

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292676 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.20(51) Int. Cl. C07K 14/725 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.03.22

(54) КОМПОЗИЦИИ КОЛЬЦЕВОЙ РНК И СПОСОБЫ

(31) 62/992,518

(72) Изобретатель:

(32) 2020.03.20

Вессельхофт Роберт Александр,
Гудман Брайан (US)

(33) US

(86) PCT/US2021/023540

(74) Представитель:

(87) WO 2021/189059 2021.09.23

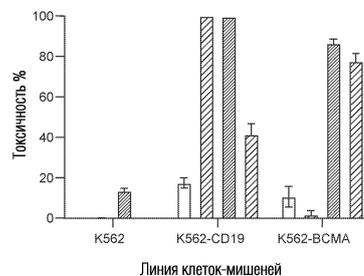
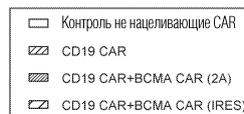
Медведев В.Н. (RU)

(88) 2021.11.11

(71) Заявитель:

ОРНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(57) В изобретении описана кольцевая РНК наряду с соответствующими композициями и способами. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК согласно изобретению содержит фрагменты интронов группы I после сплайсинга, спейсеры, IRES, необязательные образующие дуплексы области и более одной последовательности экспрессии. В некоторых вариантах осуществления последовательности экспрессии разделены одной или несколькими полинуклеотидными последовательностями, кодирующими сайт расщепления. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК согласно изобретению обладает улучшенной экспрессией, функциональной стабильностью, иммуногенностью, легким получением и/или временем полужизни по сравнению с линейной РНК. В некоторых вариантах осуществления согласно изобретению способы и конструкции приводят к повышению эффективности циркуляризации, эффективности сплайсинга и/или чистоте по сравнению с существующими подходами циркуляризации РНК.



A1

202292676

202292676

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575835EA/085

КОМПОЗИЦИИ КОЛЬЦЕВОЙ РНК И СПОСОБЫ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/992518, поданной 20 марта 2020 года, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0002] Традиционная генная терапия предусматривает использование ДНК для введения нужной генетической информации в клетки-хозяева. ДНК, введенная в клетку, обычно встраивается в определенной степени в геном одной или нескольких трансфицированных клеток, обеспечивая длительное действие введенного генетического материала у хозяина. Несмотря на то, что для таких устойчивых действий могут быть существенные преимущества, интеграция экзогенной ДНК в геном хозяина может также иметь много вредных последствий. Например, возможно, что введенная ДНК будет вставлена в интактный ген, что приведет к мутации, препятствующей или даже полностью устраняющей функцию эндогенного гена. Таким образом, генная терапия с помощью ДНК может приводить к нарушению жизненно важной генетической функции у получающего лечение хозяина, например, к элиминации или пагубному уменьшению выработки основного фермента или прерыванию гена, критического для регуляции клеточного роста, что приводит к нерегулируемой пролиферации или пролиферации раковых клеток. Кроме того, при обычной генной терапии на основе ДНК для эффективной экспрессии нужного генного продукта необходимо включать сильную промоторную последовательность, что опять же может привести к нежелательным изменениям в регуляции нормальной экспрессии генов в клетке. Также возможно, что генетический материал на основе ДНК приведет к индукции нежелательных антител против ДНК, что, в свою очередь, может вызвать фатальный иммунный ответ. Подходы генной терапии с использованием вирусных векторов также могут привести к неблагоприятному иммунному ответу. В некоторых случаях вирусный вектор может даже интегрироваться в геном хозяина. Кроме того, производство вирусных векторов клинического качества также дорого и требует много времени. Направленной доставкой введенного генетического материала с использованием вирусных векторов также трудно управлять. Таким образом, хотя генная терапия на основе ДНК была одобрена для доставки секретлируемых белков с использованием вирусных векторов (патент США № 6066626; публикация США № US 2004/0110709), эти подходы могут быть ограничены по этим различным причинам

[0003] В отличие от ДНК, использование РНК в качестве средства генной терапии значительно безопаснее, поскольку РНК не связана с риском стабильной интеграции в геном трансфицированной клетки, что устраняет опасения, что введенный генетический материал разрушит нормальное функционирование основного гена или вызовет мутацию,

которая приводит к вредным или онкогенным эффектам, а для эффективной трансляции кодируемого белка не требуются посторонние промоторные последовательности, что также позволяет избежать возможных вредных побочных эффектов. Кроме того, для выполнения своей функции мРНК не обязательно проникать в ядро, в то время как ДНК должна преодолеть этот главный барьер.

[0004] Кольцевая РНК применима для конструирования и получения стабильных форм РНК. Циркуляризация молекулы РНК дает преимущество в изучении структуры и функции РНК, особенно в случае молекул, склонных к сворачиванию в неактивной конформации (Wang and Ruffner, 1998). Кольцевая РНК также может быть особенно интересной и полезной для вариантов применения *in vivo*, особенно в области исследований основанного на РНК управления экспрессией генов и терапии, включая заместительную терапию белками и вакцинацию.

[0005] До настоящего изобретения существовало три основных метода получения кольцевой РНК *in vitro*: метод с использованием шунтов, метод с переставленными интроном и экзоном и метод с использованием РНК-лигазы. Однако существующие методы ограничены размером РНК, которая может быть циркуляризована, что ограничивает их терапевтическое применение.

Сущность настоящего изобретения

[0006] В данном документе описаны кольцевая РНК, наряду с соответствующими композициями и способами. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК согласно изобретению содержит фрагменты интронов группы I после сплайсинга, спейсеры, IRES, необязательные образующие дуплексы области и более одной последовательности экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК согласно изобретению содержит образующие дуплексы области. В некоторых вариантах осуществления последовательности экспрессии разделены одной или несколькими полинуклеотидными последовательностями, кодирующими сайт расщепления. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления представляет собой саморасщепляющийся пептид. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности экспрессии разделены элементом проскока рибосомы. В некоторых вариантах осуществления каждая последовательность экспрессии кодирует терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует цитокин или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует первую цепь Т-клеточного рецептора (TCR), а вторая последовательность экспрессии кодирует вторую цепь TCR. В

некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК согласно изобретению обладает улучшенной экспрессией, функциональной стабильностью, легким получением и/или временем полужизни по сравнению с линейной РНК. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК согласно изобретению обладает пониженной иммуногенностью. В некоторых вариантах осуществления согласно изобретению способы и конструкции приводят к повышению эффективности циркуляризации, эффективности сплайсинга и/или чистоте по сравнению с существующими подходами циркуляризации РНК.

[0007] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК содержит один или несколько участков связывания микроРНК. Участок связывания микроРНК распознается микроРНК, экспрессируемой в печени. В некоторых вариантах осуществления участок связывания микроРНК распознается miR-122.

[0008] В одном аспекте настоящей заявки представлен полинуклеотид кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, вторую последовательность экспрессии и 5'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга.

[0009] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления между первой последовательностью экспрессии и второй последовательностью экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления представляет собой саморасщепляющийся спейсер. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся спейсер представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A.

[0010] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК содержит второй IRES между первой последовательностью экспрессии и второй последовательностью экспрессии. В некоторых вариантах осуществления первый IRES состоит или содержит последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 1-72. В некоторых вариантах осуществления второй IRES состоит или содержит последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 1-72.

[0011] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует первый терапевтический белок, а вторая последовательность экспрессии кодирует второй терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует иммунную ингибирующую молекулу. В

последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B, HELIOS, Tbet, GATA3, RORgt и cd25.

[0015] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), а вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления цитокин выбирают из IL-2, IL-7, IL-12 и IL-15.

[0016] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B, HELIOS, Tbet, GATA3, RORgt и cd25. В некоторых вариантах осуществления цитокин выбирают из IL-10, IL-12 и TGFβ.

[0017] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует хемокин. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует хемокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B и HELIOS. В некоторых вариантах осуществления хемокин представляет собой CC хемокин, CXC хемокин, C хемокин или CX3C хемокин. В некоторых вариантах осуществления хемокин выбирают из CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL 1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2 и CX3CL1.

[0018] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует опухолевый антиген, а вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой неоантиген. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IFNγ.

[0019] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует CAR, а вторая последовательность экспрессии кодирует CAR.

[0020] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин, выбранный из IL-10, TGFβ и IL-35. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин,

выбранный из IFN γ , IL-2, IL-7, IL-15 и IL-18.

[0021] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR), и вторая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует хемокин, и вторая последовательность экспрессии кодирует хемокин. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует иммуносупрессивный фермент. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует ограничивающий скорость фермент, а вторая последовательность экспрессии кодирует ограничивающий поток фермент. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует ограничивающий поток фермент, а вторая последовательность экспрессии кодирует ограничивающий скорость фермент.

[0022] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует survival фактор. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует фактор выживания, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B, HELIOS, Tbet, GATA3, RORgt и cd25. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания выбирают из BCL-XL.

[0023] В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует белок теплового шока или комплекс. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует белок теплового шока или комплекс. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует белок теплового шока или комплекс, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления белок теплового шока или комплекс выбирают из Skp, Spy, FkpA, SurA, Hsp60, Hsp70, GroEL, GroES, Hsp90, HtpG, Hsp100, ClpA, ClpX, ClpP и Hsp104. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B, HELIOS, Tbet, GATA3, RORgt и cd25.

[0024] В некоторых вариантах осуществления одна или обе последовательности экспрессии кодируют сигнальный белок.

[0025] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует фермент, а вторая последовательность экспрессии кодирует отрицательный регуляторный ингибитор первой последовательности экспрессии. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует белок-отрицательный регуляторный ингибитор фермента, закодированного во второй последовательности экспрессии. В некоторых вариантах осуществления отрицательный регуляторный ингибитор выбирают из p57kip2, ингибитора VAX и TIPE2.

[0026] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность

экспрессии кодирует доминантно-негативный белок, а вторая последовательность экспрессии кодирует иммунный белок. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует иммунный белок, а вторая последовательность экспрессии кодирует доминантно-негативный белок. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует противовоспалительный белок.

[0027] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии способна преобразовывать 5-фторцитозин (5-FC) в 5-фторурацил (5-FU). В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии способна преобразовывать 5-фторцитозин (5-FC) в 5-фторурацил (5-FU), а вторая последовательность экспрессии представляет собой фактор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления последовательность экспрессии, способная преобразовывать 5-фторцитозин (5-FC) в 5-фторурацил (5-FU), представляет собой цитозиндезаминазу.

[0028] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК содержит первый спейсер между 5'-образующей дуплекс областью и 3'-фрагментом интрона группы I после сплайсинга и второй спейсер между 5'-фрагментом интрона группы I после сплайсинга и 3'-образующей дуплекс областью. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый имеет длину от приблизительно 10 до приблизительно 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину от приблизительно 9 до приблизительно 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления IRES имеет последовательность IRES из вируса синдрома Таура, вируса триатомы, вируса энцефаломиелита Тейлера, вируса обезьян 40, вируса *Solenopsis invicta* 1, вируса *Rhopalosiphum padi*, вируса ретикулэндотелиоза, полиовируса человека 1, кишечного вируса *Plautia stali*, вируса Kashmir bee, rhinovirus человека 2, вируса *Homalodisca coagulata* 1, вируса иммунодефицита человека 1 типа, вируса *Homalodisca coagulata* 1, вируса Himetobi P, вируса гепатита C, вируса гепатита A, вируса гепатита GB, вируса ящура, Enterovirus человека 71, вируса ринита лошадей, вируса наподобие Picornavirus Ectropпредставляет Obliqua, вируса Encephalomyocarditis, вируса дрозофилы C, вируса коксаки человека B3, tobamovirus крестоцветных, вируса паралича сверчков, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 1, вируса черной маточницы, вируса летального паралича тли, вируса птичьего энцефаломиелита, вируса острого паралича пчел, вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, вируса классической чумы свиней, FGF2 человека, SFTPA1 человека, AML1/RUNX1 человека, *Drosophila antennapedia*, AQP4 человека, AT1R человека, BAG-1 человека, BCL2 человека, BIP человека, c-IAP1 человека, c-myc человека, eIF4G человека, NDST4L мыши, LEF1 человека, HIF1 альфа мыши, p.myc человека, Gtx мыши, p27kip1 человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, *Drosophila gearp*, Собачий Scamper,

Ubx дрозофилы, UNR человека, UtrA мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, *Drosophila hairless*, *S. cerevisiae* TFIID, *S. cerevisiae* YAP1, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, Picobirnavirusa, HCV QC64, Cosavirus E/D человека, Cosavirus F человека, Cosavirus JMY человека, rhinovirus NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, salivirus A SH1, salivirus FHB, salivirusNG-J1, Parechovirus человека 1, Crohivirus B, Yc-3, Rosavirus M-7, Shanbavirus A, Pasivirus A, Pasivirus A 2, Echovirus E14, Parechovirus человека 5, вируса Aichi, вируса гепатита A HA16, Phopivirus, CVA10, Enterovirus C, Enterovirus D, Enterovirus J, Pegivirus человека 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, Pegivirus A 1220, Pasivirus A 3, Sapelovirus, Rosavirus B, вируса Bakunsa, Tremovirus A, Swine Pasivirus 1, PLV-CHN, Pasivirus A, Sicinivirus, Hepacivirus K, Hepacivirus A, BVDV1, вируса пограничной болезни, BVDV2, CSFV-PK15C, SF573 Dicistrovirus, вируса наподобие Picorna Hubei, CRPV, salivirus A BN5, salivirus A BN2, salivirus A 02394, salivirus A GUT, salivirus A CH, salivirus A SZ1, salivirus FHB, CVB3, CVB1, Echovirus 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 или аптамера eIF4G.

[0029] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК содержит природные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК состоит из природных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность экспрессии оптимизирована по кодонам.

[0030] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом, что в нем отсутствует по меньшей мере один участок связывания микроРНК, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом, что в нем отсутствует по меньшей мере один чувствительный к эндонуклеазе участок, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом, что в нем отсутствует по меньшей мере один чувствительный к редактированию РНК участок, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде.

[0031] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, причем полинуклеотид кольцевой РНК имеет длину от приблизительно 100 нуклеотидов до приблизительно 15 тысяч пар нуклеотидов.

[0032] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* у людей по меньшей мере приблизительно 20 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональное время полужизни по меньшей мере приблизительно 20 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет продолжительность терапевтического эффекта в клетке человека больше или равную продолжительности эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего такую

же последовательность экспрессии. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональное время полужизни в клетке человека больше или равное времени эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего такую же последовательность экспрессии. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* у людей больше продолжительности эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, имеющего такую же последовательность экспрессии. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональное время полужизни *in vivo* у людей больше времени эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, имеющего такую же последовательность экспрессии.

[0033] В еще одном аспекте в настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в данном документе, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей. В некоторых вариантах осуществления наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка, биоразлагаемую наночастицу, биоразлагаемую липидную наночастицу, полимерную наночастицу или биоразлагаемую полимерную наночастицу.

[0034] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует эндоцитоз, опосредованный рецептором, или прямое слияние с выбранными клетками выбранной популяции клеток или ткани в отсутствие выделения или очистки клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, полинуклеотидный аптамер, переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи или их фрагмент.

[0035] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит менее 1% по массе полинуклеотидов в композиции, которые представляют собой двухцепочечную РНК, шунты ДНК или трифосфорилированную РНК. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит менее 1% по массе полинуклеотидов и белков в фармацевтической композиции, которые представляют собой двухцепочечную РНК, шунты ДНК, трифосфорилированную РНК, протеинфосфатазы, протеинлигазы и кодирующие ферменты.

[0036] В еще одном аспекте в настоящей заявке представлен способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в данном документе, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

[0037] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует эндоцитоз, опосредованный

рецептором, избирательно в клетки выбранной популяции клеток в отсутствие выделения или очистки клеток. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка или биоразлагаемую наночастицу.

[0038] В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит один или несколько катионных липидов, ионизируемых липидов или сложных поли β -аминоэфиров. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит один или несколько некаатионных липидов. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит один или несколько PEG-модифицированных липидов, липидов полиглутаминовой кислоты или липидов гиалуроновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит холестерин. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит арахидоновую кислоту или олеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит более одного полинуклеотида кольцевой РНК.

[0039] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак, выбранный из группы, состоящей из острого лимфоцитарного лейкоза; острого миелоидного лейкоза (AML); альвеолярной рабдомиосаркомы; В-клеточных злокачественных новообразований; рака мочевого пузыря (например карциномы мочевого пузыря); рака кости; рака головного мозга (например медуллобластомы); рака молочной железы; рака ануса, анального канала или аноректума; рака глаза; рака внутривенных желчных протоков; рака суставов; рака шеи; рака желчного пузыря; рака плевры; рака носа, полости носа или среднего уха; рака ротовой полости; рака вульвы; хронического лимфоцитарного лейкоза; хронического миелоидного рака; рака толстой кишки; рака пищевода, рака шейки матки; фибросаркомы; карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта; рака головы и шеи (например плоскоклеточной карциномы головы и шеи); лимфомы Ходжкина; рака гортаноглотки; рака почки; рака гортани; лейкоза; жидких опухолей; рака печени; рака легкого (например немелкоклеточной карциномы легкого и аденокарциномы легкого); лимфомы; мезотелиомы; мастоцитомы; меланомы; множественной миеломы; рака носоглотки; неходжкинской лимфомы; В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза; волосатоклеточного лейкоза; острого лимфоцитарного лейкоза (ALL); лимфомы Беркитта; рака яичников; рака поджелудочной железы; рака брюшины; рака сальника; рака брыжейки; рака глотки; рака простаты; рака прямой кишки; рака почки; рака кожи; рака тонкой кишки; рака мягких тканей; солидных опухолей; синовиальной саркомы; рака желудка; рака яичек; рака щитовидной железы; и рака мочеочника. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется аутоиммунное заболевание, выбранное из склеродермии, болезни Грейвса, болезни Крона, болезни Сьергена, рассеянного склероза, болезни Хашимото, псориаза, миастении гравис, синдромов аутоиммунной полиэндокринопатии, сахарного диабета I типа (T1DM), аутоиммунного гастрита, аутоиммунного увеоретинита, полимиозита, колита, тиреоидита и генерализованных

аутоиммунных заболеваний, типичным примером которых является волчанка.

[0040] В еще одном аспекте в настоящей заявке представлен вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, вторую последовательность экспрессии, 5'-фрагмент интрона группы I и 3'-образующую дуплекс область.

[0041] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления между первой последовательностью экспрессии и второй последовательностью экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления представляет собой саморасщепляющийся спейсер. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся спейсер представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A.

[0042] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первый спейсер между 5'-образующей дуплекс областью и 3'-фрагментом интрона группы I и второй спейсер между 5'-фрагментом интрона группы I и 3'-образующей дуплекс областью. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый имеет длину от приблизительно 5 до приблизительно 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый содержит неструктурированную область длиной по меньшей мере 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый содержит структурированную область длиной по меньшей мере 7 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину от приблизительно 9 до 50 нуклеотидов.

[0043] В некоторых вариантах осуществления вектор оптимизирован по кодонам. В некоторых вариантах осуществления в векторе отсутствует по меньшей мере один участок связывания микроРНК, присутствующий в эквивалентном полинуклеотиде до оптимизации.

[0044] В еще одном аспекте в настоящей заявке представлена эукариотическая клетка, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой человеческую клетку. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой Т клетку.

[0045] В аспекте данного документа представлен полинуклеотид кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, вторую последовательность экспрессии и 5'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга. В аспекте данного документа представлен полинуклеотид кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга, первый сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, второй

IRES, вторую последовательность экспрессии и 5'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии и вторая последовательность экспрессии кодируют разные терапевтические белки. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии и вторая последовательность экспрессии кодируют один и тот же терапевтический белок.

[0046] В аспекте данного документа представлен полинуклеотид кольцевой РНК, полученный в результате транскрипции вектора, содержащий в следующем порядке необязательную 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), последовательность экспрессии, полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, вторую последовательность экспрессии, 5'-фрагмент интрона группы I и необязательную 3'-образующую дуплекс область. В аспекте данного документа представлен полинуклеотид кольцевой РНК, полученный в результате транскрипции вектора, содержащий в следующем порядке необязательную 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, первый сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), последовательность экспрессии, второй IRES, вторую последовательность экспрессии, 5'-фрагмент интрона группы I и необязательную 3'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК или вектор, представленный в данном документе, содержит 3'-и 5' образующие дуплексы области.

[0047] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК содержит первый спейсер между 5'-образующей дуплекс областью и 3'-фрагментом интрона группы I после сплайсинга и второй спейсер между 5'-фрагментом интрона группы I после сплайсинга и 3'-образующей дуплекс областью. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый имеет длину от приблизительно 10 до приблизительно 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину от приблизительно 9 до приблизительно 19 нуклеотидов. В некоторых других вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов.

[0048] В некоторых вариантах осуществления IRES, выбранный из таблицы 17, имеет последовательность IRES или представляет собой ее функциональный фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления IRES имеет последовательность IRES из вируса синдрома Таура, вируса триатомы, вируса энцефаломиелиита Тейлера, вируса обезьян 40, вируса *Solenopsis invicta* 1, вируса *Rhopalosiphum padi*, вируса ретикулоэндотелиоза, полиовируса человека 1, кишечного вируса *Plautia stali*, вируса Kashmir bee, rhinovirus человека 2, вируса *Homalodisca coagulata* 1, вируса иммунодефицита человека 1 типа, вируса *Homalodisca coagulata* 1, вируса Himetobi P, вируса гепатита C, вируса гепатита A, вируса гепатита GB, вируса ящура, Enterovirus человека 71, вируса ринита лошадей, вируса наподобие Picornavirus Ectroprepresents Obliqua, вируса Encephalomyocarditis, вируса дрозофилы C, вируса коксаки человека B3, tobamovirus

крестоцветных, вируса паралича сверчков, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 1, вируса черной маточницы, вируса летального паралича тли, вируса птичьего энцефаломиеелита, вируса острого паралича пчел, вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, вируса классической чумы свиней, FGF2 человека, SFTPA1 человека, AML1/RUNX1 человека, *Drosophila antennapedia*, AQP4 человека, AT1R человека, BAG-1 человека, BCL2 человека, BiP человека, c-IAP1 человека, c-мус человека, eIF4G человека, NDST4L мыши, LEF1 человека, HIF1 альфа мыши, n.мус человека, Gtx мыши, p27kipl человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, *Drosophila reaper*, Собачий Scamper, Ubx дрозофилы, UNR человека, UtrA мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, *Drosophila hairless*, *S. cerevisiae* TFIID, *S. cerevisiae* YAP1, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, Picobirnavirus, HCV QC64, Cosavirus E/D человека, Cosavirus F человека, Cosavirus JMY человека, rhinovirus NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, salivirus A SH1, salivirus FHB, salivirusNG-J1, Parechovirus человека 1, Crohivirus B, Yc-3, Rosavirus M-7, Shanbavirus A, Pasivirus A, Pasivirus A 2, Echovirus E14, Parechovirus человека 5, вируса Aichi, вируса гепатита A HA16, Phopivirus, CVA10, Enterovirus C, Enterovirus D, Enterovirus J, Pegivirus человека 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, Pegivirus A 1220, Pasivirus A 3, Sapelovirus, Rosavirus B, вируса Bakunsa, Tremovirus A, Swine Pasivirus 1, PLV-CHN, Pasivirus A, Sicinivirus, Hepacivirus K, Hepacivirus A, BVDV1, вируса пограничной болезни, BVDV2, CSFV-PK15C, SF573 Dicrostovirus, вируса наподобие Picorna Hubei, CRPV, salivirus A BN5, salivirus A BN2, salivirus A 02394, salivirus A GUT, salivirus A CH, salivirus A SZ1, salivirus FHB, CVB3, CVB1, Echovirus 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 или аптамера eIF4G.

[0049] В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности polyA каждая имеет длину 15-50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности polyA каждая имеет длину от приблизительно 20-25 нуклеотидов.

[0050] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК состоит из природных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК содержит по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% природных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность экспрессии оптимизирована по кодонам. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом, что в нем отсутствует по меньшей мере один участок связывания микроРНК, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом, что в нем отсутствует по меньшей мере один чувствительный к эндонуклеазе участок, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом,

что в нем отсутствует по меньшей мере один чувствительный к редактированию РНК участок, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде.

[0051] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет длину от приблизительно 100 нуклеотидов до приблизительно 15 тысяч пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК согласно настоящему раскрытию имеет продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* у людей по меньшей мере приблизительно 20 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональное время полужизни по меньшей мере приблизительно 20 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет продолжительность терапевтического эффекта в клетке человека больше или равную продолжительности эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего такие же последовательности экспрессии. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональное время полужизни в клетке человека больше или равное времени эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего такие же последовательности экспрессии. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональное время полужизни *in vivo* у людей больше времени эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, имеющего такие же последовательности экспрессии. В некоторых вариантах осуществления эталонный полинуклеотид линейной РНК представляет собой линейную, немодифицированную или с модифицированными нуклеозидами, полностью процессированную мРНК, содержащую структуру кэп и хвост polyA длиной по меньшей мере 80 нуклеотидов.

[0052] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет функциональное время полужизни в клетке человека больше или равное заданному пороговому значению. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет функциональное время полужизни *in vivo* у людей больше времени заданного порогового значения. В некоторых вариантах осуществления анализ функционального белка представляет собой анализ люциферазы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления анализ функционального белка включает измерение уровней белка, закодированного последовательностью экспрессии полинуклеотида кольцевой РНК, в образце ткани или сыворотки пациента. В некоторых вариантах осуществления заданным пороговым значением является функциональное время полужизни эталонного полинуклеотида линейной РНК, содержащего такую же последовательность экспрессии, как полинуклеотид кольцевой РНК. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет функциональное время полужизни по меньшей мере приблизительно 20 часов.

[0053] В аспекте данного документа представлена фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей. В некоторых вариантах

осуществления наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка, биоразлагаемую наночастицу, биоразлагаемую липидную наночастицу, полимерную наночастицу или биоразлагаемую полимерную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит один или несколько катионных липидов, выбранных из группы C12-200, MC3, DLinDMA, DLinkC2DMA, cKK-E12, ICE (на основе имидазола), HGT5000, HGT5001, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA и DMDMA, DODAC, DLenDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, HGT4003 и их комбинаций.

