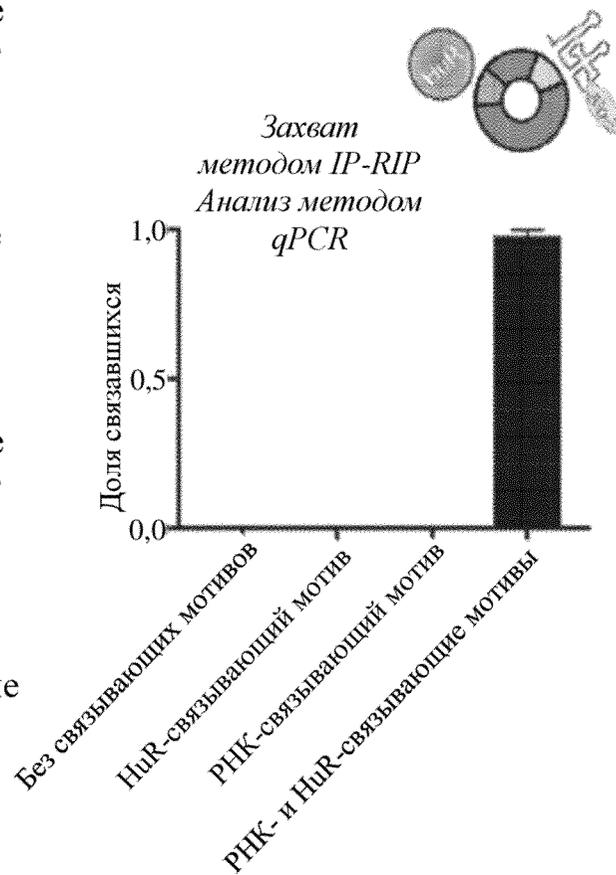
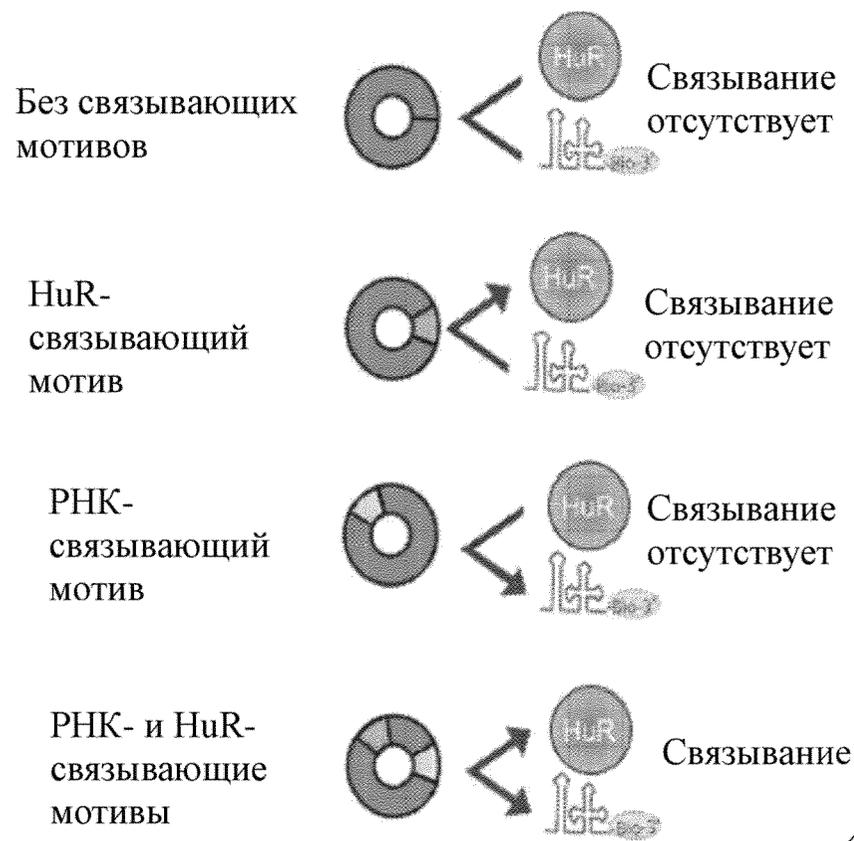
Вестерн-блоттинг