[0054] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует эндоцитоз, опосредованный рецептором, или прямое слияние с выбранными клетками выбранной популяции клеток или ткани в отсутствие выделения или очистки клеток. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, полинуклеотидный аптамер, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК присутствует в количестве, эффективном для лечения аутоиммунного заболевания или рака у нуждающегося в этом субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет профиль повышенной безопасности по сравнению с фармацевтической композицией, содержащей векторы, содержащие экзогенную ДНК, кодирующую такие же последовательности экспрессии.

[0055] В некоторых вариантах осуществления менее 1% по массе полинуклеотидов в композиции представляют собой двухцепочечную РНК, шунты ДНК или трифосфорилированную РНК. В некоторых вариантах осуществления менее 1% по массе полинуклеотидов и белков в фармацевтической композиции представляют собой двухцепочечную РНК, шунты ДНК, трифосфорилированную РНК, протеинфосфатазы, протеинлигазы и кодирующие ферменты.

[0056] В аспекте данного документа представлен способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется аутоиммунное заболевание или рак.

[0057] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует эндоцитоз, опосредованный рецептором, в выбранные клетки выбранной популяции клеток в отсутствие выделения или очистки клеток.

[0058] В некоторых вариантах осуществления наночастица представляет собой

липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка или биоразлагаемую наночастицу. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит один или несколько катионных липидов, ионизируемых липидов или сложных полиβ-аминоэфиров. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит один или несколько некатионных липидов. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит один или несколько PEG-модифицированных липидов, липидов полиглутаминовой кислоты, структурных липидов или липидов гиалуроновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит холестерин. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой бета-ситостерол. В некоторых вариантах осуществления структурный липид не является бета ситостеролом. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит арахидоновую кислоту или олеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления наночастица содержит более одного полинуклеотида кольцевой РНК.

[0059] В некоторых вариантах осуществления структурный липид связывается с C_{1q} и/или способствует связыванию переносчика, содержащего указанный липид, с C_{1q} по сравнению с контрольным переносчиком, в котором отсутствует структурный липид, и/или увеличивает поглощение связанного с C_{1q} переносчика иммунной клеткой по сравнению с контрольным переносчиком, в котором отсутствует структурный липид.

[0060] В некоторых вариантах осуществления PEG-модифицированный липид представляет собой DSPE-PEG, DMG-PEG или PEG-1. В некоторых вариантах осуществления PEG-модифицированный липид представляет собой DSPE-PEG(2000).

[0061] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит хелперный липид. В некоторых вариантах осуществления хелперный липид представляет собой DSPC или DOPE.

[0062] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит DOPE, холестерин и DSPE-PEG.

[0063] В некоторых вариантах осуществления переносчик содержит от приблизительно 0,5% до приблизительно 4% PEG-модифицированных липидов в молярном отношении. В некоторых вариантах осуществления переносчик содержит от приблизительно 1% до приблизительно 2% PEG-модифицированных липидов в молярном отношении.

[0064] В некоторых вариантах осуществления молярное отношение ионизируемый липид: DSPC: холестерин: DSPE-PEG(2000) составляет 62:4:33:1.

[0065] В некоторых вариантах осуществления переносчик содержит ионизируемый липид, DOPE, холестерин и DSPE-PEG(2000).

[0066] В некоторых вариантах осуществления молярное отношение ионизируемый липид: DSPC: холестерин: DSPE-PEG(2000) составляет 50:10:38,5:1,5.

[0067] В некоторых вариантах осуществления переносчик имеет отношение азот: фосфат (N:P) от приблизительно 3 до приблизительно 6.

[0068] В некоторых вариантах осуществления переносчик составлена для

эндосомального высвобождения полинуклеотида кольцевой РНК.

[0069] В некоторых вариантах осуществления переносчик способна связываться с АРОЕ. В некоторых вариантах осуществления переносчик взаимодействует с апополипротеином Е (АРОЕ) меньше, чем эквивалентная переносчик, нагруженная эталонной линейной РНК, имеющей такую же последовательность экспрессии, как полинуклеотид кольцевой РНК. В некоторых вариантах осуществления внешняя поверхность переносчика по существу не содержит участков связывания АРОЕ.

[0070] В некоторых вариантах осуществления переносчик имеет диаметр менее приблизительно 120 нм. В некоторых вариантах осуществления переносчик не образует агрегаты с диаметром более 300 нм.

[0071] В некоторых вариантах осуществления переносчик имеет диаметр менее приблизительно 120 нм. В некоторых вариантах осуществления переносчик не образует агрегаты с диаметром более 300 нм.

[0072] В некоторых вариантах осуществления переносчик имеет время полужизни *in vivo* менее приблизительно 30 часов.

[0073] В некоторых вариантах осуществления переносчик способна к зависимому от рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) поглощению в клетку. В некоторых вариантах осуществления переносчик способна к независимому от LDLR поглощению в клетку.

[0074] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит линейной РНК.

[0075] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит нацеливающий фрагмент, функционально связанный с переносчиком. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент специфически связывает антиген иммунной клетки или опосредованно. В некоторых вариантах осуществления антиген иммунной клетки представляет собой антиген Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген Т-клетки выбирают из группы, состоящей из CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD4, бета7 интегрин, бета2 интегрин и C_{1q}.

[0076] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит адаптерную молекулу, содержащую связывающий переносчик фрагмент и связывающий клетку фрагмент, причем нацеливающий фрагмент специфически связывает связывающий переносчик фрагмент, а связывающий клетку фрагмент специфически связывает антиген клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления антиген клетки-мишени представляет собой антиген иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген иммунной клетки представляет собой антиген Т-клетки, НК-клетку, НКТ-клетку, макрофаг или нейтрофил. В некоторых вариантах осуществления антиген Т-клетки выбирают из группы, состоящей из CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD4, бета7 интегрин, бета2 интегрин, CD25, CD39, CD73, рецептора A2a, рецептора A2b и C_{1q}. В некоторых вариантах осуществления антиген иммунной клетки представляет собой антиген макрофага. В некоторых вариантах осуществления антиген макрофага выбирают из группы,

состоящей из маннозного рецептора, CD206 и C_{1q}.

[0077] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления малая молекула связывается с эктоферментом на иммунной клетке, причем эктофермент выбирают из группы, состоящей из CD38, CD73, аденозинового рецептора 2a и аденозинового рецептора 2b. В некоторых вариантах осуществления малой молекулой является манноза, лектин, активин, биотин или дигоксигенин.

[0078] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой одноцепочечный Fv (scFv) фрагмент, нанотело, пептид, макроцикл на основе пептида, минитело, лиганд малой молекулы, такой как фолат, аргинилглицилспарагиновую кислоту (RGD) или растворимый в феноле пептид модулин альфа 1 (PSMA1), переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи или их фрагмент.

[0079] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет время полужизни в клеточной мембране менее приблизительно 2 недели. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет время полужизни в клеточной мембране менее приблизительно 1 недели. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет время полужизни в клеточной мембране менее приблизительно 30 часов. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет время полужизни в клеточной мембране меньше функционального времени полужизни полинуклеотида кольцевой РНК.

[0080] В еще одном аспекте в настоящей заявке представлен способ лечения или профилактики заболевания, расстройства или состояния, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание, расстройство или состояние связано с aberrантной экспрессией, активностью или локализацией полипептида, выбранного из таблиц 27 или 28. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК кодирует терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления экспрессия терапевтического белка в селезенке выше экспрессии терапевтического белка в печени. В некоторых вариантах осуществления экспрессия терапевтического белка в селезенке по меньшей мере приблизительно в 2,9 раза выше экспрессии терапевтического белка в печени. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок не экспрессируется на функциональном уровне в печени. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок не экспрессируется на обнаруживаемом уровне в печени. В некоторых вариантах осуществления экспрессия терапевтического белка в селезенке составляет по меньшей мере приблизительно 63% от общей экспрессии терапевтического белка.

[0081] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид линейной РНК содержит 3'-фрагмент интрона группы I anabaena и 5'-фрагмент интрона группы I anabaena. В некоторых вариантах осуществления эталонный полинуклеотид РНК содержит

эталонный 3'-фрагмент интрона группы I anabaena и эталонный 5'-фрагмент интрона группы I anabaena. В некоторых вариантах осуществления эталонный 3'-фрагмент интрона группы I anabaena и эталонный 5'-фрагмент интрона группы I anabaena получали с использованием сайта перестановки L6-5. В некоторых вариантах осуществления 3'-фрагмент интрона группы I anabaena и 5'-фрагмент интрона группы I anabaena получали не с использованием сайта перестановки L6-5. В некоторых вариантах осуществления 3'-фрагмент интрона группы I anabaena содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 112-123 и 125-150. В некоторых вариантах осуществления 5'-фрагмент интрона группы I anabaena содержит соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 73-84 и 86-111. В некоторых вариантах осуществления 5'-фрагмент интрона группы I anabaena содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 73-84 и 86-111. В некоторых вариантах осуществления 3'-фрагмент интрона группы I anabaena содержит или состоит из соответствующей последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 112-124 и 125-150.

[0082] В некоторых вариантах осуществления IRES содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 348-351. В некоторых вариантах осуществления эталонный IRES представляет собой CVB3. В некоторых вариантах осуществления IRES не представляет собой CVB3. В некоторых вариантах осуществления IRES содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-64 и 66-72.

[0083] В еще одном аспекте в настоящей заявке раскрыт полинуклеотид кольцевой РНК, полученный из линейной РНК, раскрытой в данном документе.

[0084] В еще одном аспекте в настоящей заявке раскрыта кольцевая РНК, содержащая, от 5' к 3', 3'-фрагмент интрона группы I, IRES, последовательность экспрессии и 5'-фрагмент интрона группы I, причем IRES содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 348-351.

[0085] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК дополнительно содержит спейсер между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES.

[0086] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК дополнительно содержит первую и вторую образующие дуплексы области, способные образовать дуплекс. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину от приблизительно 9 до 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов.

[0087] В аспекте данного документа представлен вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащего в следующем порядке необязательную 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, вторую последовательность экспрессии, 5'-фрагмент интрона группы I и необязательную 3'-образующую дуплекс область. В аспекте данного документа представлен вектор для получения полинуклеотида

кольцевой РНК, содержащего в следующем порядке необязательную 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, первый сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, второй IRES, вторую последовательность экспрессии, 5'-фрагмент интрона группы I и необязательную 3'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит 3'-образующую дуплекс область и 5'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первый спейсер между 5'-образующей дуплекс областью и 3'-фрагментом интрона группы I и второй спейсер между 5'-фрагментом интрона группы I и 3'-образующей дуплекс областью. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый имеет длину от приблизительно 5 до приблизительно 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый имеет длину от приблизительно 8 до приблизительно 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый содержит неструктурированную область длиной по меньшей мере 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первый и второй спейсеры каждый содержит структурированную область длиной по меньшей мере 7 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину от приблизительно 9 до 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вектор оптимизирован по кодонам. В некоторых вариантах осуществления в векторе отсутствует по меньшей мере один участок связывания микроРНК, присутствующий в эквивалентном полинуклеотиде до оптимизации.

[0088] В аспекте данного документа представлена прокариотическая клетка, содержащая вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащего в следующем порядке необязательную 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, вторую последовательность экспрессии, 5'-фрагмент интрона группы I и необязательную 3'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит 3'-образующую дуплекс область и 5'-образующую дуплекс область. В аспекте данного документа представлена прокариотическая клетка, содержащая вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащего в следующем порядке необязательную 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, первый сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, второй IRES, вторую последовательность экспрессии, 5'-фрагмент интрона группы I и необязательную 3'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит 3'-образующую дуплекс область и 5'-образующую дуплекс область.

[0089] В аспекте данного документа представлена эукариотическая клетка, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК согласно настоящему раскрытию. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой человеческую клетку. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой

иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, НКТ-клетку, макрофаг или нейтрофил.

Краткое описание чертежей

[0090] На фиг. 1 показана люминисценция в супернатантах клеток НЕК293 (фиг. 1А, 1D и 1Е), НерG2 (фиг. 1В) или 1С1С7 (фиг. 1С) через 24 часа после трансфекции кольцевой РНК, содержащей последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia* и различные последовательности IRES.

[0091] На фиг. 2 показана люминисценция в супернатантах клеток НЕК293 (фиг. 2А), НерG2 (фиг. 2В) или 1С1С7 (фиг. 2С) через 24 часа после трансфекции кольцевой РНК, содержащей последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia* и различные последовательности IRES, имеющие разную длину.

[0092] На фиг. 3 показана стабильность выбранных конструкций IRES в клетках НерG2 (фиг. 3А) или 1С1С7 (фиг. 3В) в течение 3 дней, которую измеряют с помощью люминисценции.

[0093] На фиг. 4А и на фиг. 4В показана экспрессия белка из выбранных конструкций IRES в клетках Jurkat, которую измеряют с помощью люминисценции из секретированной люциферазы *Gaussia* в клеточных супернатантах.

[0094] На фиг. 5А и на фиг. 5В показана стабильность выбранных конструкций IRES в клетках Jurkat в течение 3 дней, которую измеряют с помощью люминисценции.

[0095] На фиг. 6 показаны сравнения люминисценции через 24 часа (фиг. 6А) или относительной люминисценции в течение 3 дней (фиг. 6В) модифицированной линейной, неочищенной кольцевой или очищенной кольцевой РНК, кодирующей люциферазу *Gaussia*.

[0096] На фиг. 7 показана индукция транскрипта IFN γ (фиг. 7А), IL-6 (фиг. 7В), IL-2 (фиг. 7С), RIG-I (фиг. 7D), IFN- β 1 (фиг. 7Е) и TNF α (фиг. 7F) после электропорации в клетки Jurkat модифицированной линейной, неочищенной кольцевой или очищенной кольцевой РНК.

[0097] На фиг. 8 показано сравнение люминисценции кольцевой РНК и модифицированной линейной РНК, кодирующей люциферазу *Gaussia* в человеческих первичных моноцитах (фиг. 8А) и макрофагах (фиг. 8В и фиг. 8С).

[0098] На фиг. 9 показана относительная люминисценция в течение 3 дней (фиг. 9А) в супернатанте первичных Т-клеток после трансдукции кольцевой РНК, содержащей последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia* и различные последовательности IRES, или люминисценция через 24 часа (фиг. 9В).

[0099] На фиг. 10 показана люминисценция через 24 часа в супернатанте первичных Т-клеток (фиг. 10А) после трансдукции кольцевой РНК или модифицированной линейной РНК, содержащей последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia*, или относительная люминисценция в течение 3 дней (фиг. 10В) и люминисценция через 24 часа в РВМС (фиг. 10С).

[0100] На фиг. 11 показаны хроматограммы HPLC (фиг. 11А) и эффективность

циркуляризации (фиг. 11B) конструкций РНК, имеющих разные сайты перестановки.

[0101] На фиг. 12 показаны хроматограммы HPLC (фиг. 12A) и эффективность циркуляризации (фиг. 12B) конструкций РНК, имеющих разные интроны и/или сайты перестановки.

[0102] На фиг. 13 показаны хроматограммы HPLC (фиг. 13A) и эффективность циркуляризации (фиг. 13B) 3 конструкций РНК с плечами гомологии или без них.

[0103] На фиг. 14 показана эффективность циркуляризации 3 конструкций РНК без плечей гомологии или с плечами гомологии, имеющими разную длину и содержание GC.

[0104] На фиг. 15A и 15B показаны хроматограммы HPLC, показывающие вклад сильных плечей гомологии в повышение эффективности сплайсинга, взаимосвязь между эффективностью циркуляризации и образованием разрывов в выбранных конструкциях и гипотетические комбинации сайтов перестановки и плечей гомологии для демонстрации повышенной эффективности циркуляризации.

[0105] На фиг. 16 показаны флуоресцентные изображения Т-клеток с имитацией электропорации (слева) или с электропорированной кольцевой РНК, кодирующей CAR (справа), и совместно культивированных с клетками Raji, экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка.

[0106] На фиг. 17 показаны изображения светлого поля (слева), флуоресцентные (в центре) и наложение (справа) Т-клеток с имитацией электропорации (сверху) или с электропорированной кольцевой РНК, кодирующей CAR (снизу), и совместно культивированных с клетками Raji, экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка.

[0107] На фиг. 18 показан специфический лизис клеток-мишеней Raji Т-клетками с имитацией электропорации или с электропорированной кольцевой РНК, кодирующей разные последовательности CAR.

[0108] На фиг. 19 показана люминисценция в супернатантах клеток Jurkat (слева) или покоящихся первичных человеческих CD3⁺ Т-клетках (справа) через 24 часа после трансдукции линейной или кольцевой РНК, содержащей последовательность экспрессии люциферазы Gaussia и различные последовательности IRES (фиг. 19A), и относительная люминисценция в течение 3 дней (фиг. 19B).

[0109] На фиг. 20 показана индукция транскрипта IFN- β 1 (фиг. 20A), RIG-I (фиг. 20B), IL-2 (фиг. 20C), IL-6 (фиг. 20D), IFN γ (фиг. 20E) и TNF α (фиг. 20F) после электропорации в человеческие CD3⁺ Т-клетки модифицированной линейной, неочищенной кольцевой или очищенной кольцевой РНК.

[0110] На фиг. 21 показан специфический лизис клеток-мишеней Raji человеческими первичными CD3⁺ Т-клетками с электропорированной circRNA, кодирующей CAR, что определяют путем обнаружения люминисценции светлячка (фиг. 21A) и индукции транскрипта IFN γ через 24 часа после электропорации разных количеств кольцевой или линейной РНК, кодирующей последовательность CAR (фиг. 21B).

[0111] На фиг. 22 показан специфический лизис клеток-мишеней или не мишеней человеческими первичными CD3⁺ Т-клетками с электропорированной кольцевой или

линейной РНК, кодирующей CAR с разными отношениями E:T (фиг. 22A и фиг. 22B), что определяют путем обнаружения люминисценции светлячка.

[0112] На фиг. 23 показан специфический лизис клеток-мишеней человеческими CD3+ T-клетками с электропорированной РНК, кодирующей CAR, в 1, 3, 5 и 7 дни после электропорации.

[0113] На фиг. 24 показан специфический лизис клеток-мишеней человеческими CD3+ T-клетками с электропорированной кольцевой РНК, кодирующей нацеленный на CD19 или BCMA CAR.

[0114] На фиг. 25 показан общий поток излучения в органах, взятых у мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и в состав которой входит 50% липида 15 (таблица 10b), 10% DSPC, 1,5% PEG-DMG и 38,5% холестерина.

[0115] На фиг. 26 показаны изображения, иллюстрирующие люминисценцию органов, взятых у мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и в состав которой входит 50% липида 15 (таблица 10b), 10% DSPC, 1,5% PEG-DMG и 38,5% холестерина.

[0116] На фиг. 27 показана молекулярная характеристика липидов 26 и 27 из таблицы 10a. На фиг. 27A показан спектр липида 26 протонного ядерного магнитного резонанса (ЯМР). На фиг. 27B показано время удерживания липида 26, измеренное с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS). На фиг. 27C показан масс-спектр липида 26. На фиг. 27D показан спектр липида 27 протонного ЯМР. На фиг. 27E показано время удерживания липида 27, измеренное с помощью LC-MS. На фиг. 27F показан масс-спектр липида 27.

[0117] На фиг. 28 показана молекулярная характеристика липида 22-S14 и его синтетических промежуточных соединений. На фиг. 28A показан спектр ЯМР 2-(тетрадецилтио)этан-1-ола. На фиг. 28B показан спектр ЯМР 2-(тетрадецилтио)этил акрилата. На фиг. 28C показан спектр ЯМР бис(2-(тетрадецилтио)этил) 3,3'-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (Липид 22-S14).

[0118] На фиг. 29 показан спектр ЯМР of бис(2-(тетрадецилтио)этил)3,3'-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (Липид 93-S14).

[0119] На фиг. 30 показана молекулярная характеристика of гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (Липид 54 из таблицы 10a). На фиг. 30A показан спектр протонного ЯМР липида 54. На фиг. 30B показано время удерживания липида 54, измеренное с помощью LC-MS. На фиг. 30C показан масс-спектр липида 54.

[0120] На фиг. 31 показана молекулярная характеристика гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (Липид 53 из таблицы 10a). На фиг. 31A показан спектр протонного ЯМР липида 53. На фиг. 31B показано время удерживания липида 53, измеренное с помощью LC-MS. На фиг. 31C показан масс-спектр липида 53.

[0121] На фиг. 32A показан общий поток излучения в селезенке и печени, взятых у

мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей люциферазу светлячка (FLuc) и в состав которой входит ионизируемый представляющий интерес липид, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в массовом отношении 16:1:4:1 или молярном отношении 62:4:33:1. На фиг. 32В показано среднее значение яркости для биораспределения экспрессии белка.

[0122] На фиг. 33А показаны изображения, иллюстрирующие люминисценцию органов, взятых у мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и в состав которой входит ионизируемый липид 22-S14, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в массовом отношении 16:1:4:1 или молярном отношении 62:4:33:1. На фиг. 33В показаны изображения IVIS всего тела мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и в состав которой входит ионизируемый липид 22-S14, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в массовом отношении 16:1:4:1 или молярном отношении 62:4:33:1.

[0123] На фиг. 34А показаны изображения, иллюстрирующие люминисценцию органов, взятых у мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и в состав которой входит ионизируемый липид 93-S14, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в массовом отношении 16:1:4:1 или молярном отношении 62:4:33:1. На фиг. 34В показаны изображения IVIS всего тела мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и в состав которой входит ионизируемый липид 93-S14, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в массовом отношении 16:1:4:1 или молярном отношении 62:4:33:1.

[0124] На фиг. 35А показаны изображения, иллюстрирующие люминисценцию органов, взятых у мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и в состав которой входит ионизируемый липид 26 из таблицы 10а, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в массовом отношении 16:1:4:1 или молярном отношении 62:4:33:1. На фиг. 35В показаны изображения IVIS всего тела мышей CD-1, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и в состав которой входит ионизируемый липид 26, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в массовом отношении 16:1:4:1 или молярном отношении 62:4:33:1.

[0125] На фиг. 36 показаны изображения, иллюстрирующие люминисценцию органов, взятых у мышей c57BL/6J, получивших дозу кольцевой РНК, кодирующей FLuc и инкапсулированной в липидные наночастицы, образованные липидом 15 из таблицы 10b (фиг. 36А), липидом 53 из таблицы 10а (фиг. 36В) или липидом 54 из таблицы 10а (фиг. 36С). PBS использовали в качестве контроля (фиг. 36D).

[0126] На фиг. 37А и на фиг. 37В показана относительная люминисценция в лизатах человеческих РВМС после 24-часовой инкубации с тестируемыми липидными наночастицами, содержащими кольцевую РНК, кодирующую люциферазу светлячка.

[0127] На фиг. 38 показана экспрессия GFP (фиг. 38А) и CD19 CAR (фиг. 38В) в человеческих РВМС после инкубации с тестируемыми липидными наночастицами, содержащими кольцевую РНК, кодирующую либо GFP, либо CD19 CAR.

[0128] На фиг. 39 показана экспрессия CAR против мышинового CD19 в клетках 1C1C7, липотрансфицированных кольцевой РНК, содержащей последовательность экспрессии CAR против мышинового CD19 и различные последовательности IRES.

[0129] На фиг. 40 показана цитотоксичность CAR против мышинового CD19 для мышинных Т-клеток. CD19 CAR закодирован и экспрессируется от кольцевой РНК, которую электропорировывают в мышинные Т-клетки.

[0130] На фиг. 41 показаны количества В-клеток в периферической крови (фиг. 41А и фиг. 41В) или селезенке (фиг. 41С) у мышей c57BL/6J, которым через день вводили тестируемые липидные наночастицы с инкапсулированной в них кольцевой РНК, кодирующей CAR против мышинового CD19.

[0131] На фиг. 42А и 42В показано сравнение уровня экспрессии CAR против человеческих CD19, экспрессируемых от кольцевой РНК с уровнем экспрессии CAR против человеческих CD19, экспрессируемых из линейной мРНК.

[0132] На фиг. 43А и 43В показано сравнение цитотоксического действия CAR против человеческих CD19, экспрессируемых от кольцевой РНК, с цитотоксическим действием CAR против человеческих CD19, экспрессируемых из линейной мРНК.

[0133] На фиг. 44 показана цитотоксичность двух CAR (CAR против человеческих CD19 и CAR против человеческих BCMA), экспрессируемых из одной кольцевой РНК в Т-клетках.

[0134] На фиг. 45А показаны типичные графики FACS с частотой экспрессии tdTomato в разных подгруппах иммунных клеток селезенки после лечения LNP, образованными липидом 27 или 26 из таблицы 10а или липидом 15 из таблицы 10b. На фиг. 45В показана количественная оценка доли миелоидных клеток, В-клеток и Т-клеток, экспрессирующих tdTomato (средн. + ст. Откл., n=3), эквивалентной доле каждой популяции клеток, успешно трансфицированной кольцевой РНК Ste. На фиг. 45С показана доля дополнительных популяций иммунных клеток селезенки, включая НК-клетки, классические моноциты, неклассические моноциты, нейтрофилы и дендритные клетки, экспрессирующие tdTomato после обработки липидами 27 и 26 (средн. + ст. Откл., n=3).

[0135] На фиг. 46А показан дизайн иллюстративной конструкции РНК со встроенными последовательностями polyA в интронах. На фиг. 46В показаны хроматографические следы неочищенной кольцевой РНК. На фиг. 46С показаны хроматографические следы аффинно очищенной кольцевой РНК. На фиг. 46D показана иммуногенность кольцевой РНК, полученной с помощью разных условий IVT и методов очистки. (Коммерческая=смесь коммерческих IVT; Специальная=смесь специализированных IVT; Aff=аффинная очистка; Enz=ферментная очистка; отношение GMP:GTP=8, 12,5 или 13,75).

[0136] На фиг. 47А показан дизайн иллюстративной конструкции РНК со специализированной связывающей последовательностью в качестве альтернативы polyA для гибридизационной очистки. На фиг. 47В показаны хроматографические следы неочищенной кольцевой РНК. На фиг. 47С показаны хроматографические следы аффинно

очищенной кольцевой РНК.

[0137] На фиг. 48А показаны хроматографические следы неочищенной кольцевой РНК, кодирующей дистрофин. На фиг. 48В показаны хроматографические следы ферментно очищенной кольцевой РНК, кодирующей дистрофин.

[0138] На фиг. 49 показано сравнение экспрессии (фиг. 49А) и стабильности (фиг. 49В) очищенной *circRNA* с разными 5'-спейсерами между 3'-фрагментом интрона/5'-внутренней дуплексной областью и IRES в клетках Jurkat. (AC=в последовательности спейсера использовали только А и С; UC=в последовательности спейсера использовали только U и C).

[0139] На фиг. 50 показаны уровни люминисцентной экспрессии и стабильность экспрессии в первичных Т-клетках от кольцевой РНК, содержащей указанные исходные или модифицированные элементы IRES.

[0140] На фиг. 51 показаны уровни люминисцентной экспрессии и стабильность экспрессии в клетках HepG2 от кольцевой РНК, содержащей указанные исходные или модифицированные элементы IRES.

[0141] На фиг. 52 показаны уровни люминисцентной экспрессии и стабильность экспрессии в клетках 1C1C7 от кольцевой РНК, содержащей указанные исходные или модифицированные элементы IRES.

[0142] На фиг. 53 показаны уровни люминисцентной экспрессии и стабильность экспрессии в клетках HepG2 от кольцевой РНК, содержащей элементы IRES со вставленными нетранслированными областями (UTR) или гибридные элементы IRES. «Scr» означает скремблированный, что использовали в качестве контроля.

[0143] На фиг. 54 показаны уровни люминисцентной экспрессии и стабильность экспрессии в клетках 1C1C7 от кольцевой РНК, содержащей IRES и разнообразные кассеты стоп-кодонов, функционально связанные с последовательностью, кодирующей люциферазу *Gaussia*.

[0144] На фиг. 55 показаны уровни люминисцентной экспрессии и стабильность экспрессии в клетках 1C1C7 от кольцевой РНК, содержащей IRES и переменные нетранслированные области (UTR), вставленные перед стартовым кодоном последовательности, кодирующей люциферазу *Gaussia*.

[0145] На фиг. 56 показана уровни экспрессии человеческого эритропоэтина (hEPO) в клетках Huh7 от кольцевой РНК, содержащей два участка-мишени miR-122 после кодирующей последовательности hEPO.

[0146] На фиг. 57 показаны уровни экспрессии CAR в периферической крови (фиг. 57А) и селезенке (фиг. 57В) при обработке LNP, заключающей кольцевую РНК, которая экспрессирует CAR, против CD19. Для сравнения использовали анти-CD20 (aCD20) и кольцевую РНК, кодирующую люциферазу (oLuc).

[0147] На фиг. 58 показана общая частота экспрессии CAR против CD19, частота экспрессии CAR против CD19 на поверхности клеток и влияние на противоопухолевый ответ специфической к IRES кольцевой РНК, кодирующей CAR против CD19 на Т-клетках.

На фиг. 58А показана средняя геометрическая интенсивность флуоресценции CAR против CD19, на фиг. 58В показано процентное значение экспрессии CAR против CD19, а на фиг. 58С показано процентное значение лизиса клеток-мишеней, обусловленного CAR против CD19. (СК=Козий Kobuvirus; AP=Apodemus Picornavirus; СК*=Козий Kobuvirus с оптимизацией кодонов; PV=PaRabovirus; SV=salivirus).

[0148] На фиг. 59 показаны уровни экспрессии CAR клеток-мишеней FLuc A20 при обработке специфическими к IRES кольцевыми конструкциями РНК.

[0149] На фиг. 60 показаны уровни люминисцентной экспрессии для цитозольных (фиг. 60А) и поверхностных (фиг. 60В) белков от кольцевой РНК в первичных человеческих Т-клетках.

[0150] На фиг. 61 показана люминисцентная экспрессия в человеческих Т-клетках при обработке специфическими к IRES кольцевыми конструкциями. Экспрессию кольцевых конструкций РНК сравнивали с линейной мРНК. На фиг. 61А, на фиг. 61В и на фиг. 61Г представлена экспрессия люциферазы Gaussia во многих клетках-донорах. На фиг. 61С, на фиг. 61D, на фиг. 61Е и на фиг. 61F представлена экспрессия люциферазы светлячка во многих клетках-донорах.

[0151] На фиг. 62 показана экспрессия CAR против CD19 (фиг. 62А и фиг. 62В) и CAR против ВСМА (фиг. 62В) в человеческих Т-клетках после обработки липидными наночастицами, заключающими в себе кольцевую РНК, которая кодирует CAR либо против CD19, либо против ВСМА, клеток K562, экспрессирующих люциферазу светлячка.

[0152] На фиг. 63 показаны уровни экспрессии CAR против CD19, обусловленные доставкой посредством электропорации *in vitro* кольцевой РНК, кодирующей CAR против CD19, специфическим антигензависимым образом. На фиг. 63А показан лизис клеток Nalm6 за счет CAR против CD19. На фиг. 63В показан лизис клеток K562 за счет CAR против CD19.

[0153] На фиг. 64 показана трансфекция LNP, опосредованная использованием AroE3 в растворах, содержащих LNP, и кольцевой РНК, экспрессирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP). На фиг. 64А показаны результаты выживания-гибели. На фиг. 64В, на фиг. 64С, на фиг. 64D и на фиг. 64Е показана частота экспрессии для множества доноров.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0154] Среди прочего в настоящем изобретении представлены способы и композиции для лечения аутоиммунного заболевания или рака на основе терапии кольцевой РНК. В частности, в настоящем изобретении представлены способы лечения аутоиммунного заболевания или рака путем введения нуждающемуся в лечении субъекту композиции, содержащей РНК, кодирующую 2 терапевтических белка в эффективной дозе и с таким интервалом введения, чтобы уменьшить интенсивность, тяжесть или частоту по меньшей мере одного симптома или признака аутоиммунного заболевания или рака или отсрочить наступление.

[0155] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен

вектор для получения кольцевой РНК, причем вектор содержит необязательную 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, необязательно первый спейсер, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, вторую последовательность экспрессии, необязательно второй спейсер, 5'-фрагмент интрона группы I и необязательную 3'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен вектор для получения кольцевой РНК, причем вектор содержит необязательную 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, необязательно первый спейсер, первый сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, второй IRES, вторую последовательность экспрессии, необязательно второй спейсер, 5'-фрагмент интрона группы I и необязательную 3'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления эти элементы расположены в векторе в указанном выше порядке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит 3'-образующую дуплекс область и 5'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит внутреннюю 5'-образующую дуплекс область между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES и внутреннюю 3'-образующую дуплекс область между последовательностями экспрессии и 5'-фрагментом интрона группы I. В некоторых вариантах осуществления внутренние образующие дуплексы области способны образовать дуплекс между собой, но не с внешними образующими дуплексы областями. В некоторых вариантах осуществления внутренние образующие дуплексы области являются частью первого и второго спейсеров. Дополнительные варианты осуществления включают полинуклеотиды кольцевой РНК, включая полинуклеотиды кольцевой РНК, полученные с использованием векторов, представленных в данном документе, композиции, содержащие такую кольцевую РНК, клетки, содержащие такую кольцевую РНК, способы применения и получения таких векторов, кольцевой РНК, композиций и клеток.

[0156] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены способы, включающие введение полинуклеотида кольцевой РНК, представленного в данном документе, в клетки для терапии или получения полезных белков. В некоторых вариантах осуществления способ является предпочтительным для обеспечения получения нужного полипептида внутри эукариотических клеток с более продолжительным временем полужизни, чем линейная РНК, вследствие устойчивости кольцевой РНК к рибонуклеазам.

[0157] У полинуклеотидов кольцевой РНК отсутствуют свободные концы, необходимые для опосредованного экзонуклеазой разложения, что является причиной их устойчивости к некоторым механизмам разложения РНК и обеспечивает более длительное время полужизни по сравнению с эквивалентной линейной РНК. Циркуляризация может обеспечить стабилизацию полинуклеотидов РНК, которые в общем имеют короткое время полужизни, и может улучшить общую эффективность экзогенной мРНК во многих вариантах применения. В одном варианте осуществления функциональное время полужизни полинуклеотидов кольцевой РНК, представленных в данном документе, в

эукариотических клетках (например клетках млекопитающих, таких как человеческие клетки), оцениваемое по синтезу белка, составляет по меньшей мере 20 часов (например по меньшей мере 80 часов).

1. Определения

[0158] В рамках настоящего изобретения термины «*circRNA*» или «кольцевой полирибонуклеотид» или «кольцевая РНК» использованы взаимозаменяемо и относятся к полирибонуклеотиду, который образует кольцевую структуру с помощью ковалентных связей.

[0159] В рамках настоящего изобретения термин «3'-фрагмент интрона группы I» относится к последовательности со сходством 75% или выше с 3'-проксимальным концом природного интрона группы I, включая динуклеотид участка сплайсинга и необязательно участок последовательности природного экзона.

[0160] В рамках настоящего изобретения термин «5'-фрагмент интрона группы I» относится к последовательности со сходством 75% или выше с 5'-проксимальным концом природного интрона группы I, включая динуклеотид участка сплайсинга и необязательно участок последовательности природного экзона.

[0161] В рамках настоящего изобретения термин «сайт перестановки» относится к участку в интроне группы I, где перед перестановкой интрона делают разрез. Этот разрез создает 3'- и 5'-фрагменты интронов группы I, которые переставляют так, чтобы они были по обе стороны участка предшественника РНК, подлежащего циркуляризации.

[0162] В рамках настоящего изобретения термин «участок сплайсинга» относится к динуклеотиду, который частично или полностью находится в интроне группы I и между которыми во время циркуляризации РНК расщепляется фосфодиэфирная связь.

[0163] Последовательности экспрессии в конструкции полинуклеотида могут быть разделены последовательностью «сайта расщепления», которая обеспечивает после трансляции экспрессию клеткой по-отдельности полипептидов, закодированных последовательностями экспрессии.

[0164] «саморасщепляющийся пептид» относится к пептиду, который транслируется без пептидной связи между двумя соседними аминокислотами, или функционирует так, что, когда получают полипептид, содержащий белки и саморасщепляющийся пептид, он немедленно расщепляется или разделяется на отдельные и дискретные первый и второй полипептиды без необходимости в каком-либо внешнем расщепляющем действии.

[0165] В рамках настоящего изобретения термин «терапевтический белок» относится к любому белку, который при введении субъекту непосредственно или опосредованно в виде транслированной нуклеиновой кислоты, имеет терапевтический, диагностический и/или профилактический эффект и/или вызывает нужный биологический и/или фармакологический эффект.

[0166] Обычно считается, что каждая из α и β цепей $\alpha\beta$ TCR имеет два домена или области, а именно переменные и константные домены/области. Переменный домен состоит из цепочки из переменных областей и соединяющих областей. В настоящем

описании и формуле изобретения термин «вариабельный домен TCR альфа» следовательно относится к цепочке из областей TRAV и TRAJ, а термин константный домен TCR альфа относится к внеклеточной области TRAC или к С-концевой усеченной последовательности TRAC. Также термин «вариабельный домен TCR бета» относится к цепочке из областей TRBV и TRBD/TRBJ, а термин константный домен TCR бета относится к внеклеточной области TRBC или к С-концевой усеченной последовательности TRBC.

[0167] В рамках настоящего изобретения термин «иммуногенная» относится к потенциалу вызова иммунного ответа на вещество. Иммунный ответ может быть индуцирован, когда иммунная система организма или определенный тип иммунной клетки подвергаются воздействию иммуногенного вещества. Термин «неиммуногенная» относится к недостатке или отсутствию иммунного ответа выше обнаруживаемого порогового значения на вещество. Иммунный ответ не обнаруживается, когда иммунная система организма или определенный тип иммунной клетки подвергаются воздействию неиммуногенного вещества. В некоторых вариантах осуществления неиммуногенный кольцевой полирибонуклеотид, представленный в данном документе, не индуцирует иммунный ответ выше заданного порогового значения при измерении с помощью анализа иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления врожденный иммунный ответ не обнаруживается, когда иммунная система организма или определенный тип иммунной клетки подвергаются воздействию неиммуногенного кольцевого полирибонуклеотида, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления адаптивный иммунный ответ не обнаруживается, когда иммунная система организма или определенный тип иммунной клетки подвергаются воздействию неиммуногенного кольцевого полирибонуклеотида, представленного в данном документе.

[0168] В рамках настоящего изобретения термин «эффективность циркуляризации» относится к измерению полученного кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с ее линейным исходным материалом.

[0169] В рамках настоящего изобретения термин «эффективность трансляции» относится к скорости или количеству получения белка или пептида из транскрипта рибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансляции может быть выражена в виде количества белка или пептида, полученного на заданное количество транскрипта, который кодирует белок или пептид.

[0170] Термин «нуклеотид» относится к рибонуклеотиду, дезоксирибонуклеотиду, его модифицированной форме или его аналогу. Нуклеотиды включают в себя виды, которые включают пурины, например аденин, гипоксантин, гуанин и их производные и аналоги, а также пиримидины, например, цитозин, урацил, тимин и их производные и аналоги. Аналоги нуклеотидов включают нуклеотиды, имеющие модификации в химической структуре основания, сахара и/или фосфата, включая без ограничения модификации пиримидина в 5'-положении, модификации пурина в 8'-положении, модификации в экзоциклических аминах цитозина и замещение 5-бром-урацила; и модификации сахара в 2'-положении, включая без ограничения модифицированные

сахарами рибонуклеотиды, в которых 2'-ОН заменен такой группой, как H, OR, R, галоген, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ или CN, где R представляет алкильный фрагмент согласно определению в данном документе. Аналоги нуклеотидов также подразумевают включение нуклеотидов с такими основаниями, как инозин, квеуозин, ксантин; сахаров, таких как 2'-метил рибоза; неприродные фосфодиэфирные связи, такие как метилфосфонатные, фосфоротиоатные и пептидные связи. Аналоги нуклеотидов включают 5-метоксиуридин, 1-метилпсевдоуридин и 6-метиладенозин.

[0171] Термин «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» использованы в данном документе взаимозаменяемо для описания полимера любой длины, например более чем приблизительно 2 основания, более приблизительно 10 оснований, более приблизительно 100 оснований, более приблизительно 500 оснований, более 1000 оснований или до приблизительно 10000 или более оснований, состоящих из нуклеотидов, например дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, и могут быть получены ферментативно или синтетически (например как описано в патенте США № 5948902 и в приведенных там ссылках), который может гибридизироваться с природными нуклеиновыми кислотами специфичным для последовательности способом, аналогичным способу для двух природных нуклеиновых кислот, например, может участвовать во взаимодействиях образования пар оснований согласно Уотсону-Крику. Природные нуклеиновые кислоты состоят из нуклеотидов, включая гуанин, цитозин, аденин, тимин и урацил (G, C, A, T и U, соответственно).

[0172] Термины «рибонуклеиновая кислота» и «РНК» в рамках настоящего изобретения означают полимер, состоящий из рибонуклеотидов.

[0173] Термины «дезоксирибонуклеиновая кислота» и «ДНК» в рамках настоящего изобретения означают полимер, состоящий из дезоксирибонуклеотидов.

[0174] «Выделенный» или «очищенный» в общем относится к выделению вещества (например в некоторых вариантах осуществления соединение, полинуклеотид, белок, полипептид, композиция полинуклеотидов или композиция полипептидов) таким образом, чтобы вещество содержало значительный процент (например более 1%, более 2%, более 5%, более 10%, более 20%, более 50% или более, обычно до приблизительно 90%-100%) образца, в котором оно находится. В некоторых вариантах осуществления по существу очищенный компонент содержит по меньшей мере 50%, 80%-85% или 90%-95% образца. Методы очистки представляющих интерес полинуклеотидов и полипептидов хорошо известны в данной области и включают, например, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию и осаждение согласно плотности. В общем, вещество очищено, когда оно имеется в образце в большем количестве, чем в природе, по сравнению с другими компонентами образца.

[0175] Термины «дуплексный», «двухцепочечный» или «гибридизированный» в рамках настоящего изобретения относятся к нуклеиновым кислотам, образованным путем гибридизации двух одиночных цепей нуклеиновых кислот, содержащих комплементарные последовательности. В большинстве случаев геномная ДНК является двухцепочечной.

Последовательности могут быть полностью комплементарными или частично комплементарными.

[0176] В рамках настоящего изобретения «неструктурированный» в отношении РНК относится к последовательности РНК, которая не прогнозируется программным обеспечением RNAFold или аналогичными инструментами получения прогноза для образования структуры (например шпилечной петли) самостоятельно или с другими последовательностями в той же молекуле РНК. В некоторых вариантах осуществления функциональную характеристику неструктурированной РНК можно получить с использованием анализов защиты от нуклеаз.

[0177] В рамках настоящего изобретения «структурированная» в отношении РНК относится к последовательности РНК, спрогнозированной программным обеспечением RNAFold или аналогичными инструментами получения прогноза для образования структуры (например шпилечной петли) самостоятельно или с другими последовательностями в той же молекуле РНК.

[0178] В рамках настоящего изобретения две «образующие дуплексы области», «плечи гомологии» или «области гомологии» дополняют или являются комплементарными друг другу, когда две области имеют одинаковый достаточный уровень идентичности последовательности с обратным комплементом друг друга, чтобы выступать в качестве субстратов для реакции гибридизации. В рамках настоящего изобретения полинуклеотидные последовательности имеют «гомологию», когда они либо являются идентичными, либо имеют общую идентичность последовательности с последовательностью обратного комплемента или «комплементарной» последовательностью. Процентом идентичности последовательности между образующей дуплекс областью и аналогичным обратным комплементом образующей дуплекс области может быть любой процент идентичности последовательности, который обеспечивает прохождение гибридизации. В некоторых вариантах осуществления внутренняя образующая дуплекс область полинуклеотида согласно изобретению способна образовать дуплекс с другой внутренней образующей дуплекс областью и не образует дуплекс с внешней образующей дуплекс областью.

[0179] Говорят, что молекулы линейной нуклеиновой кислоты имеют «5'-конец» и «3'-конец» потому, что фосфодиэфирные связи нуклеиновой кислоты возникают в 5'-атоме углерода и 3'-атоме углерода сахарных фрагментов замещающих мононуклеотидов. Концевым нуклеотидом полинуклеотида, в котором новая связь будет на 5'-атоме углерода, является его 5'-концевой атом нуклеотида. Концевым нуклеотидом полинуклеотида, в котором новая связь будет на 3'-атоме углерода, является его 3'-концевой атом нуклеотида. Концевой нуклеотид в рамках настоящего изобретения представляет собой нуклеотид в концевом положении 3'- или 5'-конца.

[0180] «Транскрипция» означает образование или синтез молекулы РНК с помощью РНК-полимеразы с использованием молекулы ДНК в качестве матрицы. Изобретение не ограничено РНК-полимеразой, которую используют для транскрипции. Например, в

некоторых вариантах осуществления можно использовать РНК-полимеразу Т7-типа.

[0181] «Трансляция» означает образование молекулы полипептида рибосомой на основе матрицы РНК.

[0182] Понятно, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. Используемые в этом описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из содержания явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «клетку» включает в себя комбинации двух или более клеток или целые культуры клеток; ссылка на «полинуклеотид» включает в себя на практике множество копий этого полинуклеотида. Если специально не указано или не очевидно из контекста, в рамках настоящего изобретения термин «или» следует понимать в смысле включения. Если иное не указано в данном документе и после в напоминании об описании, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту в области, к которой относится изобретение.

[0183] Если специально не указано или не очевидно из контекста, в рамках настоящего изобретения термин «приблизительно» следует понимать в диапазоне нормального допуска в данной области, например в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. «Приблизительно» можно понимать в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02% или 0,01% от указанного значения. Если иное не ясно из контекста, все приведенные в данном документе числовые значения имеют значение «приблизительно».

[0184] В рамках настоящего изобретения термин «кодировать» в широком смысле относится к любому процессу, в котором информация в полимерной макромолекуле используется для прямого получения второй молекулы, которая отличается от первой. Вторая молекула может иметь химическую структуру, которая отличается от химической природы первой молекулы.

[0185] Под «совместным введением» подразумевают введение терапевтического средства, представленного в данном документе, в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами достаточно близко во времени, чтобы терапевтическое средство, представленное в данном документе, могло усилить эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических средств или наоборот.

[0186] Термины «лечить» и «предотвратить», а также вытекающие из них слова в рамках настоящего изобретения не обязательно подразумевают 100% или полное лечение или предотвращение. Скорее, существуют различные степени лечения или предотвращения, которые рядовой специалист в данной области признает имеющими потенциальную пользу или терапевтический эффект. Лечение или предотвращение, обеспечиваемое способом, раскрытым в данном документе, может включать лечение или предотвращение одного или нескольких состояний или симптомов заболевания. Также, для

целей настоящего документа «предотвращение» может включать отсрочку начала заболевания или его симптома или состояния.

[0187] В рамках настоящего изобретения «аутоиммунитет» определен как стойкие и прогрессирующие иммунные реакции на неинфекционные аутоантигены, в отличие от инфекционных неаутоантигенов из бактериальных, вирусных, грибковых или паразитарных организмов, которые вторгаются и находятся в млекопитающих и людей. Аутоиммунные состояния включают склеродермию, болезнь Грейвса, болезнь Крона, болезнь Сьергена, рассеянный склероз, болезнь Хашимото, псориаз, миастению гравис, синдромы аутоиммунной полиэндокринопатии, сахарный диабет I типа (T1DM), аутоиммунный гастрит, аутоиммунный увеоретинит, полимиозит, колит и тиреоидит, а также генерализованные аутоиммунные заболевания, типичным примером которых является волчанка. «Аутоантиген» в рамках настоящего изобретения относится к антигену или эпитопу, который является нативным для млекопитающего и который является иммуногенным для указанного млекопитающего.

[0188] В рамках настоящего изобретения термин «последовательность экспрессии» может относиться к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует продукт, например пептид или полипептид, регуляторную нуклеиновую кислоту или некодирующую нуклеиновую кислоту. Иллюстративная последовательность экспрессии, которая кодирует пептид или полипептид, может содержать множество нуклеотидных триад, каждая из которых может кодировать аминокислоту и называется «кодоном».

[0189] В рамках настоящего изобретения «спейсер» относится к области полинуклеотидной последовательности в диапазоне от 1 нуклеотида до сотен или тысяч нуклеотидов, разделяющих два других элемента вдоль полинуклеотидной последовательности. Последовательности могут быть заданными или могут быть случайными. Спейсер обычно не является кодирующим. В некоторых вариантах осуществления спейсеры включают образующие дуплексы области.

[0190] В рамках настоящего изобретения «сайт внутренней посадки рибосомы» или «IRES» относится к последовательности или структурному элементу РНК в диапазоне размера от 10 нуклеотидов до 1000 нуклеотидов или более, способному инициировать трансляцию полипептида в отсутствие типичной кэп-структуры РНК. IRES обычно имеет длину от приблизительно 500 нуклеотидов до приблизительно 700 нуклеотидов.

[0191] В рамках настоящего изобретения «участок miРНК» относится к участку нуклеотидов внутри полинуклеотида, который способен образовать дуплекс по меньшей мере с 8 нуклеотидами природной последовательности miРНК.

[0192] В рамках настоящего изобретения «участок эндонуклеазы» относится к участку нуклеотидов в пределах полинуклеотида, который способен распознаваться и расщепляться белком эндонуклеазой.

[0193] В рамках настоящего изобретения «бицистронная РНК» относится к полинуклеотиду, который содержит две последовательности экспрессии, кодирующие два отдельных белка. Эти последовательности экспрессии часто разделены расщепляемым

пептидом, таким как участок 2A или последовательность IRES. Они могут также быть разделены элементом проскока рибосомы или за счет расщепления протеазой.

[0194] В рамках настоящего изобретения термин «элемент проскока рибосомы» относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей короткую последовательность пептида, способную вызывать образование двух пептидных цепей в результате трансляции одной молекулы РНК. Нежелая связывать себя теорией, можно предположить, что элементы проскока рибосомы функционируют за счет: (1) прекращения трансляции первой пептидной цепи и повторного инициирования трансляции второй пептидной цепи; или (2) расщепления пептидной связи в последовательности пептида, закодированной элементом проскока рибосомы, за счет присущей протеазной активности закодированного пептида или за счет другой протеазы в окружающей среде (например цитозоль).

[0195] В рамках настоящего изобретения термин «комбинированный» относится к составу на основе наночастиц, содержащему две нуклеиновые кислоты или более, или нуклеиновую кислоту и другое активное лекарственное вещество. Обычно соотношения являются эквимольными или заданы в логометрическом количестве для двух или более нуклеиновых кислот или для нуклеиновой кислоты и другого активного лекарственного вещества.

[0196] В рамках настоящего изобретения «переносчик» включает в себя любой из стандартных фармацевтических носителей, разбавителей, вспомогательных средств и тому подобное, которые в общем предназначены для использования в сочетании с введением биологически активных средств, включая нуклеиновые кислоты.

[0197] В рамках настоящего изобретения фраза «липидная наночастица» относится к переносчику, содержащему один или несколько липидов (например в некоторых вариантах осуществления катионных липидов, некатионных липидов и PEG-модифицированных липидов).

[0198] В рамках настоящего изобретения фраза «катионный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд с выбранным рН, таким как физиологический рН.

[0199] В рамках настоящего изобретения фраза «некатионный липид» относится к любому нейтральному, цвиттер-ионному или анионному липиду.

[0200] В рамках настоящего изобретения фраза «анионный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный отрицательный заряд с выбранным рН, таким как физиологический рН.

[0201] В рамках настоящего изобретения фраза «ионизируемый липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд с выбранным рН, таким как физиологический рН 4, и нейтральный заряд с другими рН, например с физиологическим рН 7.

[0202] В некоторых вариантах осуществления липид, например ионизируемый липид, раскрытый в данном документе, содержит одну или несколько расщепляемых групп.

Термины «расщеплять» и «расщепляемый» использованы в данном документе для обозначения того, что одна или несколько химических связей (например одна или несколько ковалентных связей, водородных связей, сил ван дер Ваальса и/или ионных взаимодействий) между атомами в рассматриваемой функциональной группе или рядом с ней разорваны (например гидролизованы) или способны разорваться под воздействием выбранных условий (например под воздействием ферментативных условий). В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа представляет собой дисульфидную функциональную группу, а в отдельных вариантах осуществления представляет собой дисульфидную группу, которая способна расщепляться под воздействием выбранных биологических условий (например внутриклеточных условий). В некоторых вариантах осуществления расщепляемой группой является сложноэфирная функциональная группа, которая способна расщепляться под воздействием выбранных биологических условий. Например, дисульфидные группы могут быть расщеплены ферментативно или за счет гидролиза, реакции окисления или восстановления. При расщеплении такой дисульфидной функциональной группы могут высвободиться один или несколько функциональных фрагментов или групп (например одна или несколько головных групп и/или хвостовых групп), которые с ней связаны. Иллюстративные расщепляемые группы могут включать без ограничения дисульфидные группы, сложноэфирные группы, эфирные группы и любые их производные (например алкиловые и ариловые сложные эфиры). В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа не является сложноэфирной группой или эфирной группой. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа связана (например связана одной или несколькими водородными связями, за счет сил ван дер Ваальса, ионных взаимодействий и ковалентных связей) с одним или несколькими функциональными фрагментами или группами (например по меньшей мере с одной головной группой и по меньшей мере с одной хвостовой группой). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из функциональных фрагментов или групп является гидрофильным (например гидрофильная головная группа, содержащая один или несколько элементов из имидазола, гуанидина, амино, имида, енамина, необязательно замещенного алкиламино и пиридила).