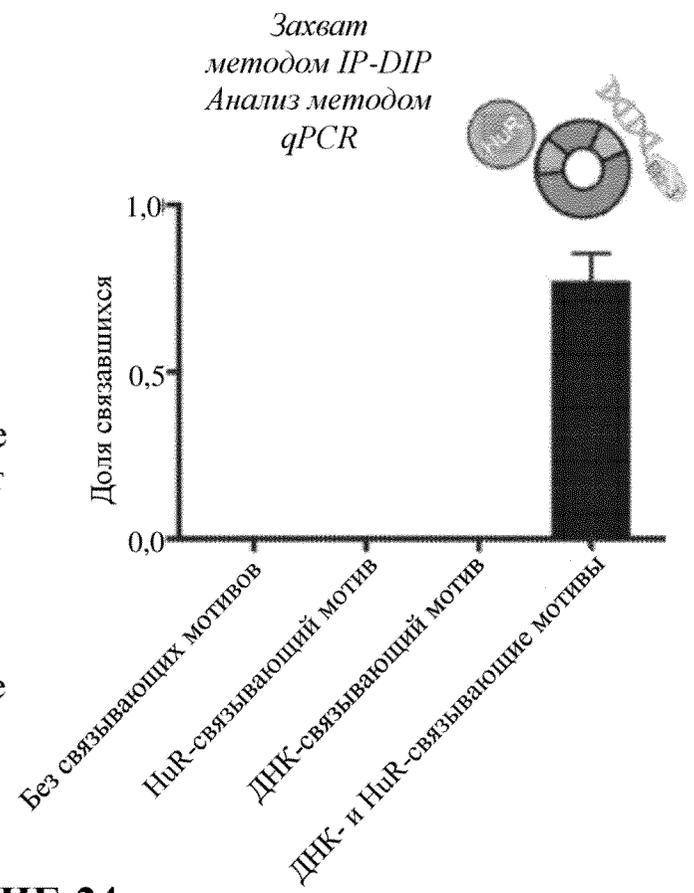
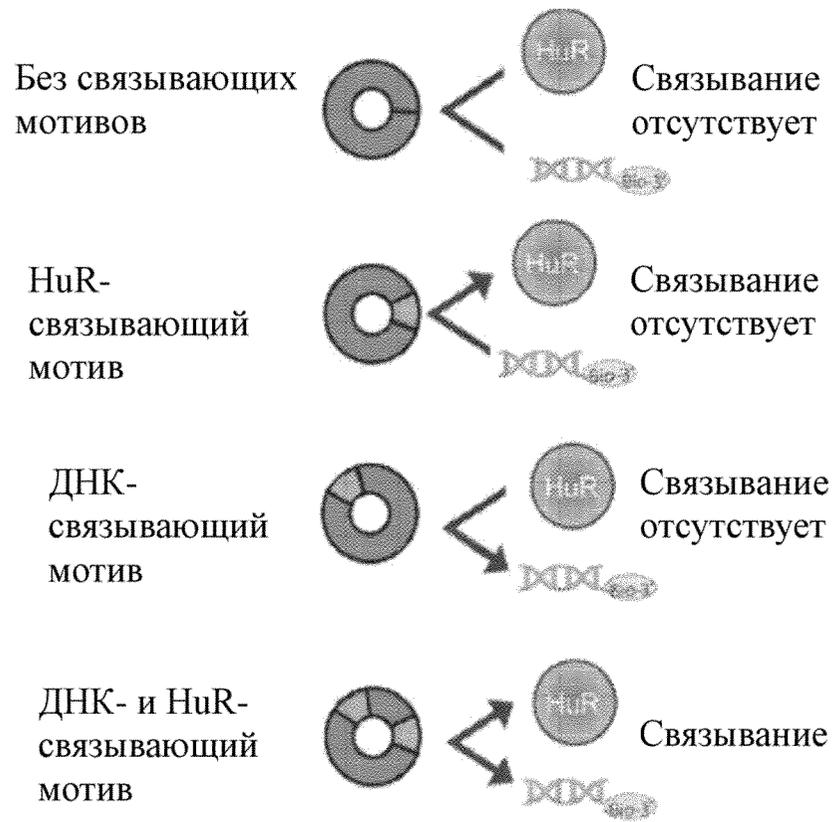
ФИГ. 21