[0203] В рамках настоящего изобретения термин «гидрофильный» использован для обозначения в качественных терминах, что функциональная группа является предпочтительной для воды и обычно такие группы являются водорастворимыми. Например, в данном документе раскрыты соединения, которые содержат расщепляемую дисульфидную (S-S) функциональную группу, связанную с одной или несколькими гидрофильными группами (например с гидрофильной головной группой), причем такие гидрофильные группы содержат или выбраны из группы, состоящей из имидазола, гуанидина, амино, имида, енамина, необязательно замещенного алкиламино (например такого алкиламино, как диметиламино) и пиридила.

[0204] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из функциональных групп фрагментов, которые содержат соединения, раскрытые в данном

документе, имеет гидрофобную природу (например гидрофобная хвостовая группа, содержащая природный липид, такой как холестерин). В рамках настоящего изобретения термин «гидрофобный» использован для обозначения в качественных терминах, что функциональная группа является водоотталкивающей, и обычно такие группы не растворяются в воде. Например, в данном документе раскрыты соединения, которые содержат расщепляемую функциональную группу (например дисульфидную (S-S) группу), связанную с одной или несколькими гидрофобными группами, причем такие гидрофобные группы содержат один или несколько природных липидов, таких как холестерин, и/или необязательно замещенный, насыщенный в разной степени или ненасыщенный C₆-C₂₀ алкил и/или необязательно замещенный, насыщенный в разной степени или ненасыщенный C₆-C₂₀ ацил.

[0205] Соединение, описанное в данном документе, может также содержать одно или несколько изотипических замещений. Например, Н может быть в любой изотипической форме, включая ¹Н, ²Н (D или дейтерий) и ³Н (Т или тритий); С может быть в любой изотипической форме, включая ¹²С, ¹³С и ¹⁴С; О может быть в любой изотипической форме, включая ¹⁶О и ¹⁸О; F может быть в любой изотипической форме, включая ¹⁸F и ¹⁹F; и тому подобное.

[0206] При описании изобретения, которое может включать соединения и их фармацевтически приемлемые соли, фармацевтические композиции, содержащие такие соединения и способы применения таких соединений и композиций, если не указано иное, следующие термины, при наличии, имеют следующие значения. Также нужно понимать, что при описании в данном документе любой из определяемых далее фрагментов может быть замещен множеством заместителей, и что соответствующие определения предназначены для включения таких замещенных фрагментов в свой объем, как изложено ниже. Если не указано иное, термин «замещенный» следует определять, как изложено ниже. Кроме того, следует понимать, что при использовании в данном документе термины «группы» и «радикалы» могут считаться взаимозаменяемыми.

[0207] При перечислении диапазона значений предполагается включение каждого значения и поддиапазона в диапазоне. Например, «С₁₋₆ алкил» предполагает включение С₁, С₂, С₃, С₄, С₅, С₆, С₁₋₆, С₁₋₅, С₁₋₄, С₁₋₃, С₁₋₂, С₂₋₆, С₂₋₅, С₂₋₄, С₂₋₃, С₃₋₆, С₃₋₅, С₃₋₄, С₄₋₆, С₄₋₅ и С₅₋₆ алкила.

[0208] В некоторых вариантах осуществления соединения, раскрытые в данном документе, содержат, например, по меньшей мере одну гидрофильную головную группу и по меньшей мере одну гидрофобную хвостовую группу, каждая из которых связана по меньшей мере с одной расщепляемой группой, делая таким образом такие соединения амфифильными. В рамках настоящего изобретения для описания соединения или композиции термин «амфифильный» означает способность растворяться как в полярной (например воде), так и в неполярной (например липидной) средах. Например, в некоторых вариантах осуществления соединения, раскрытые в данном документе, содержат по меньшей мере одну липофильную хвостовую группу (например холестерин или С₆-C₂₀

алкил) и по меньшей мере одну гидрофильную головную группу (например имидазол), каждая из которых связана с расщепляемой группой (например дисульфидом).

[0209] Следует заметить, что используемые термины «головная группа» и «хвостовых групп» описывают соединения согласно настоящему изобретению и, в частности, функциональные группы, которые содержат такие соединения, использованы для облегчения ссылки на описание ориентации одной или нескольких функциональных групп относительно других функциональных групп. Например, в некоторых вариантах осуществления гидрофильная головная группа (например гуанидин) связана (например одной или несколькими водородными связями, за счет сил ван дер Ваальса, ионных взаимодействия и ковалентных связей) с расщепляемой функциональной группой (например дисульфидной группой), которая, в свою очередь, связана с гидрофобной хвостовой группой (например холестерином).

[0210] В рамках настоящего изобретения термин «алкил» относится к C_1 - C_{40} углеводородам как с прямой, так и с разветвленной цепью (например к C_6 - C_{20} углеводородам) и включает как насыщенные, так и ненасыщенные углеводороды. В некоторых вариантах осуществления алкил может содержать один или несколько циклических алкилов и/или один или несколько гетероатомов, таких как кислород, азот или сера, и может необязательно быть замещен заместителями (например одним или несколькими элементами из алкила, галогена, алкокси, гидрокси, amino, арила, эфира, сложного эфира или амида). В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый алкил включает в себя (9Z,12Z)-октадека-9,12-диен. Использование таких обозначений, как, например, « C_6 - C_{20} » предназначено для обозначения алкила (например с прямой или разветвленной цепью и включая алкены и алкилы), имеющего указанный диапазон атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 10 атомов углерода (« C_{1-10} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 9 атомов углерода (« C_{1-9} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 8 атомов углерода (« C_{1-8} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 7 атомов углерода (« C_{1-7} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 6 атомов углерода (« C_{1-6} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 5 атомов углерода (« C_{1-5} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 4 атома углерода (« C_{1-4} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 3 атомов углерода (« C_{1-3} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 2 атомов углерода (« C_{1-2} алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет 1 атом углерода (« C_1 алкил»). Примеры C_{1-6} алкильных групп включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, пентил, гексил и тому подобное.

[0211] В рамках настоящего изобретения «алкенил» относится к радикалу углеводородной группы с прямой или разветвленной цепью, имеющей от 2 до 20 атомов углерода, одну или несколько углерод-углеродных двойных связей (например 1, 2, 3 или 4

углерод-углеродные двойные связи) и необязательно одну или несколько углерод-углеродных тройных связей (например 1, 2, 3 или 4 углерод-углеродные тройные связи) («C₂₋₂₀ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенил не содержит никаких тройных связей. В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет от 2 до 10 атомов углерода («C₂₋₁₀ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет от 2 до 9 атомов углерода («C₂₋₉ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет от 2 до 8 атомов углерода («C₂₋₈ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет от 2 до 7 атомов углерода («C₂₋₇ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет от 2 до 6 атомов углерода («C₂₋₆ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет от 2 до 5 атомов углерода («C₂₋₅ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет от 2 до 4 атома углерода («C₂₋₄ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет от 2 до 3 атомов углерода («C₂₋₃ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет 2 атома углерода («C₂ алкенил»). Одна или несколько углерод-углеродных двойных связей могут быть внутренними (например в 2-бутениле) или концевыми (например в 1-бутениле). Примеры C₂₋₄ алкенильных групп включают этенил (C₂), 1-пропенил (C₃), 2-пропенил (C₃), 1-бутенил (C₄), 2-бутенил (C₄), бутаденил (C₄) и тому подобное. Примеры C₂₋₆ алкенильных групп включают вышеупомянутые C₂₋₄ алкенильные группы, а также пентенил (C₅), пентаденил (C₅), гексенил (C₆) и тому подобное. Дополнительные примеры алкенила включают гептенил (C₇), октенил (C₈), октатриенил (C₈) и тому подобное.

[0212] В рамках настоящего изобретения «алкинил» относится к радикалу углеводородной группы с прямой или разветвленной цепью, имеющей от 2 до 20 атомов углерода, одну или несколько углерод-углеродных тройных связей (например 1, 2, 3 или 4 углерод-углеродные тройные связи) и необязательно одну или несколько углерод-углеродных двойных связей (например 1, 2, 3 или 4 углерод-углеродные двойные связи) («C₂₋₂₀ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинил не содержит никаких двойных связей. В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет от 2 до 10 атомов углерода («C₂₋₁₀ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет от 2 до 9 атомов углерода («C₂₋₉ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет от 2 до 8 атомов углерода («C₂₋₈ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет от 2 до 7 атомов углерода («C₂₋₇ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет от 2 до 6 атомов углерода («C₂₋₆ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет от 2 до 5 атомов углерода («C₂₋₅ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет от 2 до 4 атома углерода («C₂₋₄ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет от 2 до 3 атомов углерода («C₂₋₃ алкинил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет 2 атома углерода («C₂ алкинил»). Одна или несколько углерод-углеродных тройных связей могут быть внутренними (например в 2-бутиниле) или концевыми (например в 1-бутиниле).

Примеры C_{2-4} алкинильных групп включают без ограничения этинил (C_2), 1-пропинил (C_3), 2-пропинил (C_3), 1-бутинил (C_4), 2-бутинил (C_4) и тому подобное. Примеры C_{2-6} алкенильных групп включают вышеупомянутые C_{2-4} алкинильные группы, а также пентинил (C_5), гексинил (C_6) и тому подобное. Дополнительные примеры алкинила включают гептинил (C_7), октинил (C_8) и тому подобное.

[0213] В рамках настоящего изобретения «алкилен», «алкенилен» и «алкинилен» относятся к двухвалентному радикалу алкила, алкенила и алкинильной группы, соответственно. Когда для конкретной «алкиленовой», «алкениленовой» или «алкиниленовой» группы представлен диапазон или количество атомов углерода, понятно, что диапазон или количество относится к диапазону или количеству атомов углерода в линейной двухвалентной углеродной цепи. «Алкиленовые», «алкениленовые» и «алкиниленовые» группы могут быть замещены или не замещены одним или несколькими заместителями, описанными в данном документе.

[0214] В рамках настоящего изобретения термин «арил» относится к ароматическим группам (например моноциклическим, бициклическим и трициклическим структурам), содержащим от шести до десяти атомов углерода в кольцевой части. Арильные группы могут быть необязательно замещены доступными атомами углерода и в некоторых вариантах осуществления могут содержать один или несколько гетероатомов, таких как кислород, азот или сера. В некоторых вариантах осуществления арильная группа имеет шесть атомов углерода кольца (« C_6 арил»; например фенил). В некоторых вариантах осуществления арильная группа имеет десять атомов углерода кольца (« C_{10} арил»; например нафтил, такой как 1-нафтил и 2-нафтил).

[0215] В рамках настоящего изобретения «гетероарил» относится к радикалу 5-10-членной моноциклической или бициклической $4n+2$ ароматической кольцевой системы (например имеющей 6 или 10 общих электронов в циклическом массиве), имеющей атомы углерода кольца и 1-4 гетероатомов кольца, представленных в ароматической кольцевой системе, причем каждый гетероатом независимо выбирают из азота, кислорода и серы («5-10-членный гетероарил»). в гетероарильных группах, которые содержат один или несколько атомов азота, местом соединения в зависимости от валентности может быть атом углерода или азота. Гетероарильные бициклические кольцевые системы могут содержать один или несколько гетероатомов в одном или обоих кольцах. «Гетероарил» включает в себя кольцевые системы, где гетероарильное кольцо, согласно определению выше, слито с одной или несколькими карбоциклическими или гетероциклическими группами, причем место соединения находится на гетероарильном кольце, и в таких случаях количество членов кольца обозначает количество членов кольца в гетероарильной кольцевой системе. «Гетероарил» также включает в себя кольцевые системы, где гетероарильное кольцо, согласно определению выше, слито с одной или несколькими арильными группами, причем место соединения находится либо на арильном, либо на гетероарильном кольце, и в таких случаях количество членов кольца обозначает количество членов кольца в слитой (арил/гетероарильной) кольцевой системе. В бициклических гетероарильных группах, где

одно кольцо не содержит гетероатома (например индолил, хинолинил, карбазолил и тому подобное), место соединения может быть на каждом кольце, то есть либо на кольце, несущем гетероатом (например 2-индолил), либо на кольце, которое не содержит гетероатома (например 5-индолил).

[0216] Термин «циклоалкил» относится к одновалентной насыщенной циклической, бициклической или мостиковой циклической (например адамантильной) углеводородной группе из 3-12, 3-8, 4-8 или 4-6 атомов углерода, упоминаемой в данном документе, например, как «C₄₋₈ циклоалкил», полученной из циклоалкана. Иллюстративные циклоалкильные группы включают без ограничения циклогексаны, циклопентаны, циклобутаны и циклопропаны.

[0217] В рамках настоящего изобретения «гетероциклил» или «гетероциклический» относится к радикалу 3-10-членной неароматической кольцевой системы, имеющего атомы углерода кольца и от 1 до 4 гетероатомов кольца, причем каждый гетероатом независимо выбирают из азота, кислорода, серы, бора, фосфора и кремния («3-10-членный гетероциклил»). в гетероциклильных группах, которые содержат один или несколько атомов азота, местом соединения может быть атом углерода или азота, в зависимости от валентности. гетероциклильная группа может быть либо моноциклической («моноциклический гетероциклил») либо слитой, либо мостиковой, либо спирокольцевой системой, такой как бициклическая система («бициклический гетероциклил»), и может быть насыщенной или может быть частично ненасыщенной. Гетероциклильные бициклические кольцевые системы могут содержать один или несколько гетероатомов в одном или обоих кольцах. «Гетероциклил» также включает в себя кольцевые системы, где гетероциклильное кольцо согласно определению выше слито с одним или несколькими карбоциклическими группами, причем место соединения находится либо на карбоциклильном или на гетероциклильном кольце, либо на кольцевых системах, причем гетероциклильное кольцо согласно определению выше слито с одной или несколькими арильными или гетероарильными группами, причем место соединения находится на гетероциклильном кольце, и в таких случаях количество членов кольца обозначает количество членов кольца в гетероциклильной кольцевой системе. Термины «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклильное кольцо», «гетероциклическая группа», «гетероциклический фрагмент» и «гетероциклический радикал» можно использовать взаимозаменяемо.

[0218] В рамках настоящего изобретения «циано» относится к -CN.

[0219] Термин «галоген» в рамках настоящего изобретения относится к атому, выбранному из фтора (F), хлора (Cl), брома (Br) и иода (I). В некоторых вариантах осуществления галогеновой группой является либо фтор, либо хлор.

[0220] Термин «алкокси» в рамках настоящего изобретения относится к алкильной группе, которая соединена с другим фрагментом через атом кислорода (-O(алкил)). Неограничивающие примеры включают, например, метокси, этокси, пропокси и бутокси.

[0221] В рамках настоящего изобретения «оксо» относится к -C=O.

[0222] Обычно термин «замещенный», независимо от того, стоит ли перед ним термин «необязательно» или нет, означает, что по меньшей мере один атом водорода, имеющийся в группе (например с атомом углерода или азота), заменен допустимым заместителем, например заместителем, который при замещении приводит к стабильному соединению, например соединению, которое самопроизвольно не подвергается трансформации, например за счет перегруппировки, циклизации, отщепления или другой реакции. Если не указано иное, «замещенная» группа имеет заместитель в одном или нескольких замещаемых положениях группы, и при замещении более чем в одном положении в любой заданной структуре заместители являются либо одинаковыми, либо разными в каждом положении.

[0223] В рамках настоящего изобретения «фармацевтически приемлемая соль» относится к тем солям, которые в рамках обоснованного медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и тому подобное и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, Berge et al. Подробно описывает фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19. Фармацевтически приемлемые соли соединений согласно этому изобретению включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых, нетоксичных солей присоединения кислоты являются соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других способов, используемых в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают соли адипат, альгинат, аскорбат, аспарат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопенттанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, p-толуолсульфонат, ундеканоат, валерат и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли, полученные из соответствующих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, аммония и $N^+(C_1-4\text{алкил})_4$. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и тому подобное. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как

галид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат.

[0224] В типичных вариантах осуществления настоящее изобретение предполагает охват соединений, раскрытых в данном документе, и фармацевтически приемлемых солей, фармацевтически приемлемых сложных эфиров, таутомерных форм, полиморфов и пролекарств таких соединений. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя фармацевтически приемлемую соль присоединения, фармацевтически приемлемый сложный эфир, сольват (например гидрат) соли присоединения, таутомерную форму, полиморф, энантиомер, смесь энантиомеров, стереоизомер или смесь стереоизомеров (чистую или в виде рацемической или нерацемической смеси) соединения, описанного в данном документе.

[0225] Соединения, описанные в данном документе, могут содержать один или несколько центров асимметрии и таким образом могут существовать в разных изометрических формах, например, как энантиомеры и/или диастереомеры. Например, соединения, описанные в данном документе, могут быть в виде отдельного энантиомера, диастереомера или геометрического изомера или могут быть в виде смеси стереоизомеров, включая рацемические смеси и смеси, обогащенные одним или несколькими стереоизомерами. Изомеры могут быть выделены из смеси способами, известными специалистам в данной области, включая хиральную жидкостную хроматографию высокого давления (HPLC) и образование и кристаллизацию хиральных солей; или предпочтительные изомеры могут быть получены путем асимметричного синтеза. См., например, Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); and Wilen, *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972). Изобретение кроме того охватывает соединения, описанные в данном документе, в виде отдельных изомеров, по существу не содержащих других изомеров и альтернативно, в виде смесей различных изомеров.

[0226] В некоторых вариантах осуществления соединения и переносчики компонентом которых являются такие соединения (например липидные наночастицы) демонстрируют увеличенную (например повышенную) способность трансфекции одной или нескольких клеток-мишеней. Соответственно, в данном документе также представлены способы трансфекции одной или нескольких клеток-мишеней. Такие способы обычно включают стадию контакта одной или нескольких клеток-мишеней с соединениями и/или фармацевтическими композициями, раскрытыми в данном документе, чтобы трансфицировать одну или несколько клеток-мишеней содержащейся в них кольцевой РНК. В рамках настоящего изобретения термины «трансфицировать» или «трансфекция» относятся к внутриклеточному введению одного или нескольких инкапсулированных материалов (например нуклеиновых кислот и/или полинуклеотидов) в клетку или предпочтительно в клетку-мишень. Термин «эффективность трансфекции» относится к

относительному количеству такого инкапсулированного материала (например полинуклеотидов), поглощаемого за счет введения в клетку-мишень и/или экспрессируемого клеткой-мишенью, которая является объектом трансфекции. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансфекции можно оценить по величине выработки репортерного полинуклеотида, вырабатываемого клетками-мишенями после трансфекции. В некоторых вариантах осуществления переносчик имеет высокую эффективность трансфекции. В некоторых вариантах осуществления переносчик имеет эффективность трансфекции по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%.

[0227] В рамках настоящего изобретения термин «липосома» в общем относится к везикуле, состоящей из липидов (например амфифильных липидов), расположенных в одном или нескольких сферическом бислое или бислоях. В некоторых вариантах осуществления липосома представляет собой липидную наночастицу (например липидную наночастицу, содержащую одно или несколько ионизируемых липидных соединений, описанных в данном документе). Такие липосомы могут быть однослойными или многослойными везикулами, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть, которая содержит инкапсулированную *circRNA* для доставки в одну или несколько клеток-мишеней, тканей и органов. В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, содержат одну или несколько липидных наночастиц. Примеры подходящих липидов (например ионизируемых липидов), которые можно использовать для образования рассматриваемых липосом и липидных наночастиц, включают одно или несколько соединений, раскрытых в данном документе (например HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 и/или HGT4005). Такие липосомы и липидные наночастицы также могут содержать дополнительные ионизируемые липиды, такие как C12-200, DLin-kC2-DMA и/или HGT5001, хелперные липиды, структурные PEG-модифицированные липиды липиды, MC3, DLinDMA, DLinkC2DMA, cKK-E12, ICE, HGT5000, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA, DMDMA, DODAC, DLenDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, HGT4003 и их комбинации.

[0228] В рамках настоящего изобретения фразы «некатионный липид», «некатионный хелперный липид» и «хелперный липид» использованы взаимозаменяемо и относятся к любому нейтральному, цвиттер-ионному или анионному липиду.

[0229] В рамках настоящего изобретения фраза «анионный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный отрицательный заряд с выбранным pH, таким как физиологический pH.

[0230] В рамках настоящего изобретения фраза «биоразлагаемый липид» или «разлагаемый липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые расщепляются в окружающей среде хозяина в течение нескольких минут, часов или дней, что в идеале делает их менее токсичными, и маловероятно, чтобы они накапливались у хозяина с

течением времени. Общие модификации липидов среди прочего включают сложноэфирные связи и дисульфидные связи для повышения биоразлагаемости липида.

[0231] В рамках настоящего изобретения фраза «биоразлагаемая PEG липид» или «разлагаемый PEG липид» относится к любому из ряда видов липидов, где PEG молекулы отщепляются от липида в окружающей среде хозяина в течение нескольких минут, часов или дней, что в идеале делает их менее иммуногенными. Общие модификации PEG липидов среди прочего включают сложноэфирные связи и дисульфидные связи для повышения биоразлагаемости липида.

[0232] В некоторых вариантах осуществления согласно настоящему изобретению переносчики (например липидные наночастицы) получают для инкапсулирования одного или нескольких материалов или терапевтических средств (например circRNA). Процесс включения нужного терапевтического средства (например circRNA) в переносчик в данном документе называется или «загрузка» или «инкапсулирование» (Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Загруженные в переносчик или инкапсулированные в него материалы (например circRNA) могут быть полностью или частично расположены во внутреннем пространстве переносчика, внутри двухслойной мембраны переносчика или связаны с внешней поверхностью переносчика.

[0233] В рамках настоящего изобретения термин «структурный липид» относится к стеролам, а также к липидам, содержащим фрагменты стерола.

[0234] Согласно определению в данном документе «стеролы» представляют собой подгруппу стероидов, состоящих из стероидных спиртов.

[0235] В рамках настоящего изобретения термин «структурный липид» относится к стеролам и также к липидам, содержащим фрагменты стерола.

[0236] В рамках настоящего изобретения термин «PEG» означает любой полиэтиленгликоль или другой полиалкиленэфирный полимер.

[0237] Как в общем определено в данном документе, «PEG-ОН липид» (также называемый в данном документе «гидроксипегилированным липидом») представляет собой пегилированный липид, имеющий одну или несколько гидроксильных (-ОН) групп на липиде.

[0238] В рамках настоящего изобретения «фосфолипид» представляет собой липид, который содержит фосфатный фрагмент и одну или несколько углеродных цепей, таких как цепи ненасыщенных жирных кислот.

[0239] Все нуклеотидные последовательности, раскрытые в данном документе, могут представлять последовательности РНК или соответствующие последовательности ДНК. Понятно, что дезокситимидин (dT или T) в ДНК транскрибируется в уридин (U) в РНК. В связи с этим «Т» и «U» в нуклеотидных последовательностях использованы в данном документе взаимозаменяемо.

[0240] Выражения «идентичность последовательности» или, например, содержащий «последовательность, идентичную на 50%» в рамках настоящего изобретения относятся к степени, в которой последовательности являются идентичными по схеме нуклеотид за

нуклеотидом или по схеме аминокислота за аминокислотой в окне сравнения. Таким образом, «процентную идентичность последовательности» можно рассчитать путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определяя количество положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (например A, T, C, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (например Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречается в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих положений, разделив количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения (то есть размер окна) и умножив результат на 100, чтобы получить процентную идентичность последовательности. Включены нуклеотиды и полипептиды, имеющие по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из эталонных последовательностей, описанных в данном документе, обычно, когда вариант полипептида сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность эталонного полипептида.

[0241] Термин «антитело» (Ab) включает в себя без ограничения гликопротеиновый иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном. Обычно антитело может содержать по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, или антигенсвязывающую молекулу. Каждая H цепь может содержать переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи может содержать три константных домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь может содержать переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи может содержать один константный домен, CL. VH и VL области могут быть дополнительно разделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL может содержать три CDR и четыре FR, расположенные от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области Ab могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например эффекторные клетки) и первый компонент классической системы комплемента. Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, полученные рекомбинантно антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, сконструированные антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие молекулы с двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела,

интратела, слитые антитела (иногда называемые в данном документе «конъюгаты антител»), гетероконъюгированные антитела, однодоменные антитела, одновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), камелизированные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, связанные дисульфидом переменные фрагменты (sdFv), антиидиотипические (анти-id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела), минитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе «миметиками антител») и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, относятся к популяциям поликлональных антител.

[0242] Иммуноглобулин может происходить из любых широко известных изотипов, включая без ограничения IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области и включают без ограничения человеческий IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. «Изотип» относится к классу или подклассу Ab (например IgM или IgG1), который закодирован генами константной области тяжелой цепи. Термин «антитело» включает в себя, например, как природные, так и неприродные Ab; моноклональные и поликлональные Ab; химерные и гуманизированные Ab; человеческие или нечеловеческие Ab; полностью синтетические Ab; и одноцепочечные Ab. нечеловеческие Ab могут быть гуманизированы рекомбинантными способами для снижения их иммуногенности у людей. Когда не сказано определенно и если из контекста не следует иное, термин «антитело» также включает в себя антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий участок любого из вышеупомянутых иммуноглобулинов и включает в себя одновалентный и двухвалентный фрагмент или участок и одноцепочечный Ab.

[0243] «Антигенсвязывающая молекула», «антигенсвязывающий участок» или «фрагмент антитела» относится к любой молекуле, которая содержит антигенсвязывающие части (например CDR) антитела, из которых получена молекула. Антигенсвязывающая молекула может содержать антигенные определяющие комплементарность области (CDR). Примеры фрагментов антител включают без ограничения фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb, линейные антитела, scFv антитела и мультиспецифические антитела, образованные из антигенсвязывающих молекул. Пептитела (то есть содержащие Fc слитые молекулы, содержащие связывающие пептиды домены) представляют собой другой пример подходящих антигенсвязывающих молекул. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на опухолевой клетке. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на клетке, вовлеченной в гиперпролиферативное заболевание или с вирусным или бактериальным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с ВСМА. В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой фрагмент антитела, содержащий одну или несколько его определяющих комплементарность областей (CDR),

который специфически связывается с антигеном. В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит или состоит из авимеров.

[0244] В рамках настоящего изобретения термин «переменная область» или «переменный домен» использованы взаимозаменяемо и являются общими в данной области. Переменная область в общем относится к участку антитела, обычно к участку легкой или тяжелой цепи, обычно приблизительно от 110 до 120 аминокислот на аминоконце в зрелой тяжелой цепи и приблизительно от 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности конкретного антитела к его конкретному антигену. Переменность последовательности сосредоточена в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), тогда как более высококонсервативные области в переменном домене называются каркасными областями (FR). Не желая быть связанными каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепи в первую очередь ответственны за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В некоторых вариантах осуществления переменная область представляет собой человеческую переменную область. В некоторых вариантах осуществления переменная область содержит CDR грызунов или мышей и человеческие каркасные области (FR). В отдельных вариантах осуществления переменная область представляет собой переменную область приматов (например не являющихся человеком приматов). В некоторых вариантах осуществления переменная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) приматов (например не являющихся человеком приматов).

[0245] Термины «VL» и «VL домен» использованы взаимозаменяемо для обозначения переменной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы.

[0246] Термины «VH» и «VH домен» использованы взаимозаменяемо для обозначения переменной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы.

[0247] широко используется ряд определений CDR: нумерация Kabat, нумерация Chothia, нумерация AbM или контактная нумерация. определение AbM представляет собой компромисс между двумя определениями, используемыми в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. Контактное определение основано на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. Термин «нумерация Kabat» и аналогичные термины признаны в данной области и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в переменных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы. В некоторых аспектах CDR антитела может быть определена согласно системе нумерации Kabat (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) *Ann NY Acad Sci* 190: 382-391 и Kabat EA et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological*

Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). При использовании системы нумерации Kabat, CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно находится в положениях 31-35 аминокислот, которые необязательно могут включать одну или две дополнительных аминокислоты после 35 (называемых в схеме нумерации Kabat 35A и 35B) (CDR1), в положениях 50-65 аминокислот (CDR2) и в положениях 95-102 аминокислот (CDR3). При использовании системы нумерации Kabat, CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно находится в положениях 24-34 аминокислот (CDR1), в положениях 50-56 аминокислот (CDR2) и в положениях 89-97 аминокислот (CDR3). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанных в данном документе, определены согласно схеме нумерации Kabat. В некоторых аспектах CDR антитела могут быть определены согласно схеме нумерации Chothia, которая относится к локализации структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et al, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C et al. (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A et al, (1990) J Mol Biol 215(1): 175- 82; и патент США № 7709226). Обычно при использовании нумерации по методу Kabat, петля CDR-H1 Chothia находится в аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля CDR-H2 Chothia находится в аминокислотах тяжелой цепи 52-56, а петля CDR-H3 Chothia находится в аминокислотах тяжелой цепи 95-102, тогда как петля CDR-L1 Chothia находится в аминокислотах легкой цепи 24-34, петля CDR-L2 Chothia находится в аминокислотах легкой цепи 50-56, а петля CDR-L3 Chothia находится в аминокислотах легкой цепи 89-97. Конец петли CDR-H1 Chothia при нумерации с использованием системы нумерации Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (потому, что схема нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B; если нет ни 35A ни 35B, петля заканчивается на 32; если имеется только 35A, петля заканчивается на 33; если имеются и 35A и 35B, петля заканчивается на 34). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанные в данном документе, определены согласно схеме нумерации Chothia.

[0248] В рамках настоящего изобретения термины «константная область» и «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют обычное значение в данной области. Константная область представляет собой участок антитела, например участок легкой и/или тяжелой цепи на карбоксильном конце, который непосредственно не вовлечен в связывание антитела с антигеном, но который может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина.

[0249] «Аффинность связывания» обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между участком с одной связью молекулы (например антитела) и его партнером по связыванию (например антигена). Если не указано иное, в рамках настоящего изобретения «аффинность связывания» относится к присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например антителом и антигеном). Аффинность молекулы X для ее партнера

У может обычно представляют с помощью константы диссоциации (KD или Kd). Аффинность можно измерить и/или выразить с помощью ряда путей, известных в данной области, включая без ограничения равновесную константу диссоциации (KD) и равновесную константу ассоциации (KA или Ka). KD рассчитывают как частное koff/kon, тогда как KA рассчитывают как частное kon/koff. kon относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а koff относится к диссоциации, например, антитела с антигеном. kon и koff можно определить с помощью методов, известных рядовому специалисту в данной области, таких как BIACORE® или KinExA.

[0250] В рамках настоящего изобретения «консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, когда аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, имеющий аналогичную боковую цепь. в данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В некоторых вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков в пределах CDR или в пределах каркасной области (областей) антитела или его антигенсвязывающей молекулы могут быть заменены на аминокислотный остаток с аналогичной боковой цепью.

[0251] В рамках настоящего изобретения термин «гетерологичный» означает из любого источника, отличного от природных последовательностей.

[0252] В рамках настоящего изобретения «эпитоп» представляет собой термин в данной области и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или смежный эпитоп), или эпитоп может, например, объединяться из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационного, нелинейного, прерывистого или несмежного эпитопа). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить с помощью, например, ЯМР спектроскопии, рентгенодифракционной кристаллографии, анализов ELISA, обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (например масс-спектрометрия с электрораспылением с жидкостной хроматографией), анализов сканирования олигопептидов на основе матрицы и/или картированием мутагенеза (например картированием сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществить с использованием любого из известных способов в данной области (например Giege R et al., (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23;

Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269- 1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Кристаллы антитело:антиген можно исследовать с использованием хорошо известных методов рентгеновской дифракции и можно уточнять с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X- PLOR (Yale University, 1992, распространяемого Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) объемы 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; U.S. Patent Publication No. 2004/0014194), и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323).

[0253] В рамках настоящего изобретения антигенсвязывающая молекула, антитело или его антигенсвязывающая молекула «перекрестно конкурируют» с эталонным антителом или его антигенсвязывающей молекулой, если взаимодействие между антигеном и первой связывающей молекулой, антителом или его антигенсвязывающей молекулой блокирует, ограничивает, ингибирует или иным образом снижает способность эталонной связывающей молекулы, эталонного антитела или его антигенсвязывающей молекулы взаимодействовать с антигеном. Перекрестная конкуренция может быть полной, например, связывание связывающей молекулы с антигеном полностью блокирует способность эталонной связывающей молекулы связывать антиген, или она может быть частичной, например, связывание связывающей молекулы с антигеном снижает способность эталонной связывающей молекулы связывать антиген. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывает тот же или перекрывающийся эпитоп, что и эталонная антигенсвязывающая молекула. В других вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывает другой эпитоп, нежели эталонная антигенсвязывающая молекула. Для определения того, конкурирует ли одна антигенсвязывающая молекула с другой, можно использовать множество типов анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA); твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA); сэндвич-конкурентный анализ (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ прямым мечением (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазную прямую метку RIA с использованием метки 1-125 (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); и RIA с прямым мечением (Moldenhauer et al. 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82).

[0254] В рамках настоящего изобретения термины «иммуноспецифически связывается», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывается» и «специфически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител и

относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например эпитоп или иммунный комплекс), так что такое связывание понятно специалисту в данной области. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, обычно с более низкой аффинностью, что определяют с помощью, например, иммуноанализов, BIACORE®, прибора KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других анализов, известных в данной области. В конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с антигеном с КА, который по меньшей мере на 2 порядка, 2,5 порядка, 3 порядка, 4 порядка или более больше КА, когда молекулы связываются с другим антигеном.

[0255] «Антиген» относится к любой молекуле, которая вызывает иммунный ответ или способна связываться антителом или антигенсвязывающей молекулой. Иммунный ответ может включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое. специалист в данной области легко поймет, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может выступать в качестве антигена. Антиген может экспрессироваться эндогенно, то есть экспрессироваться геномной ДНК или может экспрессироваться рекомбинантно. Антиген может быть специфическим к определенной ткани, например к раковым клеткам, или он может широко экспрессироваться. Кроме того, в качестве антигенов могут выступать фрагменты более крупных молекул. В некоторых вариантах осуществления антигены представляют собой опухолевые антигены.

[0256] Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному у того же индивидуума, которому его будут позже снова вводить. Например, метод сконструированной аутологичной клеточной терапии (eACT™), описанный в данном документе, предусматривает сбор лимфоцитов у пациента, которые затем конструируют для экспрессии, например, конструкция CAR, а затем снова вводят тому же пациенту.

[0257] Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному у одного индивидуума, который затем вводят другому индивидууму того же вида, например, трансплантация аллогенных Т-клеток.

[0258] «Рак» относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые проникают в соседние ткани, а также могут давать метастазы в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки. «Рак» или «раковая ткань» может включать опухоль. Примеры рака, который можно лечить способами, раскрытыми в данном документе, включают без ограничения рак иммунной системы, включая лимфу, лейкоз, миелому и другие лейкоцитарные злокачественные новообразования. В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, можно использовать для снижения размера опухоли, происходящей, например, из рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или

внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичек, рака матки, множественной миеломы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы (NHL), первичной медиастинальной крупноклеточной лимфомы (PMBC), диффузной крупноклеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы (FL), трансформированной фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (SMZL), рака пищевода, рака тонкой кишки, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, рака уретры, рака полового члена, хронического или острого лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ALL) (включая не Т-клеточный ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, новообразования центральной нервной системы (CNS), первичной лимфомы CNS, ангиогенеза опухоли, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, рака, вызванного окружающей средой, включая рак, вызванный асбестом, других злокачественных новообразований В-клеток и комбинаций указанных видов рака. В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, могут быть использованы для уменьшения размера опухоли, происходящей, например, из саркомы и карциномы, фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, саркомы Капоши, саркомы мягких тканей и других сарком, синовиом, мезотелиом, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, карциномы толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака легких, колоректального рака, плоскоклеточного рака, базальноклеточного рака, аденокарциномы (например аденокарциномы поджелудочной железы, толстой кишки, яичников, легких, молочной железы, желудка, предстательной железы, шейки матки или пищевода), карциномы потовых желез, карциномы сальных желез, папиллярной карциномы, папиллярной аденокарциномы, медуллярной карциномы, бронхогенной карциномы, почечно-клеточной карциномы, гепатомы, карциномы желчных протоков, хориокарциномы, опухоли Вильмса, рака шейки матки, опухоли яичка, рака мочевого пузыря, рака фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, рака шейки матки, рака влагалища, рака вульвы, рака почечной лоханки, опухолей CNS (таких как глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиомы, менингиомы, меланомы, нейробластома и ретинобластома). Конкретный рак может реагировать на химио- или лучевую терапию, или рак может быть рефрактерным. Рефрактерный рак относится к раку, который не поддается хирургическому вмешательству, и рак либо изначально не реагирует на химио- или лучевую терапию, либо рак становится невосприимчивым с течением времени.

[0259] «Противоопухолевый эффект» в рамках настоящего изобретения относится к

биологическому эффекту, который может проявляться в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, уменьшения пролиферации опухолевых клеток, уменьшения количества метастазов, увеличение общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования, увеличения продолжительности жизни или улучшения различных физиологических симптомов, связанных с опухолью. Противоопухолевый эффект может также относиться к предотвращению возникновения опухоли, например к вакцине.

[0260] В рамках настоящего изобретения «цитокин» относится к белку, не являющемуся антителом, который высвобождается одной клеткой в ответ на контакт со специфическим антигеном, причем цитокин взаимодействует со второй клеткой, опосредуя ответ во второй клетке. «Цитокин» в рамках настоящего изобретения относится к белкам, высвобождаемым одной клеточной популяцией, которые действуют на другую клетку как межклеточные медиаторы. цитокин можно эндогенно экспрессировать с помощью клетки или вводить субъекту. Цитокины могут высвободиться иммунными клетками, включая макрофаги, В-клетки, Т-клетки, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы и тучные клетки, для распространения иммунного ответа. Цитокины могут вызывать различные ответы в реципиентной клетке. Цитокины могут включать гомеостатические цитокины, хемокины, провоспалительные цитокины, эффекторы и белки острой фазы. Например, гомеостатические цитокины, включая интерлейкин (IL) 7 и IL-15, способствуют выживанию и пролиферации иммунных клеток, а провоспалительные цитокины могут способствовать воспалительной реакции. Примеры гомеостатических цитокинов включают без ограничения IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15 и интерферон (IFN) гамма. Примеры провоспалительных цитокинов включают без ограничения IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-13, IL-17a, IL-23, IL-27, фактор некроза опухоли (TNF)-альфа, TNF-бета, фактор роста фибробластов (FGF) 2, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), растворимую молекулу межклеточной адгезии 1 (sICAM-1), растворимую молекулу сосудистой адгезии 1 (sVCAM-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста (PLGF). Примеры эффекторов включают без ограничения гранзим А, гранзим В, растворимый лиганд Fas (sFasL), TGF-бета, IL-35 и перфорин. Примеры белков острой фазы включают без ограничения С-реактивный белок (CRP) и сывороточный амилоид А (SAA).

[0261] Термин «лимфоцит» в рамках настоящего изобретения включает в себя природные клетки-киллеры (NK), Т-клетки или В-клетки. NK-клетки представляют собой тип цитотоксических (клеточно-токсических) лимфоцитов, которые представляют собой главный компонент врожденной иммунной системы. NK-клетки отторгают опухоли и клетки, инфицированные вирусами. Он работает через процесс апоптоза или запрограммированной гибели клеток. Их назвали «природными киллерами», потому что они не требуют активации для уничтожения клеток. Т-клетки играют важную роль в клеточно-опосредованном иммунитете (без участия антител). Т-клеточные рецепторы (TCR) отличают Т-клетки от других типов лимфоцитов. Тимус, специализированный орган

иммунной системы, является основным местом созревания Т-клеток. Существует множество типов Т-клеток, включая: хелперные Т-клетки (например CD4+ клетки), цитотоксические Т-клетки (также известные как ТС, цитотоксические Т-лимфоциты, CTL, Т-киллеры, цитотоксические Т-клетки, CD8+ Т-клетки или Т-клетки-киллеры), Т-клетки памяти ((i) стволовые клетки памяти (TSCM), как и наивные клетки, представляют собой CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+ (L-селектин), CD27+, CD28+ и IL-7Ra+, но также экспрессируют большое количество CD95, IL-2R, CXCR3 и LFA-1 и демонстрируют множество функциональных признаков, характерных для клеток памяти); (ii) центральные клетки памяти (TCM) экспрессируют L-селектин и CCR7, они секретируют IL-2, но не IFN γ или IL-4 и (iii) эффекторные клетки памяти (TEM), однако не экспрессируют L-селектин или CCR7, но продуцируют эффекторные цитокины, такие как IFN γ и IL-4), регуляторные Т-клетки (Treg, супрессорные Т-клетки или CD4+CD25+ или CD4+ FoxP3+ регуляторные Т-клетки), природные Т-клетки-киллеры (NKT) и гамма дельта Т-клетки. В-клетки, с другой стороны, играют основную роль в гуморальном иммунитете (с участием антител). В-клетки вырабатывают антитела, способны действовать как антигенпрезентирующие клетки (APC) и превращаться в В-клетки памяти и плазматические клетки, как короткоживущие, так и долгоживущие, после активации за счет взаимодействия с антигеном. У млекопитающих в костном мозге образуются незрелые В-клетки.

[0262] Термин «генно-сконструированный» или «сконструированный» относится к способу модификации генома клетки, включая без ограничения удаление кодирующей или некодирующей области или ее части или вставку кодирующей области или его части. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка представляет собой лимфоцит, например Т-клетку, которую можно получить либо от пациента, либо от донора. Клетка может быть модифицирована для экспрессии экзогенной конструкции, такой как, например, химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), который встроен в геном клетки.

[0263] «Иммунный ответ» относится к действию клеток иммунной системы (например Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, природных клеток-киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любыми из этих клеток или печенью (включая Ab, цитокины и комплемент), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или элиминации из организма позвоночных вторгшихся патогенов, зараженных клеток или тканей с патогенами, раковыми или другими аномальными клетками или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, с нормальными клетками или тканями человека.

[0264] В рамках настоящего изобретения «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в сочетании с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к Т-клеточному ответу, такому как без ограничения пролиферация и/или повышающая или понижающая регуляция ключевых молекул.

[0265] В рамках настоящего изобретения «костимулирующий лиганд» включает

молекулу на антигенпрезентирующей клетке, которая специфически связывает родственную костимулирующую молекулу на Т-клетке. Связывание костимулирующего лиганда обеспечивает сигнал, который опосредует Т-клеточный ответ, включая без ограничения пролиферацию, активацию, дифференцировку и тому подобное. Костимулирующий лиганд индуцирует сигнал, который является дополнением к первичному сигналу, обеспечиваемому стимулирующей молекулой, например, путем связывания комплекса Т-клеточный рецептор (TCR)/CD3 с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС), нагруженной пептидом. Костимулирующий лиганд может включать без ограничения 3/TR6, лиганд 4-1ВВ, агонист или антитело, которое связывает Toll-подобный рецептор, В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), лиганд CD30, CD40, CD7, CD70, CD83, медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), ILT4, иммуноглобулиноподобный транскрипт (ILT) 3, индуцибельный костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), лиганд, который специфически связывается с В7-Н3, рецептор лимфотоксина бета, белок А, родственный цепи МНС класса I (MICA), белок В, родственный цепи МНС класса I (MICB), лиганд OX40, PD-L2 или лиганд запрограммированной смерти (PD). Костимулирующий лиганд включает без ограничения антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как без ограничения 4-1ВВ, В7-Н3, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD7, ICOS, лиганд, который специфически связывается с CD83, антигеном-1, ассоциированным с функцией лимфоцитов (LFA-1), рецептором естественных клеток-киллеров С (NKG2C), OX40, PD-1 или членом суперсемейства фактора некроза опухоли 14 (TNFSF14 или LIGHT).

[0266] «Костимулирующая молекула» представляет собой родственного партнера по связыванию на Т-клетке, которая специфически связывается с костимулирующим лигандом, таким образом опосредуя костимулирующий ответ Т-клетки, такой как без ограничения пролиферация. Костимулирующие молекулы включают без ограничения 4-1ВВ/CD137, В7-Н3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD 33, CD 45, CD100 (SEMA4D), CD103, CD134, CD137, CD154, CD16, CD160 (BY55), CD 18, CD19, CD19a, CD2, CD22, CD247, CD27, CD276 (В7-Н3), CD28, CD29, CD3 (альфа; бета; дельта; эпсилон; гамма; дзета), CD30, CD37, CD4, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD5, CD64, CD69, CD7, CD80, лиганда CD83, CD84, CD86, CD8альфа, CD8бета, CD9, CD96 (Tactile), CD1-1a, CD1-1b, CD1-1c, CD1-1d, CDS, CEACAM1, CRT AM, DAP-10, DNAM1 (CD226), Fc-гамма рецептор, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, ICOS, Ig альфа (CD79a), IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, интегрин, ITGA4, ITGA4, ITGA6, IT GAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, LIGHT, LIGHT (член суперсемейства фактора некроза опухоли 14; TNFSF14), LTBR, Ly9 (CD229), антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1 (CD1 1a/CD18), молекулу МНС класса I, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX40, PAG/Cbp, PD-1, PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальную молекулу активации лимфоцитов, SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Ly108), SLAMF7, SLP-

76, TNF, TNFr, TNFR2, рецептор лиганда Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6 или фрагменты, усечения или их комбинации.

[0267] Выражения «идентичность последовательности» или, например, включающие «последовательность, идентичную на 50%» в рамках настоящего изобретения относятся к степени, в которой последовательности идентичны по нуклеотидам или по аминокислотам в окне сравнения. Таким образом, «процент идентичности последовательности» можно рассчитать путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определяя количество положений, в которых одинаковые основания нуклеиновой кислоты (например A, T, C, G, U) или идентичный аминокислотный остаток (например Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречается в обоих последовательностей, чтобы получить количество совпадающих положений, разделив количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения (то есть размер окна) и умножив результат на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. Включены нуклеотиды и полипептиды, содержащие по меньшей мере примерно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из эталонных последовательностей, описанных в настоящем документе, обычно, когда в случае полипептидов вариант полипептида сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность эталонного полипептида.

[0268] В рамках настоящего изобретения термин «вакцина» относится к композиции для создания иммунитета для профилактики и/или лечения заболеваний. Соответственно, вакцины представляют собой лекарственные средства, которые содержат антигены и предназначены для применения у людей или животных для создания специфических защитных и защитных веществ при введении человеку или животному.

[0269] В рамках настоящего изобретения термин «неоантиген» относится к классу опухолевых антигенов, которые возникают в результате опухолеспецифических мутаций в экспрессируемом белке.

2. Векторы, предшественник РНК и кольцевая РНК

[0270] В данном документе также представлены кольцевые РНК, предшественники РНК, которые могут циркуляризоваться в кольцевую РНК и векторы (например ДНК-векторы), которые могут быть транскрибированы в предшественники РНК или кольцевые РНК.

[0271] В некоторых аспектах в данном документе представлены полинуклеотиды кольцевой РНК, содержащие 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга, необязательно первый спейсер, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), последовательность экспрессии, необязательно второй спейсер и 5'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления эти области расположены в таком порядке. В некоторых вариантах осуществления кольцевую РНК получают способом, представленным в данном документе, или из вектора, представленного в данном документе.

[0272] В некоторых вариантах осуществления транскрипция вектора, представленного в данном документе (например содержащего 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, необязательно первый спейсер, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, вторую последовательность экспрессии, необязательно второй спейсер, 5'-фрагмент интрона группы I и 3'-образующую дуплекс область), приводит к образованию предшественника полинуклеотида линейной РНК, способной циркуляризоваться. В некоторых вариантах осуществления этот полинуклеотид-предшественник линейной РНК циркуляризуется при инкубации в присутствии нуклеотида или нуклеозида гуанозина (например GTP) и двухвалентного катиона (например Mg^{2+}).

[0273] В некоторых вариантах осуществления векторы и полинуклеотиды-предшественники РНК, представленные в данном документе, содержат первую (5') образующую дуплекс область и вторую (3') образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая образующие дуплексы области могут образовывать совершенные или несовершенные дуплексы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% первой и второй образующих дуплексы областей могут быть образованы парами оснований друг с другом. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что образующие дуплекс области имеют менее 50% (например менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%) пар оснований с непредусмотренными последовательностями в РНК (например с последовательностями не образующих дуплекс областей). В некоторых вариантах осуществления, включая такие образующие дуплексы области на концах цепи предшественника РНК и соседние или очень близкие к фрагменту интрона группы I, сближают фрагменты интрона группы I друг с другом, повышая эффективность сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину от 3 до 100 нуклеотидов (например длину 3-75 нуклеотидов, длину 3-50 нуклеотидов, длину 20-50 нуклеотидов, длину 35-50 нуклеотидов, длину 5-25 нуклеотидов, длину 9-19 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области длину 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину от приблизительно 9 до приблизительно 50 нуклеотидов. В одном варианте осуществления образующие дуплексы области имеют длину от приблизительно 9 до приблизительно 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину от приблизительно 20 до приблизительно 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину приблизительно 30 нуклеотидов.

[0274] Два типа спейсеров были разработаны для улучшения циркуляризации предшественника РНК и/или экспрессии генов из кольцевой РНК. Первый тип спейсера -

внешний спейсер, то есть присутствующий в предшественнике РНК, но удаляемый при циркуляризации. Не желая быть связанными теорией, предполагается, что внешний спейсер может улучшить опосредованную рибозимом циркуляризацию за счет сохранения структуры самого рибозима и предотвращения вмешательства других соседних элементов последовательности в его укладку и функцию. Второй тип спейсера - внутренний спейсер, то есть присутствующий в предшественнике РНК и сохраняющийся в итоговой кольцевой РНК. Не желая быть связанными теорией, предполагается, что внутренний спейсер может улучшить опосредованную рибозимом циркуляризацию за счет сохранения структуры самого рибозима и предотвращения вмешательства других соседних элементов последовательности, особенно соседнего IRES и кодирующей области, в его укладку и функцию. Также предполагается, что внутренний спейсер может улучшать экспрессию белка из IRES, предотвращая гибридизацию соседних элементов последовательности, в частности элементов интронов, с последовательностями внутри IRES и ингибируя его способность складываться в наиболее предпочтительную и активную конформацию.

[0275] В некоторых вариантах осуществления векторы, предшественник РНК и кольцевая РНК, предложенные в настоящем документе, содержат первый (5') и/или второй (3') спейсер. В некоторых вариантах осуществления включение спейсера между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES может сохранять вторичные структуры в этих областях, предотвращая их взаимодействие, тем самым повышая эффективность сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления первый (между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES) и второй (между последовательностями экспрессии и 5'-фрагментом интрона группы I) спейсеры содержат дополнительные области образования пар оснований, которые, по прогнозам, образуют пары оснований друг с другом, а не первую и вторую области формирования дуплекса. В некоторых вариантах осуществления такое спаривание оснований спейсера приводит фрагменты интрона группы I в непосредственную близость друг к другу, дополнительно повышая эффективность сплайсинга. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления комбинация образования пар оснований между первой и второй формирующими дуплекс областями и отдельно образования пар оснований между первым и вторым спейсерами способствует образованию сплайсингового пузыря, содержащего фрагменты интронов группы I, фланкированные соседними областями образования пар оснований. Типичные спейсеры представляют собой непрерывные последовательности с одним или несколькими из следующих качеств: 1) предполагается, что они не будут мешать проксимальным структурам, например, IRES, последовательностям экспрессии или интрону; 2) имеет длину не менее 7 и не более 100 нуклеотидов; 3) расположен после и рядом с 3'-фрагментом интрона и/или перед и рядом с 5'-фрагментом интрона; и 4) содержит один или несколько из следующих компонентов: а) неструктурированную область длиной не менее 5 нуклеотидов, б) область образования пар оснований длиной не менее 5 нуклеотидов с дистальной последовательностью, содержащей другой спейсер, и с) структурированную область по меньшей мере 7 нуклеотидов, ограниченную последовательностью спейсера. Спейсеры могут иметь несколько областей, включая

неструктурированную область, область образования пар оснований, шпильку/структурированную область и их комбинации. В варианте осуществления спейсер имеет структурированную область с высоким содержанием GC. В одном варианте осуществления область в основании спейсера соединяется с другой областью того же спейсера. В одном варианте осуществления область в основании спейсера соединяется с областью внутри другой спейсера. В одном варианте осуществления спейсер содержит одну или несколько шпилечных структур. В одном варианте осуществления спейсер содержит одну или несколько шпилечных структур со стеблем из 4-12 нуклеотидов и петель из 2-10 нуклеотидов. В одном варианте осуществления имеется дополнительный спейсер между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES. В одном варианте осуществления этот дополнительный спейсер предотвращает вмешательство структурированных областей IRES в сворачивание 3'-фрагмента интрона группы I или уменьшает степень, в которой это происходит. В некоторых вариантах осуществления длина 5'-последовательности спейсера составляет по меньшей мере 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность спейсера имеет длину не более 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина 5'-последовательности спейсера составляет от 5 до 50, от 10 до 50, от 20 до 50, от 20 до 40 и/или от 25 до 35 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность спейсера имеет длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В одном варианте осуществления 5'-последовательность спейсера представляет собой последовательность polyA. В другом варианте осуществления последовательность 5'-спейсера представляет собой последовательность polyAC. В одном варианте осуществления спейсер содержит приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% polyAC. В одном варианте осуществления спейсер содержит приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% полипиримидина (C/T или C/U).