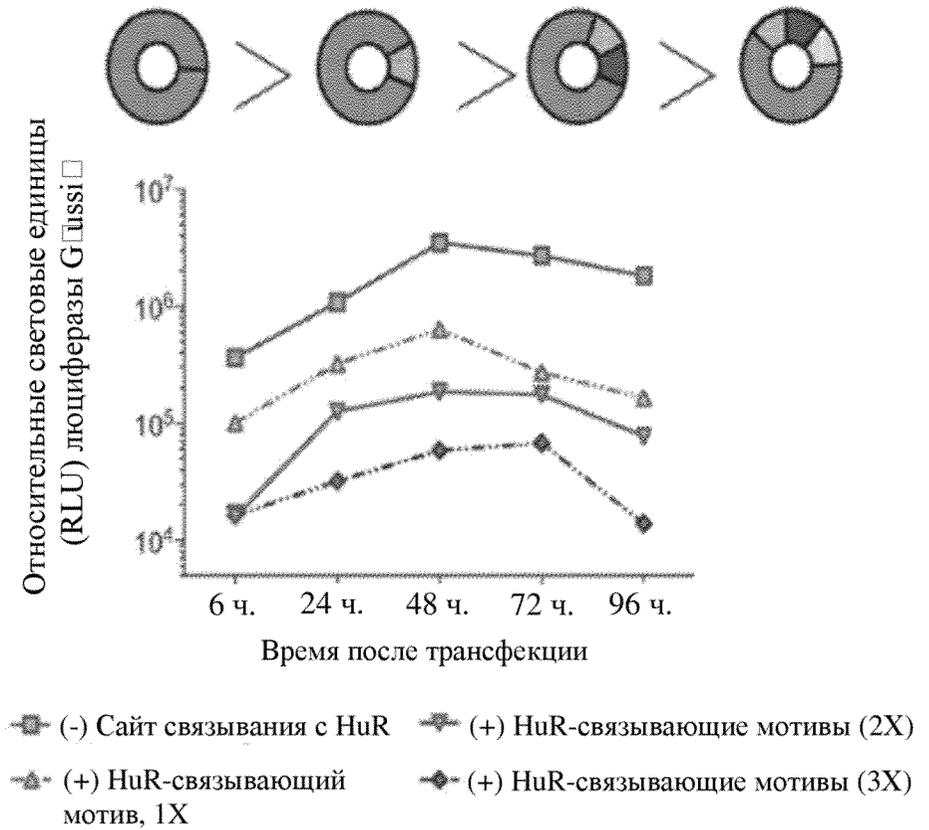
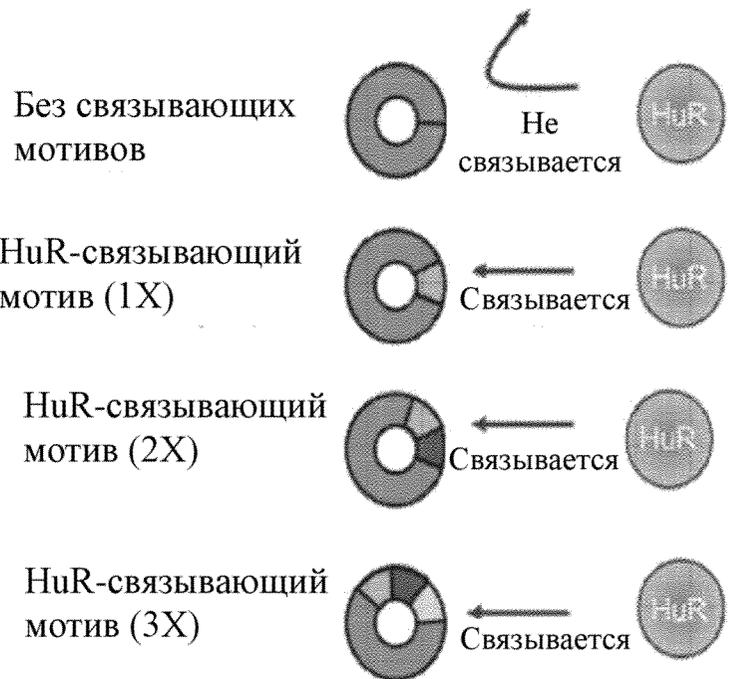
ФИГ. 22



ФИГ. 23



ФИГ. 24



ФИГ. 25