[0276] В некоторых вариантах осуществления 3'-фрагмент интрона группы I представляет собой смежную последовательность, гомологичную по меньшей мере на 75% (например гомологичную по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) 3'-проксимальному фрагменту природного интрона группы I, включая 3'-динуклеотид участка сплайсинга и необязательно соседнюю последовательность экзона длиной по меньшей мере 1 нуклеотид (например длиной по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов) и не больше длины экзона. Обычно 5'-фрагмент интрона группы I представляет собой смежную последовательность гомологичную по меньшей мере на 75% (например гомологичную по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) 5'-проксимальному фрагменту природного интрона группы I, включая 5'-динуклеотид участка сплайсинга и необязательно соседнюю последовательность экзона длиной по меньшей мере 1 нуклеотид (например длиной по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15,

20, 25 или 30 нуклеотидов) и не больше длины экзона. Как описано у Umekage et al. (2012), внешние участки 3'-фрагмента интрона группы I и 5'-фрагмента интрона группы I удаляют при циркуляризации, что является причиной того, что кольцевая РНК, представленная в данном документе, содержит только участок 3'-фрагмента интрона группы I, образованный необязательной последовательностью экзона длиной по меньшей мере 1 нуклеотид, и 5'-фрагмент интрона группы I, образованный необязательной последовательностью экзона длиной по меньшей мере 1 нуклеотид, если такие последовательности присутствовали в нециркуляризованном предшественнике РНК. Часть 3'-фрагмента интрона группы I, которая сохраняется в кольцевой РНК, в данном документе называется «3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга». Часть 5'-фрагмента интрона группы I, которая сохраняется в кольцевой РНК, в данном документе называется «5'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга».

[0277] В некоторых вариантах осуществления векторы, предшественник РНК и кольцевая РНК, представленные в данном документе, содержат сайт внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение IRES обеспечивает трансляцию одной или нескольких открытых рамок считывания с кольцевой РНК (например открытых рамок считывания, которые образуют последовательности экспрессии). Элемент IRES притягивает эукариотический рибосомный комплекс инициации трансляции и способствует инициации трансляции. См., например, Kaufman et al., *Nuc. Acids Res.* (1991) 19:4485-4490; Gurtu et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1996) 229:295-298; Rees et al., *BioTechniques* (1996) 20: 102-110; Kobayashi et al., *BioTechniques* (1996) 21:399-402; and Mosser et al., *BioTechniques* 1997 22 150-161.

[0278] Доступно множество последовательностей IRES, которые включают последовательности, полученные из большого множества вирусов, например, из лидерных последовательностей Picornaviruses, таких как UTR вируса энцефаломиокардита (EMCV) (Jang et al., *J. Virol.* (1989) 63: 1651-1660), лидерная последовательность полиомиелита, лидерная последовательность вируса hepatitis A, IRES вируса hepatitis C, человека Rhinovirus тип 2 IRES (Dobrikova et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 100(25): 15125- 15130), элемент IRES из вируса ящура (Ramesh et al., *Nucl. Acid Res.* (1996) 24:2697-2700), IRES giardiavirus (Garlapati et al., *J. Biol. Chem.* (2004) 279(5):3389-3397) и тому подобное.

[0279] В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой последовательность IRES вируса синдрома Таура, вируса Triatoma, вируса энцефаломиелита Тейлера, вируса обезьян 40, вируса *Solenopsis invicta* 1, вируса *Rhopalosiphum padi*, вируса ретикулоэндотелиоза, полиовируса человека 1, кишечного вируса *Plautia stali*, вируса Kashmir bee, rhinovirus человека 2, вируса *Homalodisca coagulata* 1, вируса иммунодефицита человека 1 типа, вируса Himetobi P, вируса гепатита C, вируса гепатита A, вируса гепатита GB, вируса ящура, Enterovirus человека 71, вируса ринита лошадей, вируса наподобие Picornavirus Ectropпредставляет Obliqua, вируса Encephalomyocarditis, вируса дрозифилы C, вируса коксаки человека B3, tobamovirus крестоцветных, вируса паралича сверчков, вируса вирусной диареи крупного рогатого

скота 1, вируса черной маточницы, вируса летального паралича тли, вируса птичьего энцефаломиелита, вируса острого паралича пчел, вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, вируса классической чумы свиней, FGF2 человека, SFTPA1 человека, AML1/RUNX1 человека, *Drosophila antennapedia*, AQP4 человека, AT1R человека, BAG-1 человека, BCL2 человека, BIP человека, c-IAP1 человека, c-мус человека, eIF4G человека, NDST4L мыши, LEF1 человека, HIF1 альфа мыши, n.мус человека, Gtx мыши, p27kipl человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, *Drosophila reaper*, Собачий Scamper, Ubx дрозофилы, UNR человека, UtrA мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, *Drosophila hairless*, *S. cerevisiae* TFIID, *S. cerevisiae* YAP1, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, Picobirnavirusa, HCV QC64, Cosavirus E/D человека, Cosavirus F человека, Cosavirus JMY человека, rhinovirus NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, salivirus A SH1, salivirus FHB, salivirusNG-J1, Parechovirus человека 1, Crohivirus B, Yc-3, Rosavirus M-7, Shanbavirus A, Pasivirus A, Pasivirus A 2, Echovirus E14, Parechovirus человека 5, вируса Aichi, вируса гепатита A HA16, Phopivirus, CVA10, Enterovirus C, Enterovirus D, Enterovirus J, Pegivirus человека 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, Pegivirus A 1220, Pasivirus A 3, Sapelovirus, Rosavirus B, вируса Bakunsa, Tremovirus A, Swine Pasivirus 1, PLV-CHN, Pasivirus A, Sicinivirus, Hepacivirus K, Hepacivirus A, BVDV1, вируса пограничной болезни, BVDV2, CSFV-PK15C, SF573 Dicistrovirus, вируса наподобие Picorna Hubei, CRPV, salivirus A BN5, salivirus A BN2, salivirus A 02394, salivirus A GUT, salivirus A CH, salivirus A SZ1, salivirus FHB, CVB3, CVB1, Echovirus 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 или аптамера eIF4G.

[0280] для управления экспрессией белка кольцевая РНК содержит IRES, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок. Иллюстративные последовательности IRES представлены в таблице 17 ниже. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, раскрытая в данном документе, содержит последовательность IRES, идентичную по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности IRES в таблице 17. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, раскрытая в данном документе, содержит последовательность IRES в таблице 17. В данном документе раскрыты модификации IRES и дополнительные последовательности для повышения или уменьшения активности IRES, например, путем усечения 5'-и/или 3'-концов IRES, добавления спейсера 5' IRES, модификации 6 нуклеотидов 5' к участку инициации трансляции (последовательность Kozak), модификации альтернативных участков инициации трансляции и создания химерных/гибридных последовательностей IRES. В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES в кольцевой РНК, раскрытая в данном документе, содержит одну или несколько этих модификаций по сравнению с нативным IRES (например нативным IRES, раскрытым в таблице 17).

[0281] Доступно множество последовательностей IRES, которые включают последовательности, полученные из большого множества вирусов, например, из лидерных

последовательностей Picornaviruses, таких как UTR вируса энцефаломиокардита (EMCV) (Jang et al. J. Virol. (1989) 63: 1651-1660), лидерной последовательности полиомиелита, лидерной последовательности вируса hepatitis A, IRES вируса hepatitis C, IRES Rhinovirus человека тип 2 (Dobrikova et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2003) 100(25): 15125- 15130), элемент IRES из вируса ящура (Ramesh et al., Nucl. Acid Res. (1996) 24:2697-2700), IRES giardiavirus (Garlapati et al., J. Biol. Chem. (2004) 279(5):3389-3397) и тому подобное.

[0282] В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой последовательность IRES вируса синдрома Таура, вируса Triatoma, вируса энцефаломиелита Тейлера, вируса обезьян 40, вируса Solenopsis invicta 1, вируса Rhopalosiphum padi, вируса ретикулоэндотелиоза, полиовируса человека 1, кишечного вируса Plautia stali, вируса Kashmir bee, rhinovirus человека 2, вируса Homalodisca coagulata 1, вируса иммунодефицита человека 1 типа, вируса Himetobi P, вируса гепатита C, вируса гепатита A, вируса гепатита GB, вируса ящура, Enterovirus человека 71, вируса ринита лошадей, вируса наподобие Picornavirus Ectropпредставляет Obliqua, вируса Encerphalomyocarditis, вируса дрозофилы C, вируса коксаки человека B3, tobamovirus крестоцветных, вируса паралича сверчков, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 1, вируса черной маточницы, вируса летального паралича тли, вируса птичьего энцефаломиелита, вируса острого паралича пчел, вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, вируса классической чумы свиней, FGF2 человека, SFTPA1 человека, AML1/RUNX1 человека, Drosophila antennapedia, AQP4 человека, AT1R человека, BAG-1 человека, BCL2 человека, BiP человека, c-IAP1 человека, c-мус человека, eIF4G человека, NDST4L мыши, LEF1 человека, HIF1 альфа мыши, n.мус человека, Gtx мыши, p27kipl человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, Drosophila reaper, Собачий Scamper, Ubx дрозофилы, UNR человека, UtrA мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, Drosophila hairless, S. cerevisiae TFIID, S. cerevisiae YAP1, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, Picobirnavirusa, HCV QC64, Cosavirus E/D человека, Cosavirus F человека, Cosavirus JMY человека, rhinovirus NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, salivirus A SH1, salivirus FHB, salivirusNG-J1, Parechovirus человека 1, Crohivirus B, Yc-3, Rosavirus M-7, Shanbavirus A, Pasivirus A, Pasivirus A 2, Echovirus E14, Parechovirus человека 5, вируса Aichi, вируса гепатита A HA16, Phopivirus, CVA10, Enterovirus C, Enterovirus D, Enterovirus J, Pegivirus человека 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, Pegivirus A 1220, Pasivirus A 3, Sapelovirus, Rosavirus B, вируса Bakunsa, Tremovirus A, Swine Pasivirus 1, PLV-CHN, Pasivirus A, Sicinivirus, Hepacivirus K, Hepacivirus A, BVDV1, вируса пограничной болезни, BVDV2, CSFV-PK15C, SF573 Dicistrovirus, вируса наподобие Picorna Hubei, CRPV, salivirus A BN5, salivirus A BN2, salivirus A 02394, salivirus A GUT, salivirus A CH, salivirus A SZ1, salivirus FHB, CVB3, CVB1, Echovirus 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 или аптамера eIF4G.

[0283] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды в данном документе содержат более одной последовательности экспрессии. В некоторых вариантах

осуществления кольцевая РНК представляет собой бицистронную РНК. Последовательности, кодирующие два или более полипептида, могут быть разделены элементом проскока рибосомы или нуклеотидной последовательностью, кодирующей сайт расщепления протеазы. В некоторых вариантах осуществления элемент проскока рибосомы кодирует пептид 2А вируса *thosa-asigna* (T2A), пептид 2 А *Teschovirus-1* свиней (P2A), пептид 2 А вируса ящура (F2A), пептид 2А *vims* ринита А лошадей (E2A), пептид 2А *vims* цитоплазматического полиэдроза (*BmCPV 2A*) или пептид 2А *flacherie vims B. mori* (*BmIFV 2A*).

[0284] В некоторых вариантах осуществления векторы, представленные в настоящем документе, содержат 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR происходит от бета-глобина человека, альфа-глобина человека, бета-глобина хенорус, альфа-глобина хенорус, пролактина человека, GAP-43 человека, eEF1a1 человека, тау-белка человека, TNF α человека, вируса *dengue*, малой мРНК *hantavirus*, малой мРНК *bunyavirus*, вируса желтой мозаики репы, вируса гепатита С, вируса краснухи, вируса табачной мозаики, IL-8 человека, актина человека, GAPDH человека, тубулина человека, вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, посттрансляционно регулируемого элемента вируса гепатита сурка, вируса *sindbis*, вирус морщинистости репы, вируса гравировки табака или вируса венесуэльского лошадиного энцефалита.

[0285] В некоторых вариантах осуществления векторы, представленные в настоящем документе, содержат 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR происходит от бета-глобина человека, бета-глобина *Xenopus laevis*, альфа-глобина человека, альфа-глобина *Xenopus laevis*, вируса краснухи, вируса табачной мозаики, мышинового Gtx, вируса *dengue*, белка теплового шока 70 кДа, белка 1А, дегидрогеназы денатурированного никотином этилового спирта, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы или трехкомпонентной лидерной последовательности аденовируса.

[0286] В некоторых вариантах осуществления вектор, представленный в настоящем документе, содержит область polyA, внешнюю по отношению к 3'- и/или 5'-фрагментам интрона группы I. В некоторых вариантах осуществления область polyA имеет длину по меньшей мере 15, 30 или 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одна или обе области polyA имеют длину 15-50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одна или обе области polyA имеют длину 20-25 нуклеотидов. Последовательность polyA удаляют при циркуляризации. Таким образом, олигонуклеотид, гибридизующийся с последовательностью polyA, такой как дезокситиминовый олигонуклеотид (олиго(dT)), конъюгированный с твердой поверхностью (например смолой), можно использовать для отделения кольцевой РНК от ее предшественника РНК. Другие последовательности также могут быть расположены 5'-3' фрагмента интрона группы I или 3'-5' фрагмента интрона группы I, и комплементарная последовательность может быть аналогичным образом использована для кольцевой очистки РНК.

[0287] В некоторых вариантах осуществления ДНК (например вектор), линейная РНК (например предшественник РНК) и/или полинуклеотид кольцевой РНК,

представленные в данном документе, имеют длину между 300 и 15000, 300 и 14000, 300 и 13000, 300 и 12000, 300 и 11000, 300 и 10000, 400 и 9000, 500 и 8000, 600 и 7000, 700 и 6000, 800 и 5000, 900 и 5000, 1000 и 5000, 1100 и 5000, 1200 и 5000, 1300 и 5000, 1400 и 5000 и/или 1500 и 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина полинуклеотида составляет по меньшей мере 300 нуклеотидов, 400 нуклеотидов, 500 нуклеотидов, 600 нуклеотидов, 700 нуклеотидов, 800 нуклеотидов, 900 нуклеотидов, 1000 нуклеотидов, 1100 нуклеотидов, 1200 нуклеотидов, 1300 нуклеотидов, 1400 нуклеотидов, 1500 нуклеотидов, 2000 нуклеотидов, 2500 нуклеотидов, 3000 нуклеотидов, 3500 нуклеотидов, 4000 нуклеотидов, 4500 нуклеотидов, 5000 нуклеотидов, 6000 нуклеотидов, 7000 нуклеотидов, 8000 нуклеотидов, 9000 нуклеотидов, 10000 нуклеотидов, 11000 нуклеотидов, 12000 нуклеотидов, 13000 нуклеотидов, 14000 нуклеотидов или 15000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина полинуклеотида составляет не более 3000 нуклеотидов, 3500 нуклеотидов, 4000 нуклеотидов, 4500 нуклеотидов, 5000 нуклеотидов, 6000 нуклеотидов, 7000 нуклеотидов, 8000 нуклеотидов, 9000 нуклеотидов, 10000 нуклеотидов, 11000 нуклеотидов, 12000 нуклеотидов, 13000 нуклеотидов, 14000 нуклеотидов, 15000 нуклеотидов или 16000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина ДНК, линейной РНК и/или полинуклеотида кольцевой РНК, представленных в данном документе, составляет приблизительно 300 нуклеотидов, 400 нуклеотидов, 500 нуклеотидов, 600 нуклеотидов, 700 нуклеотидов, 800 нуклеотидов, 900 нуклеотидов, 1000 нуклеотидов, 1100 нуклеотидов, 1200 нуклеотидов, 1300 нуклеотидов, 1400 нуклеотидов, 1500 нуклеотидов, 2000 нуклеотидов, 2500 нуклеотидов, 3000 нуклеотидов, 3500 нуклеотидов, 4000 нуклеотидов, 4500 нуклеотидов, 5000 нуклеотидов, 6000 нуклеотидов, 7000 нуклеотидов, 8000 нуклеотидов, 9000 нуклеотидов, 10000 нуклеотидов, 11000 нуклеотидов, 12000 нуклеотидов, 13000 нуклеотидов, 14000 нуклеотидов или 15000 нуклеотидов.

[0288] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит в следующем порядке а) 5'-образующую дуплекс область, б) 3'-фрагмент интрона группы I, с) необязательно, первую последовательность спейсера, d) IRES, e) первую последовательность экспрессии, f) полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, g) вторую последовательность экспрессии, h) необязательно, вторую последовательность спейсера, i) 5'-фрагмент интрона группы I и g) 3'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит промотор транскрипции перед 5'-образующей дуплекс областью.

[0289] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит в следующем порядке а) 5'-образующую дуплекс область, б) 3'-фрагмент интрона группы I, с) необязательно, первую последовательность спейсера, d) первый IRES, e) первую последовательность экспрессии, f) второй IRES, g) вторую последовательность экспрессии, h) необязательно, вторую последовательность спейсера, i) 5'-фрагмент интрона группы I и g) 3'-образующую

дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит промотор транскрипции перед 5'-образующей дуплекс областью.

[0290] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен предшественник РНК. В некоторых вариантах осуществления предшественник РНК представляет собой линейную РНК, получаемую путем транскрипции *in vitro* вектора, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предшественник РНК содержит в следующем порядке а) необязательно, 5'-образующую дуплекс область, б) 3'-фрагмент интрона группы I, с) необязательно, первую последовательность спейсера, d) IRES, е) первую последовательность экспрессии, f) полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, g) вторую последовательность экспрессии, h) необязательно, вторую последовательность спейсера, i) 5'-фрагмент интрона группы I и j) необязательно, 3'-образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления предшественник РНК содержит в следующем порядке а) 5'-образующую дуплекс область, б) 3'-фрагмент интрона группы I, с) необязательно, первую последовательность спейсера, d) первый IRES, е) первую последовательность экспрессии, f) второй IRES, g) вторую последовательность экспрессии, h) необязательно, вторую последовательность спейсера, i) 5'-фрагмент интрона группы I и j) 3'-образующую дуплекс область. Предшественник РНК может быть немодифицированным, частично модифицированным или полностью модифицированным.

[0291] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена кольцевая РНК. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК представляет собой кольцевую РНК, получаемую вектором, представленным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК представляет собой кольцевую РНК, получаемую путем циркуляризации предшественника РНК, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления транскрипция вектора, представленного в данном документе, приводит к образованию предшественника линейной РНК, способного циркуляризоваться. В некоторых вариантах осуществления этот полинуклеотид-предшественник линейной РНК циркуляризуется при инкубации в присутствии нуклеотида или нуклеозида гуанозина (например GTP) и двухвалентного катиона (например Mg^{2+}). В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК содержит в следующей последовательности а) первую последовательность спейсера, б) IRES, с) первую последовательность экспрессии, d) полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, е) вторую последовательность экспрессии и f) вторую последовательность спейсера. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК содержит в следующей последовательности а) 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга, б) первую последовательность спейсера, с) IRES, d) первую последовательность экспрессии, е) полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, f) вторую последовательность экспрессии и g) вторую последовательность спейсера, h) 5'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК содержит в следующей

последовательности а) первую последовательность спейсера, б) первый IRES, в) первую последовательность экспрессии, г) второй IRES, д) вторую последовательность экспрессии и е) вторую последовательность спейсера. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК дополнительно содержит участок 3'-фрагмента интрона группы I, который находится 3' от 3'-участка сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК дополнительно содержит участок 5'-фрагмента интрона группы I, который находится 5' от 5'-участка сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК имеет размер по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000 или 15000 нуклеотидов. Кольцевая РНК может быть немодифицированной, частично немодифицированной или полностью немодифицированной.

[0292] В некоторых вариантах осуществления векторы и полинуклеотиды-предшественники РНК, представленные в данном документе, содержат первую (5') образующую дуплекс область и вторую (3') образующую дуплекс область. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая области гомологии могут образовывать совершенные или несовершенные дуплексы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% первой и второй образующих дуплексы областей могут быть образованы парами оснований друг с другом. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что образующие дуплекс области имеют менее 50% (например менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%) пар оснований с непредусмотренными последовательностями в РНК (например с последовательностями не образующих дуплекс областей). В некоторых вариантах осуществления, включая такие образующие дуплексы области на концах цепи предшественника РНК и соседние или очень близкие к фрагменту интрона группы I, сближают фрагменты интрона группы I друг с другом, повышая эффективность сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину от 3 до 100 нуклеотидов (например длину 3-75 нуклеотидов, длину 3-50 нуклеотидов, длину 20-50 нуклеотидов, длину 35-50 нуклеотидов, длину 5-25 нуклеотидов, длину 9-19 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину от приблизительно 9 до приблизительно 50 нуклеотидов. В одном варианте осуществления образующие дуплексы области имеют длину от приблизительно 9 до приблизительно 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину от приблизительно 20 до приблизительно 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образующие дуплексы области имеют длину приблизительно 30 нуклеотидов.

[0293] В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, имеет более высокую функциональную стабильность, чем мРНК,

содержащая такую же последовательность экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, имеет более высокую функциональную стабильность, чем мРНК, содержащая такую же последовательность экспрессии, модификации 5m^oU, оптимизированный UTR, кэп и/или хвост polyA.

[0294] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, имеет функциональное время полужизни по меньшей мере 5 часов, 10 часов, 15 часов, 20 часов, 30 часов, 40 часов, 50 часов, 60 часов, 70 часов или 80 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, имеет функциональное время полужизни 5-80, 10-70, 15-60 и/или 20-50 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, имеет функциональное время полужизни больше (например по меньшей мере в 1,5 раза больше, по меньшей мере в 2 раза больше) времени полужизни эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, кодирующей тот же белок. В некоторых вариантах осуществления функциональное время полужизни можно оценить через обнаружение функционального синтеза белка.

[0295] В некоторых вариантах осуществления векторы, предшественник РНК и кольцевая РНК, предложенные в настоящем документе, содержат первый (5') и/или второй (3') спейсер. В некоторых вариантах осуществления включение спейсера между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES может сохранять вторичные структуры в этих областях, предотвращая их взаимодействие, тем самым повышая эффективность сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления первый (между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES) и второй (между двумя последовательностями экспрессии и 5'-фрагментом интрона группы I) спейсеры содержат дополнительные области образования пар оснований, которые, по прогнозам, образуют пары оснований друг с другом, а не с первой и второй образующими дуплексы областями. В других вариантах осуществления первый (между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES) и второй (между одной из последовательностей экспрессии и 5'-фрагментом интрона группы I) спейсеры содержат дополнительные области образования пар оснований, которые, по прогнозам, образуют пары оснований друг с другом, а не с первой и второй образующими дуплексы областями. В некоторых вариантах осуществления такое спаривание оснований спейсера приводит фрагменты интрона группы I в непосредственную близость друг к другу, дополнительно повышая эффективность сплайсинга. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления комбинация образования пар оснований между первой и второй образующими дуплексы областями и отдельно образования пар оснований между первым и вторым спейсерами способствует образованию сплайсингового пузыря, содержащего фрагменты интронов группы I, фланкированные соседними областями образования пар оснований. Типичные спейсеры представляют собой непрерывные последовательности с одним или несколькими из следующих качеств: 1) предполагается, что они не будут мешать проксимальным структурам, например, IRES, последовательностям экспрессии или интрону; 2) имеет длину не менее 7 и не более 100 нуклеотидов; 3) расположен после и рядом с 3'-фрагментом

интрона и/или перед и рядом с 5'-фрагментом интрон; и 4) содержит один или несколько из следующих компонентов: а) неструктурированную область длиной по меньшей мере 5 нуклеотидов, б) область образования пар оснований длиной по меньшей мере 5 нуклеотидов с дистальной последовательностью, включая другой спейсер, и с) структурированную область по меньшей мере 7 нуклеотидов, ограниченную последовательностью спейсера. Спейсеры могут иметь несколько областей, включая неструктурированную область, область образования пар оснований, шпильку/структурированную область и их комбинации. В варианте осуществления спейсер имеет структурированную область с высоким содержанием GC. В одном варианте осуществления область в основании спейсера соединяется с другой областью в той же спейсере. В одном варианте осуществления область в основании спейсера соединяется с областью внутри другой спейсера. В одном варианте осуществления спейсер содержит одну или несколько шпилечных структур. В одном варианте осуществления спейсер содержит одну или несколько шпилечных структур со стеблем из 4-12 нуклеотидов и петель из 2-10 нуклеотидов. В одном варианте осуществления имеется дополнительный спейсер между 3'-фрагментом интрона группы I и IRES. В одном варианте осуществления этот дополнительный спейсер предотвращает вмешательство структурированных областей IRES в сворачивание 3'-фрагмента интрона группы I или уменьшает степень, в которой это происходит. В некоторых вариантах осуществления длина 5'-последовательности спейсера составляет по меньшей мере 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность спейсера имеет длину не более 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина 5'-последовательности спейсера составляет от 5 до 50, от 10 до 50, от 20 до 50, от 20 до 40 и/или от 25 до 35 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность спейсера имеет длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В одном варианте осуществления 5'-последовательность спейсера представляет собой последовательность polyA. В другом варианте осуществления 5'-последовательность спейсера представляет собой последовательность polyAC. В одном варианте осуществления спейсер содержит приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% polyAC. В одном варианте осуществления спейсер содержит приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% полипиримидина (C/T или C/U).

[0296] В некоторых вариантах осуществления 3'-фрагмент интрона группы I представляет собой смежную последовательность, идентичную по меньшей мере на 75% (например идентичную по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) 3'-проксимальному фрагменту природного интрона группы I, включая 3'-динуклеотид участка сплайсинга и необязательно соседнюю последовательность экзона длиной по меньшей мере 1 нуклеотид (например длиной по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов) и не больше длины

экзона. Обычно 5'-фрагмент интрона группы I представляет собой смежную последовательность, идентичную по меньшей мере на 75% (например идентичную по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) 5'-проксимальному фрагменту природного интрона группы I, включая 5'-динуклеотид участка сплайсинга и необязательно соседнюю последовательность экзона длиной по меньшей мере 1 нуклеотид (например длиной по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов) и не больше длины экзона. Как описано у Umekage et al. (2012), внешние участки 3'-фрагмента интрона группы I и 5'-фрагмента интрона группы I удаляют при циркуляризации, что является причиной того, что кольцевая РНК, представленная в данном документе, содержит только участок 3'-фрагмента интрона группы I, образованный необязательной последовательностью экзона длиной по меньшей мере 1 нуклеотид, и 5'-фрагмент интрона группы I, образованный необязательной последовательностью экзона длиной по меньшей мере 1 нуклеотид, если такие последовательности присутствовали в нециркуляризованном предшественнике РНК. Часть 3'-фрагмента интрона группы I, которая сохраняется в кольцевой РНК, в данном документе называется 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга. Часть 5'-фрагмента интрона группы I, которая сохраняется в кольцевой РНК, в данном документе называется 5'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга.

[0297] В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, может иметь большую величину экспрессии, чем эквивалентная линейная мРНК, например, большую величину экспрессии через 24 часа после введения РНК в клетки. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, имеет большую величину экспрессии, чем мРНК, содержащая такую же последовательность экспрессии, модификации 5m^oU, оптимизированный UTR, кэп и/или хвост polyA.

[0298] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, имеет функциональное время полужизни по меньшей мере 5 часов, 10 часов, 15 часов, 20 часов, 30 часов, 40 часов, 50 часов, 60 часов, 70 часов или 80 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, имеет функциональное время полужизни 5-80, 10-70, 15-60 и/или 20-50 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, имеет функциональное время полужизни больше (например по меньшей мере в 1,5 раза больше, по меньшей мере в 2 раза больше) времени полужизни эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, кодирующей тот же белок. В некоторых вариантах осуществления функциональное время полужизни можно оценить через обнаружение функционального синтеза белка.

[0299] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, имеет время полужизни по меньшей мере 5 часов, 10 часов, 15 часов, 20 часов, 30 часов, 40 часов, 50 часов, 60 часов, 70 часов или 80 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в

данном документе, имеет время полужизни 5-80, 10-70, 15-60 и/или 20-50 часов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, имеет время полужизни больше (например по меньшей мере в 1,5 раза больше, по меньшей мере в 2 раза больше) времени полужизни эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, кодирующей тот же белок. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК или его фармацевтическая композиция имеет функциональное время полужизни в клетке человека больше или равное времени заданного порогового значения. В некоторых вариантах осуществления функциональное время полужизни определяют путем анализа функционального белка. Например, в некоторых вариантах осуществления функциональное время полужизни определяют путем анализа люциферазы *in vitro*, причем активность люциферазы *Gaussia* (GLuc) измеряют в среде человеческих клеток (например HepG2), экспрессирующих полинуклеотид кольцевой РНК, каждые 1, 2, 6, 12 или 24 часов в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 14 дней. В других вариантах осуществления функциональное время полужизни определяют с помощью анализа *in vivo*, причем уровни белка, закодированного последовательностью экспрессии полинуклеотида кольцевой РНК, измеряют в образцах ткани или сыворотки пациентов каждые 1, 2, 6, 12 или 24 часов в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления заданным пороговым значением является функциональное время полужизни эталонного полинуклеотида линейной РНК, содержащего такую же последовательность экспрессии, как полинуклеотид кольцевой РНК.

[0300] В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, может иметь большую величину экспрессии, чем эквивалентная линейная мРНК, например, большую величину экспрессии через 24 часа после введения РНК в клетки. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, имеет большую величину экспрессии, чем мРНК, содержащая такую же последовательность экспрессии, модификации 5m^oU, оптимизированный UTR, кэп и/или хвост polyA.

[0301]

[0302] В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, может быть менее иммуногенной, чем эквивалентная мРНК под воздействием иммунной системы организма или определенного типа иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, связана с модулированной выработкой цитокинов под воздействием иммунной системы организма или определенного типа иммунной клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, связана с уменьшением выработки TNF α , RIG-I, IL-2, IL-6, IFN γ и/или интерферона типа 1, например, IFN- β 1, под воздействием иммунной системы организма или определенного типа иммунной клетки по сравнению с мРНК, содержащей такую же последовательность экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, связана с меньшей индукцией транскрипта TNF α , RIG-I, IL-2, IL-6, IFN γ и/или интерферона

типа 1, например IFN- β 1, под воздействием иммунной системы организма или определенного типа иммунной клетки по сравнению с мРНК, содержащей такую же последовательность экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, является менее иммуногенной, чем мРНК, содержащая такие же последовательности экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, является менее иммуногенной, чем мРНК, содержащая такие же последовательности экспрессии, модификации 5moU, оптимизированный UTR, кэп и/или хвост polyA.

[0303] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, обеспечивают РНК (например siRNA) с более высокой стабильностью или функциональной стабильностью, чем эквивалентная линейная РНК, без необходимости модификации нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления способы получения РНК, в которой отсутствуют модификации нуклеотидов, дают более высокую долю полноразмерных транскриптов, чем способы получения РНК, включающие модификации нуклеотидов вследствие снижения abortивной транскрипции. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, способны давать большие (например 5 т.п.н., 6 т.п.н., 7 т.п.н., 8 т.п.н., 9 т.п.н., 10 т.п.н., 11 т.п.н., 12 т.п.н., 13 т.п.н., 14 т.п.н. Или 15 т.п.н.) конструкции РНК без добавления abortивной транскрипции, связанной с РНК, содержащей модификации нуклеотидов.

[0304] В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в данном документе, может быть трансфицирована в клетку как есть или может быть трансфицирована в форме ДНК-вектора и транскрибирована в клетке. Транскрипцию кольцевой РНК из трансфицированного ДНК-вектора можно осуществлять с помощью добавленных полимераз или полимераз, закодированных нуклеиновыми кислотами, трансфицированными в клетку или предпочтительно с помощью эндогенных полимераз.

[0305] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в данном документе, содержит модифицированные нуклеотиды РНК и/или модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления модифицированным нуклеозидом является m⁵C (5-метилцитидин). В другом варианте осуществления модифицированным нуклеозидом является m⁵U (5-метилуридин). В другом варианте осуществления модифицированным нуклеозидом является m⁶A (N⁶-метиладенозин). В другом варианте осуществления модифицированным нуклеозидом является s²U (2-тиоуридин). В другом варианте осуществления модифицированным нуклеозидом является Ψ (псевдоуридин). В другом варианте осуществления модифицированным нуклеозидом является Um (2'-O-метилуридин). В других вариантах осуществления модифицированным нуклеозидом является m¹A (1-метиладенозин); m²A (2-метиладенозин); Am (2'-O-метиладенозин); ms² m⁶A (2-метилтио-N⁶-метиладенозин); i⁶A (N⁶-изопентениладенозин); ms²i⁶A (2-метилтио-N⁶-изопентениладенозин); io⁶A (N⁶-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин); ms²io⁶A (2-метилтио-N⁶-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин); g⁶A (N⁶-глицинилкарбамоиладенозин); t⁶A (N⁶-

треонилкарбамоиладенозин); $ms^{2t^6}A$ (2-метилтио- N^6 -треонил карбамоиладенозин); $m^{6t^6}A$ (N^6 -метил- N^6 -треонилкарбамоиладенозин); hN^6A (N^6 -гидроксиновалилкарбамоиладенозин); ms^2hN^6A (2-метилтио- N^6 -гидроксиновалил карбамоиладенозин); $Ar(p)$ (2'-О-рибозиладенозин (фосфат)); I (инозин); m^1I (1-метилюинозин); m^1Im (1,2'-О-диметилюинозин); m^3C (3-метилцитидин); Cm (2'-О-метилцитидин); s^2C (2-тиоцитидин); ac^4C (N^4 -ацетилцитидин); f^5C (5-формилцитидин); m^5Cm (5,2'-О-диметилцитидин); ac^4Cm (N^4 -ацетил-2'-О-метилцитидин); k^2C (лизидин); m^1G (1-метилгуанозин); m^2G (N^2 -метилгуанозин); m^7G (7-метилгуанозин); Gm (2'-О-метилгуанозин); m^2_2G (N^2, N^2 -диметилгуанозин); m^2Gm ($N^2, 2'$ -О-диметилгуанозин); m^2_2Gm ($N^2, N^2, 2'$ -О-триметилгуанозин); $Gr(p)$ (2'-О-рибозилгуанозин(фосфат)); yW (вибутозин); o_2yW (пероксивибутозин); $OHyW$ (гидроксивибутозин); $OHyW^*$ (недомодифицированный гидроксивибутозин); imG (виозин); $mimG$ (метилвиозин); Q (квеуозин); oQ (эпоксиквеуозин); $galQ$ (галактозил-квеуозин); $manQ$ (маннозил-квеуозин); $preQ_0$ (7-циано-7-деазагуанозин); $preQ_1$ (7-аминометил-7-деазагуанозин); G^+ (археозин); D (дигидроуридин); m^5Um (5,2'-О-диметилуридин); s^4U (4-тиоуридин); m^5s^2U (5-метил-2-тиоуридин); s^2Um (2-тио-2'-О-метилуридин); acr^3U (3-(3-амино-3-карбоксивпропил)уридин); ho^5U (5-гидроксиуридин); mo^5U (5-метоксиуридин); cmo^5U (уридин 5-оксиуксусная кислота); $mcmo^5U$ (сложный метиловый эфир уридин-5-оксиуксусной кислоты); chm^5U (5-(карбоксигидроксиметил)уридин); $mchm^5U$ (сложный метиловый эфир 5-(карбоксигидроксиметил)уридина); mcm^5U (5-метоксикарбонилметилуридин); mcm^5Um (5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилуридин); mcm^5s^2U (5-метоксикарбонилметил-2-тиоуридин); nm^5s^2U (5-аминометил-2-тиоуридин); mnm^5U (5-метиламинометилуридин); mnm^5s^2U (5-метиламинометил-2-тиоуридин); mnm^5se^2U (5-метиламинометил-2-селеноуридин); ncm^5U (5-карбамоилметилуридин); ncm^5Um (5-карбамоилметил-2'-О-метилуридин); $cmnm^5U$ (5-карбоксиметиламинометилуридин); $cmnm^5Um$ (5-карбоксиметиламинометил-2'-О-метилуридин); $cmnm^5s^2U$ (5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин); m^6_2A (N^6, N^6 -диметиладенозин); Im (2'-О-метилюинозин); m^4C (N^4 -метилцитидин); m^4Cm ($N^4, 2'$ -О-диметилцитидин); hm^5C (5-гидроксиметилцитидин); m^3U (3-метилуридин); cm^5U (5-карбоксиметилуридин); m^6Am ($N^6, 2'$ -О-диметиладенозин); m^6_2Am ($N^6, N^6, O-2'$ -триметиладенозин); $m^{2,7}G$ ($N^2, 7$ -диметилгуанозин); $m^{2,2,7}G$ ($N^2, N^2, 7$ -триметилгуанозин); m^3Um (3,2'-О-диметилуридин); m^5D (5-метилдигидроуридин); f^5Cm (5-формил-2'-О-метилцитидин); m^1Gm (1,2'-О-диметилгуанозин); m^1Am (1,2'-О-диметиладенозин); tm^5U (5-тауринометилуридин); tm^5s^2U (5-тауринометил-2-тиоуридин); $imG-14$ (4-диметилвиозин); $imG2$ (изовиозин); или ac^6A (N^6 -ацетиладенозин).

[0306] В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеозид может включать соединение, выбранное из группы: пиридин-4-он рибонуклеозид, 5-аза-уридин, 2-тио-5-аза-уридин, 2-тиоуридин, 4-тио-псевдоуридин, 2-тио-псевдоуридин, 5-гидроксиуридин, 3-метилуридин, 5-карбоксиметил-уридин, 1-карбоксиметил-псевдоуридин, 5-пропинил-уридин, 1-пропинил-псевдоуридин, 5-тауринометилуридин, 1-

тауринометил-псевдоуридин, 5-тауринометил-2-тио-уридин, 1-тауринометил-4-тио-уридин, 5-метил-уридин, 1-метил-псевдоуридин, 4-тио-1-метил-псевдоуридин, 2-тио-1-метил-псевдоуридин, 1-метил-1-деаза-псевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-деаза-псевдоуридин, дигидроуридин, дигидропсевдоуридин, 2-тио-дигидроуридин, 2-тио-дигидропсевдоуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тио-уридин, 4-метокси-псевдоуридин, 4-метокси-2-тио-псевдоуридин, 5-аза-цитидин, псевдоизоцитидин, 3-метил-цитидин, N4-ацетилцитидин, 5-формилцитидин, N4-метилцитидин, 5-гидроксиметилцитидин, 1-метил-псевдоизоцитидин, пирроло-цитидин, пирроло-псевдоизоцитидин, 2-тио-цитидин, 2-тио-5-метил-цитидин, 4-тио-псевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-псевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-деаза-псевдоизоцитидин, 1-метил-1-деаза-псевдоизоцитидин, зебуларин, 5-аза-зебуларин, 5-метил-зебуларин, 5-аза-2-тио-зебуларин, 2-тио-зебуларин, 2-метокси-цитидин, 2-метокси-5-метил-цитидин, 4-метокси-псевдоизоцитидин, 4-метокси-1-метил-псевдоизоцитидин, 2-аминопурин, 2, 6-диаминопурин, 7-деаза-аденин, 7-деаза-8-аза-аденин, 7-деаза-2-аминопурин, 7-деаза-8-аза-2-аминопурин, 7-деаза-2,6-диаминопурин, 7-деаза-8-аза-2,6-диаминопурин, 1-метиладенозин, N6-метиладенозин, N6-изопентениладенозин, N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил) аденозин, N6-глицинилкарбамоиладенозин, N6-треонилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, N6,N6-диметиладенозин, 7-метиладенин, 2-метилтио-аденин, 2-метокси-аденин, инозин, 1-метил-инозин, виозин, вибутозин, 7-деаза-гуанозин, 7-деаза-8-аза-гуанозин, 6-тио-гуанозин, 6-тио-7-деаза-гуанозин, 6-тио-7-деаза-8-аза-гуанозин, 7-метил-гуанозин, 6-тио-7-метил-гуанозин, 7-метилюридин, 6-метокси-гуанозин, 1-метилгуанозин, N2-метилгуанозин, N2,N2-диметилгуанозин, 8-оксо-гуанозин, 7-метил-8-оксо-гуанозин, 1-метил-6-тио-гуанозин, N2-метил-6-тио-гуанозин и N2,N2-диметил-6-тио-гуанозин. В другом варианте осуществления модификации независимо выбирают из группы, состоящей из 5-метилцитозина, псевдоуридина и 1-метилпсевдоуридина.

[0307] В некоторых вариантах осуществления модифицированные рибонуклеозиды включают 5-метилцитидин, 5-метоксиуридин, 1-метил-псевдоуридин, N6-метиладенозин и/или псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления такие модифицированные нуклеозиды обеспечивают дополнительную стабильность и устойчивость к иммунной активации.

[0308] В отдельных вариантах осуществления полинуклеотиды могут быть кодон-оптимизированными. Кодон-оптимизированная последовательность может представлять собой последовательность, в которой кодоны в полинуклеотиде, кодирующем полипептид, были заменены для увеличения экспрессии, стабильности и/или активности полипептида. Факторы, влияющие на оптимизацию кодонов, включают без ограничения один или несколько из следующих факторов: (i) вариации систематических ошибок кодонов между двумя или более организмами или генами или синтетически сконструированные таблицы систематических ошибок, (ii) вариации степени систематических ошибок кодонов в организме, гене или наборе генов, (iii) систематическая вариация кодонов, включая

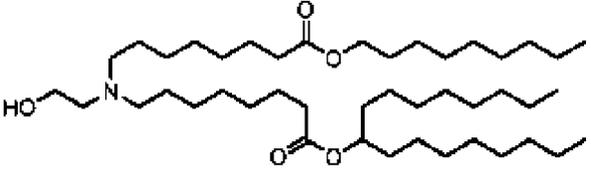
контекст, (iv) вариация кодонов в соответствии с их декодированием тРНК, (v) вариация кодонов в соответствии с GC %, либо в целом, либо в одной позиции триплета, (vi) вариации степени сходства с эталонной последовательностью, например встречающейся в природе последовательностью, (vii) вариация предельной частоты кодонов, (viii) структурные свойства мРНК, транскрибированной из последовательности ДНК, (ix) предварительное знание о функция последовательностей ДНК, на которой должен основываться дизайн набора замен кодонов, и/или (x) систематическая вариация наборов кодонов для каждой аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированный полинуклеотид может свести к минимуму коллизии рибозимов и/или ограничить структурную интерференцию между последовательностью экспрессии и IRES.

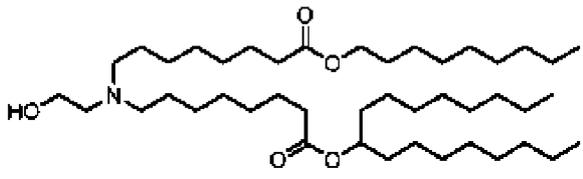
[0309] В некоторых вариантах осуществления кольцевую РНК, представленную в данном документе, получают в клетке. В некоторых вариантах осуществления предшественник РНК транскрибируют с использованием матрицы ДНК (например в некоторых вариантах осуществления с использованием вектора, представленного в данном документе) в цитоплазме с помощью РНК-полимеразы бактериофага или в ядре с помощью РНК-полимеразы хозяина, а затем циркуляризуют.

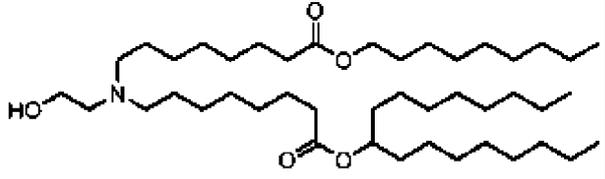
[0310] В некоторых вариантах осуществления кольцевую РНК, представленную в данном документе, вводят животному (например человеку), чтобы у животного экспрессировался полипептид, кодируемый молекулой кольцевой РНК.

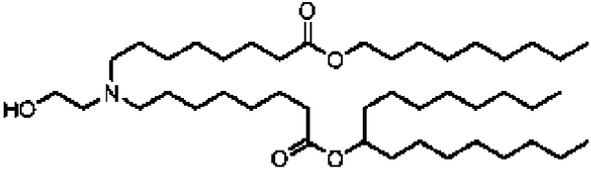
3. Полезная нагрузка

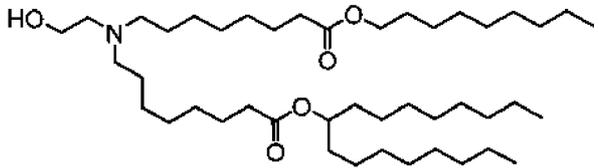
[0311] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность экспрессии кодирует терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления один или оба терапевтических белка выбраны из белков, перечисленных в следующей таблице.

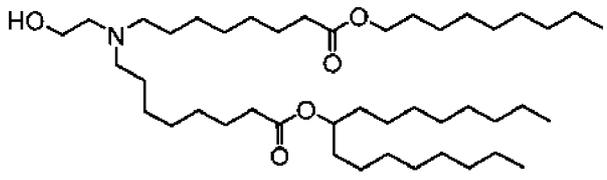
Полезная нагрузка	Последовательность	Клетка/орган-мишень	Предпочтительный состав для доставки
CD19 CAR	Любая из последовательностей 309-314	Т-клетки	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Бета-ситостерол (28,5% моль%) Холестерин (10 моль%)</p>

			PEG DMG (1,5 моль%)
BCMA CAR	MALPVTALLLPLAL LLHAARPDIVLTQS PASLAVSLGERATI NCRASESVSVIGAH LIHWYQQKPGQPPK LLIYLASNLETGVP ARFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDAAIYYC LQSRIFPRTFGQGTK LEIKGSTSGSGKPGS GEGSTKGQVQLVQ SGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTDYSI NWVRQAPGQGLE WMGWINTETREPA YAYDFRGRFVFLD TSVSTAYLQISSLKA EDTAVYYCARDYS YAMDYWGQGLV TVSSAAATTPAPR PPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIG	Т- клетки	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Бета-ситостерол (28,5% моль%) Холестерин (10 моль%) PEG DMG (1,5 моль%)</p>

	MKGERRRGKGDG LYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR		
MAGE-A4 TCR	<p>альфа-цепь TCR:</p> <p>KNQVEQSPQSLIILE GKNCTLQCNYTVSP FSNLRWYKQDTGR GPVSLTIMTFSENT KSNGRYTATLDAD TKQSSLHITASQLSD SASYICVVNHSGGS YIPTFGRGTSLIVHP YIQKPDPAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDV YITDKTVLDMRSM DFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIP EDTFFSPPESS</p> <p>бета-цепь TCR:</p> <p>DVKVTQSSRYLVK RTGEKVFLECVQD MDHENMFWYRQD PGLGLRLIYFSYDV KMKEKGDIPGYSV SREKKERFSLILESA STNQTSMYLCASSF LMTSGDPYEQYFGP GTRLTVTEDLKNVF PPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWWVNG KEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLS SRLRVSATFWQNPR</p>	Т- клетки	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Бета-ситостерол (28,5% моль%) Холестерин (10 моль%) PEG DMG (1,5 моль%)</p>

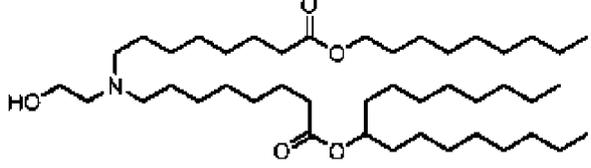
	NHFRCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRAD		
NY- ESO TCR	внеклеточная последовательность TCRальфа MQEVTQIPAALSVP EGENLVLNCSFTDS AIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQRE QTSGRLNASLDKSS GRSTLYIAASQPGD SATYLCAVRPTSGG SYIPTFGRGTSLIVH PY внеклеточная последовательность TCRбета MGVTQTPKFQVLK TGQSMTLQCAQDM NHEYMSWYRQDPG MGLRLIHYSVGAGI TDQGEVPNGYNVS RSTTEFPLRLLSA APSQTSVYFCASSY VGNTGELFFGEGSR LTVL	Т- клетки	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Бета-ситостерол (28,5% моль%) Холестерин (10 моль%) PEG DMG (1,5 моль%)</p>
EPO	APPRLICDSRVLER YLLEAKEAENITTG CAEHCSLNENITVP DTKVNIFYAWKRME VGQQAVEVWQGL ALLSEAVLRGQALL VNSSQPWEPLQLHV DKAVSGLRSLTLL	Почка или костный мозг	

	RALGAQKEAISPPD AASAAPLRTITADT FRKLFRVYSNFLRG KLKLYTGEACRTG DR		
ПАН	MSTAVLENPGLGR KLSDFGQETSYIED NCNQNGAISLIFSLK EEVGALAKVLRLE ENDVNLTHIESRPS RLKKDEYEFFTHLD KRSLPALTNIKILR HDIGATVHELSDRK KKDTPWFPRTIQE LDRFANQILSYGAE LDADHPGFKDPVY RARRKQFADIAYN YRHGQPIPRVEYME EEKKTWGTVFKTL KSLYKTHACYEYN HIFPBLEKYCGFHE DNIPQLEDVSQFLQ TCTGFRLRPVAGLL SSRDFLGGLAFRVF HCTQYIRHGSKPMY TPEPDICHELLGHVP LFSDRSFAQFSQEIG LASLGAPDEYIEKL ATIWFTVEFGLCK QGDSIKAYGAGLLS SFGELQYCLSEKPK LLPLELEKTAIQNY TVTEFQPLYYVAES FNDAKEKVRNFAA TIPRPFSVRYDPYTQ	Клетки печени	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Холестерин (38,5% моль%) PEG-DMG (1,5%) OR MC3 (50 моль%) DSPC (10 моль%) Холестерин (38,5% моль%) PEG-DMG (1,5%)</p>

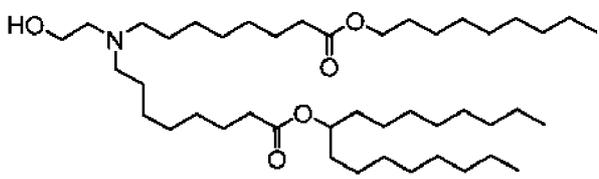
	RIEVL DNTQQLKIL ADSINSEIGILCSAL QKIK		
CPS1	LSVKAQTAHIVLED GTKMKGYSFGHPSS VAGEVVFNTGLGG YPEAITDPAYKGQI LTMANPIIGNGGAP DTTALDELGLSKYL ESNGIKVSGLLVLD YSKDYNHWLATKS LGQWLQEEKVPAIY GVDTRMLTKIIRDK GTMLGKIEFEGQPV DFVDPNKQNLIAEV STKDVKVYGGKGNP TKVVAVDCGIKNN VIRLLVKRGAEVHL VPWNHDFTKMEYD GILIAGGPGNPALA EPLIQNVRKILESDR KEPLFGISTGNLITG LAAGAKTYKMSMA NRGQNQPVLNITNK QAFITAQNHGYALD NLPAGWKPLFVN VNDQTNEGIMHES KPFFAVQFHPEVTP GPIDTEYLFDSFFSLI KKGKATTITSVLPK PALVASRVEVSKVL ILGSGGLSIGQAGEF DYSGSQAVKAMKE ENVKTVLMNPNIAS VQTNEVGLKQADT	Клетки печени	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Холестерин (38,5% моль%) PEG-DMG (1,5%) OR MC3 (50 моль%) DSPC (10 моль%) Холестерин (38,5% моль%) PEG-DMG (1,5%)</p>

VYFLPITPQFVTEVI KAEQPDGLILGMG GQTALNCGVELFK RGVLKEYGVKVLG TSVESIMATEDRQL FSDKLNEINEKIAPS FAVESIEDALKAAD TIGYPVMIRSAYAL GGLGSGICPNRETL MDLSTKAFAMTNQ ILVEKSVTGWKEIE YEVVRDADDNCVT VCNMENV DAMGV HTGDSVVVAPAQT LSNAEFQMLRRTSI NVVRHLGIVGECNI QFALHPTSMEYCIE VNARLSRSSALASK ATGYPLAFIAAKIA LGIPLPEIKNVVSGK TSACFEP SLDYMVT KIPRWDLDRFHGTS SRIGSSMKSVGEVM AIGRTFEESFQKAL RMCHPSIEGFTPRLP MNKEWPSNLDLRK ELSEPSSTRIYAIK AIDDNMSLDEIEKL TYIDKWFLYKMRDI LNMEKTLKGLNSES MTEETLKRAKEIGF SDKQISKCLGLTEA QTRELRLKKNHPW VKQIDTLAAEYPSV TNYLYVTYNGQEH		
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

DVNFDDHGMMVL GCGPYHIGSSVEFD WCAVSSIRTLRQLG KKTVVVNCNPETV STDFDECDKLYFEE LSLERILDIYHQEAC GGCIISVGGQIPNNL AVPLYKNGVKIMG TSPLQIDRAEDRSIF SAVLDELKVAQAP WKAVNTLNEALEF AKSVDYPCLLRPSY VLSGSAMNVVFSE DEMKKFLEEATRV QEHPVVLTKFVEGA REVEMDAVGKDGR VISHAISEHVEDAG VHSGDATLMLPTQ TISQGAIEKVKDAT RKIAKAF AISGPFNV QFLVKGNDVLVIEC NLRASRSFPFVSKT LGVDFIDVATKVM GENVDEKHLPTLD HPIIPADYVAIKAPM FSWPRLRDADPILR CEMASTGEVACFG EGIHTAFLKAMLST GFKIPQKGILIGIQQ SFRPRFLGVAEQLH NEGFKLFATEATSD WLNANNVPATPVA WPSQEGQNPSLSSI RKLIRDGSIDLVINL PNNNTKVVHDNYVI		
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

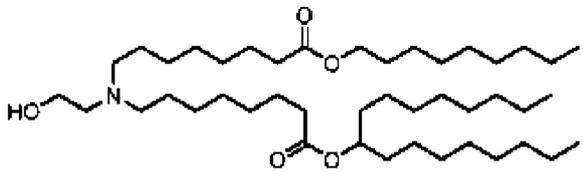
	RRTAVDSGIPLLTN FQVTKLFAEAVQKS RKVDSKSLFHRYQ YSAGKAA		
Cas9	MKRNYILGLDIGITS VGYGIIDYETRDVI DAGVRLFKEANVE NNEGRRSKRGARR LKRRRRHRIQRVKK LLFDYNLLTDHSEL SGINPYEARVKGLS QKLSEEEFSAALLH LAKRRGVHNVNEV EEDTGNELSTKEQIS RNSKALEEKYVAEL QLERLKKDGEVRG SINRFKTSDYVKEA KQLLKVQKAYHQL DQSFIDTYIDLLETR RTYYEGPGEGSPFG WKDIKEWYEMLM GHCTYFPEELRSVK YAYNADLYNALND LNNLVITRDENEKL EYYEKFQIENVFK QKKKPTLKQIAKEI LVNEEDIKGYRVTS TGKPEFTNLKVYHD IKDITARKEIENAE LLDQIAKILTIYQSS EDIQEELTNLNSLT QEEIEQISNLKGYTG THNLSLKAINLILDE LWHTNDNQIAIFNR LKLVPKKVDLSQQ	Иммунные клетки	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Бета-ситостерол (28,5% моль%) Холестерин (10 моль%) PEG DMG (1,5 моль%)</p>

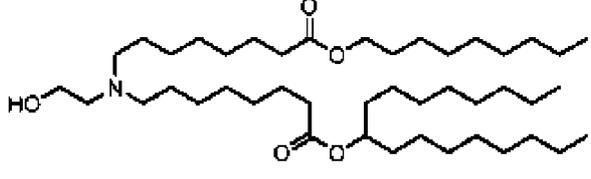
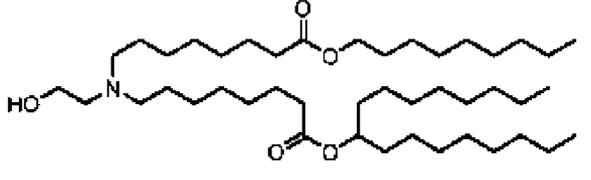
KEIPTTLVDDFILSP VVKRSFIQSIKVINA ИККYGLPNDIIIELA REKNSKDAQKMIN EMQKRNRQTNERIE EIIRTTGKENAKYLI EKIKLHDMQEGKC LYSLEAIPLEDLLNN PFNYEVDHIIPRSVS FDNSFNKVLVKQ EENSCKGNRTPFQY LSSSDSKISYETFKK HILNLAКGКГРИСК TKKEYLLEERDINR FSVQKDFINRNLVD TRYATRGLMNLRLR SYFRVNNLDVKVK SINGGFTSFLRRKW KFKKERNKGYKHH AEDALIIANADFIFK EWKKLDKAKKVM ENQMFEEKQAESM PEIETEQEYKEIFITP HQIKHIKDFKDYKY SHRVDKKNRELIN DTLYSTRKDDKGN TLIVNNLNGLYDKD NDKLKКCВЯЗЫВА ETPEKLLMYHHDP QTYQKLKLIMEQY GDEKNPLYKYEE TGNYLTKYSKKDN GPVIKKIKYYGNKL NAHLDITDDYPNSR NKVVKLSLKPYRFD		
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

	<p>VYLDNGVYKFVTV KNLDVIKKENYYE VNSKCYEEAKKLK KISNQAEFIASFYNN DLIKINGEL YRVIGV NNDLLNRIEVNMID ITYREYLENMNDKR PPRIIKTIASKTQSIK KYSTDILGNLYEVK SKKHPQIIKKG</p>		
ADAM TS13	<p>AAGGILHLELLVAV GPDVFQAHQEDTE RYVLTNLNIGAELL RDPSLGAQFRVHLV KMVILTEPEGAPNIT ANLTSSLLSVCGWS QTINPEDDTPGHA DLVLYITRFDLELP DGNRQVRGVTQLG GACSPTWSCLITED TGFDLGVTIAHEIG HSFGLHDGAPGSG CGPSGHVMASDGA APRAGLAWSPCSRR QLLSLLSAGRARC WDPPRPQPGSAGHP PDAQPLYYSANE QCRVAFGPKAVAC TFAREHLDMCQAL SCHTDPLDQSSCSR LLVPLLDGTECGVE KWCSKGRCSRSLVE LTPIAAVHGRWSS WGPRSPCSRSCGGG VVTRRRQCNNPRP</p>	Клетки печени	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Холестерин (38,5% моль%) PEG-DMG (1,5%) OR MC3 (50 моль%) DSPC (10 моль%) Холестерин (38,5% моль%) PEG-DMG (1,5%)</p>

AFGGRACVGADLQ AEMCNTQACEKTQ LEFMSQQCARTDG QPLRSSPGGASFYH WGAAVPHSQGDAL CRHMCRAIGESFIM KRGDSFLDGTRCM PSGPREDGTLSLCV SGSCRTFGCDGRM DSQQVWDRCQVCG GDNSTCSPRKGSFT AGRAREYVTFLTVT PNLTSVYIANHRPL FTHLAVRIGGRYVV AGKMSISPNTTYP LLEDGRVEYRVALT EDRLPRLEEIRIWGP LQEDADIQVYRRY GEEYGNLTRPDITF TYFQPKPRQAWVW AAVRGPCSVSCGA GLRWVNYSCLDQA RKELVETVQCQGS QPPAWPEACVLEP CPPYWAVGDFGPC SASC GGGLRERPVR CVEAQGSLLKTLPP ARCRAGAQQPAVA LETCNPQPCPARWE VSEPSSCTSAGGAG LALENETCVPGADG LEAPVTEGPGSVDE KLPAPPCVGMSCP PGWGHLDATSAGE KAPSPWGSIRTGAQ		
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

AAHVWTPAAGSCS VSCGRGLMELRFLC MDSALRVPVQEEL CGLASKPGSRREVC QAVPCPARWQYKL AACSVSCGRGVVR RILYCARAHGEDDG EEILLDTQCQGLPRP EPQEACSLEPCPPR WKVMSLGPCSASC GLGTARRSVACVQ LDQGQDVEVDEAA CAALVRPEASVPCL IADCTYRWHVGTW MECSVSCGDGIQRR RDTCLGPQAQAPVP ADFCQHLPKPVTVR GCWAGPCVGQGTP SLVPHEEAAAPGRT TATPAGASLEWSQ ARGLLFSPAPQPRR LLPGPQENSVQSSA CGRQHLEPTGTIDM RGPGQADCAVAIG RPLGEVVTLRVME HEELNCSAGDMLL LWGRLTWRKMCR KLLDMTFSSKTNTL VVRQRCGRPGGGV LLRYGSQ LAPETFY RECDMQLFGPWGEI VSPSLSPATSNAGG CRLFINVAPHARIAI HALATNMGAGTEG ANASYILIRDTHSLR		
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

	TTAFHGQQVLYWE SESSQAEMEFSEGF LKAQASLRGQYWT LQSWVPEMQDPQS WKGKEGT		
FOXP3	MPNPRPGKPSAPSL ALGSPGASPSWRA APKASDLLGARGPG GTFQGRDLRGGAI MEETSSSLNPMPPS QLQLPTLPLVMVAP SGARLGPLPHLQAL LQDRPHFMHQLST VDAHARTPVLQVH PLESPAMISLTPPTT ATGVFSLKARPLP PGINVASLEWVSRE PALLCTFPNPSAPR KDSTLSAVPQSSYP LLANGVCKWPGCE KVFEEDFLKHCQ ADHLLDEKGRAQC LLQREMVQSLEQQ LVLEKEKLSAMQA HLAGKMALTKASS VASSDKGSCCIVAA GSQGPVPAWSGP REAPDSLFAVRRHL WGSNGNSTFPEFLH NMDYFKFHЯMPPP FTYATLIRWAILEAP EKQRTLNEIYHWFT RMFAFFRNHPATW KNAIRHNLSLHKCF VRVESEKGA VWTV	Иммунн ые клетки	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Бета-ситостерол (28,5% моль%) Холестерин (10 моль%) PEG DMG (1,5 моль%)</p>

	DELEFRKKRSQRPS RCSNPTPGP		
IL-10	SPGQGTQSENSCTH FPGNLPNMLRDLRD AFSRVKTFQMKD QLDNLLKESLLED FKGYLGCQALSEMI QFYLEEVMQAEN QDPDIKAHVNSLGE NLKTLRLRLRCHR FLPCENKSKAVEQV KNAFNKLQEKGIYK AMSEFDIFINYIEAY MTMKIRN	Иммунные клетки	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Бета-ситостерол (28,5% моль%) Холестерин (10 моль%) PEG DMG (1,5 моль%)</p>
IL-2	APTSSTKKTQLQL EHLLDLQMILNGI NNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELK HLQCLEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFC QSIISTLT	Иммунные клетки	 <p>(50 моль%) DSPC (10 моль%) Бета-ситостерол (28,5% моль%) Холестерин (10 моль%) PEG DMG (1,5 моль%)</p>

[0312] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из последовательностей экспрессии кодирует терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин, например IL-12p70, IL-15, IL-2, IL-18, IL-21, IFN- α , IFN- β , IL-10, TGF-бета, IL-4 или IL-35, или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует агонист (например член семейства TNFR, такой как CD137L, OX40L, ICOSL, LIGHT или CD70). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует агонист ингибирующего рецептора (например PDL1, PDL2, Галектин-9, VISTA, B7H4 или

МНСII) или ингибирующий рецептор (например PD1, CTLA4, TIGIT, LAG3 или TIM3). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует антагонист ингибирующего рецептора. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует одну или несколько цепей TCR (альфа и бета-цепи или гамма и дельта-цепи). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует секретлируемый рекрутер Т-клеток или иммунных клеток (например биспецифическое антитело, такое как BiTE, нацеленное, например, на CD3, CD137 или CD28 и экспрессирующий опухоль белок, например, CD19, CD20 или BCMA и так далее). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции (например FOXP3, HELIOS, TOX1 или TOX2). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует иммуносупрессивный фермент (например IDO или CD39/CD73). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая последовательность экспрессии кодирует GvHD (например CAR-Treg против HLA-A2).

[0313] В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности экспрессии кодируют альфа и бета-цепи Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности экспрессии кодируют гамма и дельта-цепи TCR. Изобретение включает в себя способы лечения субъекта, болеющего раком, включающие введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, кодирующей альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR или гамма-цепь TCR и дельта-цепь TCR.

[0314] В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности экспрессии кодируют химерный антигенный рецептор (CAR) и антагонист PD1 или PDL1. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности экспрессии кодируют химерный антигенный рецептор (CAR) и цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-12p70, IL-15, IL-2, IL-18, IL-21, IFN- α , IFN- β , IL-10, TGF-бета, IL-4 или IL-35 или его функциональный фрагмент. Изобретение включает в себя способы лечения субъекта, болеющего раком, включающие введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, кодирующей CAR, и антагонист PD1 или PDL1. Изобретение включает в себя способы лечения субъекта, болеющего раком, включающие введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, кодирующей CAR, и цитокин.

[0315] В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности экспрессии кодируют фактор транскрипции и цитокин. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции представляет собой FOXP3, STAT5B или HELIOS, а цитокин представляет собой IL10, IL12 или TGF бета. Изобретение включает в себя способы лечения субъекта, болеющего аутоиммунным заболеванием, включающие введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, кодирующей фактор транскрипции, например, FOXP3 и

цитокин.

[0316] В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности экспрессии кодируют фактор транскрипции и CAR. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции представляет собой FOXP3, STAT5B или HELIOS. Изобретение включает в себя способы лечения субъекта, болеющего аутоиммунным заболеванием, включающие введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, кодирующей фактор транскрипции, например, FOXP3 и CAR.

[0317] В некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности экспрессии кодируют цитокин и антиген. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IFN γ . В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой неоантиген. Изобретение включает в себя способы лечения субъекта, болеющего раком, включающие введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, кодирующей цитокин, например IFN γ и опухолевый антиген или его фрагмент.

[0318] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует первый химерный антигенный рецептор (CAR), а вторая последовательность экспрессии кодирует второй CAR. В некоторых вариантах осуществления первый CAR является специфическим для первого антигена и содержит костимулирующий домен и внутриклеточный сигнальный домен, и второй CAR является специфическим для второго антигена и содержит костимулирующий домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CAR, нацеленных на множество опухолевых антигенов, обеспечивает более эффективное лечение опухоли с экспрессией гетерогенного антигена. Изобретение включает в себя способы лечения субъекта, болеющего раком, включающие введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, кодирующей первый CAR и второй CAR.

[0319] В некоторых вариантах осуществления первая последовательность экспрессии кодирует первый цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует второй цитокин. В некоторых вариантах осуществления первый и второй цитокины находятся в группе IL-10, TGF β и IL-35. В некоторых вариантах осуществления первый и второй цитокины находятся в группе IFN γ , IL-2, IL-7, IL-15 и IL-18.

[0320] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует белок, состоящий из субъединиц, кодируемых более чем одним геном. Например, белок может представлять собой гетеродимер, в котором каждая цепь или субъединица белка закодирована отдельным геном. Возможно, что в переносчике доставляется более одной молекулы circRNA, и каждая circRNA кодирует отдельную субъединицу белка. Альтернативно, одна circRNA может быть сконструирована, чтобы кодировать более одной субъединицы. В некоторых вариантах осуществления отдельные молекулы circRNA, кодирующие отдельные субъединицы, можно вводить в отдельных переносчиках.

3.1 Цитокины

[0321] Описания и/или аминокислотные последовательности IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-27 β , IFN γ и/или TGF β 1 представлены в данном документе и в базе данных на сайте www.uniprot.org с учетными номерами: P60568 (IL-2), P29459 (IL-12A), P29460 (IL-12B), P13232 (IL-7), P22301 (IL-10), P40933 (IL-15), Q14116 (IL-18), Q14213 (IL-27 β), P01579 (IFN γ) и/или P01137 (TGF β 1).

3.2 Антагонисты PD-1 и PD-L1

[0322] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб, пидилизумаб или ниволумаб. В некоторых вариантах осуществления ниволумаб описан в международной патентной публикации № WO2006/121168. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб описан в WO2009/114335. В некоторых вариантах осуществления пидилизумаб описан в международной патентной публикации № WO2009/101611. Дополнительные антитела против PD1 описаны в патенте США № 8609089, публикациях патентов США № US 2010028330 и US 20120114649 и публикациях международных патентов № WO 2010/027827 и WO 2011/066342.

[0323] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, BMS-936559 или SK-301.

[0324] Описания и/или аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей антител PD-1 и/или PD-L1 представлены в настоящем документе и в базе данных www.drugbank.ca с учетными номерами: DB09037 (пембролизумаб), DB09035 (ниволумаб), DB15383 (пидилизумаб), DB11595 (атезолизумаб), DB11945 (авелумаб) и DB11714 (дурвалумаб).

3.3 Химерные антигенные рецепторы

[0325] Химерные антигенные рецепторы (CAR или CAR-T) представляют собой сконструированные генетически рецепторы. Эти сконструированные рецепторы можно вводить иммунные клетки, включая T-клетки и экспрессировать в них, с помощью кольцевой РНК, описанной в данном документе. С CAR один рецептор можно запрограммировать как распознавать конкретный антиген, так и активировать при связывании с этим антигеном иммунную клетку, чтобы атаковать и разрушать клетку, несущую этот антиген. Когда эти антигены существуют на опухолевых клетках, иммунная клетка, которая экспрессирует CAR, может нацеливаться и уничтожать опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления CAR, закодированный полинуклеотидом, содержит (i) антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с антигеном-мишенью, (ii) шарнирный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен и (iii) активирующий домен.

[0326] В некоторых вариантах осуществления ориентация CAR в соответствии с изобретением содержит антигенсвязывающий домен (такой как scFv) в тандеме с костимулирующим доменом и активирующим доменом. Костимулирующий домен может содержать одну или более из внеклеточной части, трансмембранной части и внутриклеточной части. В других вариантах осуществления несколько костимулирующих

доменов можно использовать в тандеме.

Антигенсвязывающий домен

[0327] CAR могут быть сконструированы для связи с антигеном (таким как антиген клеточной поверхности) посредством включения антигенсвязывающей молекулы, которая взаимодействует с этим антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой фрагмент антитела, например один или несколько одноцепочечных фрагментов антитела (scFv). scFv представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, имеющий переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, связанные вместе. См., например, патент США №№ 7741465 и 6319494, а также Eshhar et al. *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136. scFv сохраняет способность родительского антитела специфически взаимодействовать с антигеном-мишенью. scFv полезны в химерных антигенных рецепторах, потому что они могут быть сконструированы для экспрессии в виде части одной цепи наряду с другими компонентами CAR. См. Также Krause et al., *J. Exp. Med.*, Volume 188, No. 4, 1998 (619-626); Finney et al., *Journal of Immunology*, 1998, 161 : 2791-2797. Понятно, что антигенсвязывающая молекула обычно содержится во внеклеточной части CAR, так что она способна распознавать и связываться с представляющим интерес антигеном. Биспецифический и мультиспецифический CAR рассматривают в рамках объема изобретения со специфичностью в отношении более чем одной представляющей интерес мишени.

[0328] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит одну цепь, причем переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления VH расположена на N-конце линкера, а VL расположена на C-конце линкера. В других вариантах осуществления VL расположена на N-конце линкера, а VH расположена на C-конце линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 8, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 13, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 18, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 45, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90 или по меньшей мере приблизительно 100 аминокислот.

[0329] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит DARPIn. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит антикалин или другой синтетический белок, способный специфически связываться с белком-мишенью.

[0330] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический для антигена, выбранного из группы CD19, CD123, CD22, CD30,

CD171, CS-1, лектиноподобная молекула-1 С-типа, CD33, вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид GD3, В-клеточный антиген созревания члена семейства рецепторов TNF (BCMA), Tn антиген ((Tn Ag) или (GalNAc6S-6T/Thr)), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3), ассоциированный с опухолью гликопротеин 72 (TAG72), CD38, CD44v6, карциноэмбриональный антиген (CEA), молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), V7H3 (CD276), KIT (CD117), субъединица альфа-2 рецептора интерлейкина-13, мезотелин, альфа-рецептор интерлейкина-11 (IL-11Ra), антиген стволовых клеток простаты (PSCA), серин 21 протеазы, рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), антиген Льюиса (Y), CD24, бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR-бета), стадийспецифический эмбриональный антиген-4 (SSEA-4), CD20, рецептор фолиевой кислоты альфа, HER2, HER3, муцин 1, ассоциированный с клеточной поверхностью белок (MUC1), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), молекула адгезии нервных клеток (NCAM), простаза, кислая фосфатаза простаты (PAP), мутантный фактор элонгации 2 (ELF2M), эфрин B2, белок активации фибробластов альфа (FAP), рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептор IGF-I), карбоангидраза IX (CAIX), субъединица протеасомы (просома, макропаин), Бета-тип, 9 (LMP2), гликопротеин 100 (gp100), слитый белок онкогена, состоящий из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолог 1 вирусного онкогена мышинового лейкоза Абельсона (Abl) (bcr-abl), тирозиназа, рецептор 2 эфрина типа A (EphA2), фукозил GM1, сиалиловая молекула адгезии Льюиса (sLe), ганглиозид GM3, трансглутаминаза 5 (TGS5), высокомолекулярный антиген, ассоциированный с меланомой (HMWMAA), о-ацетил-GD2 ганглиозид (OAcGD2), бета-рецептор фолиевой кислоты, опухолевой эндотелиальный маркер 1 (TEM1/CD248), белок, связанный с опухолевым эндотелиальным маркером 7 (TEM7R), клаудин 6 (CLDN6), рецептор тиреостимулирующего гормона (TSHR), член D рецептор группы 5 класса C, связанный с G-белком (GPRC5D), открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61), CD97, CD179a, киназа анапластической лимфомы (ALK), полисиаловая кислота, плацентарно-специфическая 1 (PLAC1), гексасахаридная часть гликоцерамида globoH (GloboH), антиген дифференцировки молочной железы (NY-BR-1), уроплакин 2 (UPK2), клеточный рецептор 1 вируса гепатита А (HAVCR1), адренорецептор бета 3 (ADRB3), паннексин 3 (PANX3), рецептор 20, связанный с G-белком (GPR20), комплекс антигена 6 лимфоцитов, локус К 9 (LY6K), обонятельный рецептор 51E2 (OR51E2), белок альтернативной рамки считывания TCR Gamma (TARP), белок опухоли Вильмса (WT1), раково-тестикулярный антиген 1 (NY-ESO-1), раково-тестикулярный антиген 2 (LAGE-1a), члены семейства MAGE (включая MAGE-A1, MAGE-A3 и MAGE-A4), ген 6 варианта транслокации ETS, расположенный на хромосоме 12p (ETV6-AML), белок спермы 17 (SPA17), член 1A семейства антигенов X (XAGE1), ангиопоэтин-связывающий рецептор 2 клеточной поверхности (Tie 2), раково-тестикулярный антиген меланомы-1 (MAD-CT-1), раково-тестикулярный антиген меланомы-2 (MAD-CT-2), Fos-родственный антиген 1,

опухолевый белок p53 (p53), мутант p53, простеин, surviving, теломераза, антиген опухоли карциномы предстательной железы-1, антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками 1, мутантная саркома крысы (Ras), обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT), точки разрыва транслокации саркомы, ингибитор апоптоза меланомы (ML-IAP), ERG (слитый ген ETS трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2)), N-ацетилглюкозаминилтрансфераза V (NA17), парный белок Pax-3 (PAX3), андрогенный рецептор, циклин B1, гомолог, полученный из нейробластомы вирусного онкогена птичьего миелоцитоматоза v-мус (MYCN), член C семейства гомологов Ras (RhoC), родственник тирозиназе белок 2 (TRP-2), цитохром P450 1B1 (CYP1B1), белок, подобный CCCTC-связывающего фактора (белок цинкового пальца), антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (SART3), парный белок Pax-5 (PAX5), проакрозин-связывающий белок sp32 (OY-TES1), лимфоцит-специфическая протеинтирозинкиназа (LCK), якорный белок 4 киназы A (AKAP-4), синовиальная саркома, точка разрыва X 2 (SSX2), рецептор конечных продуктов усиленного гликозилирования (RAGE-1), почечный убиквитин 1 (RU1), почечный убиквитин 2 (RU2), легумаин, вирус папилломы человека E6 (HPV E6), вирус папилломы человека E7 (HPV E7), карбоксилэстераза кишечника, мутантный белок теплового шока 70-2 (mut hsp70-2), CD79a, CD79b, CD72, лейкоцит-ассоциированный иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1), Fc-фрагмент рецептора IgA (FCAR или CD89), член 2 подсемейства A иммуноглобулиноподобных рецепторов лейкоцитов (LILRA2), член f семейства подобный молекуле CD300 (CD300LF), член A семейства 12 доменов лектина C-типа (CLEC12A), антиген 2 стромальных клеток костного мозга (BST2), EGF-подобный модуль, содержащий муциноподобный гормональный рецептор, подобный 2 (EMR2), лимфоцитарный антиген 75 (LY75), глипикан-3 (GPC3), Fc-рецептор-подобный белок 5 (FCRL5), MUC16, 5T4, 8H9, интегрин $\alpha\beta\theta$, интегрин $\alpha\beta6$, альфафетопротеин (AFP), B7-H6, ca-125, CA9, CD44, CD44v7/8, CD52, E-кадгерин, EMA (эпителиальный мембранный антиген), эпителиальный гликопротеин-2 (EGP-2), эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40), ErbB4, эпителиальный опухолевый антиген (ETA), фолат-связывающий белок (FBP), рецептор со встроенным киназным доменом (KDR), легкая цепь k, молекула клеточной адгезии L1, MUC18, NKG2D, онкофетальный антиген (h5T4), опухолевый/тестикулярный антиген 1B, GAGE, GAGE-1, BAGE, SCP-1, CTZ9, SAGE, CAGE, CT10, MART-1, иммуноглобулиновый лямбда-подобный полипептид 1 (IGLL1), поверхностный антигенсвязывающий белок гепатита B (HBsAg), вирусный капсидный антиген (VCA), ранний антиген (EA), ядерный антиген EBV (EBNA), ранний антиген HHV-6 p41, латентный антиген HHV-6B U94, поздний антиген HHV-6B p98, антиген цитомегаловируса (CMV), большой Т-антиген, малый Т-антиген, антиген аденовируса, антиген респираторно-синцитиального вируса (RSV), гемагглютинин (HA), нейраминидаза (NA), антиген парагриппа типа 1, антиген парагриппа типа 2, антиген парагриппа типа 3, антиген парагриппа типа 4, антиген метапневмовируса человека (HMPV), коровий антиген вируса гепатита С (HCV), антиген p24 ВИЧ, антиген Т-клеточного лимфотрофного вируса человека (HTLV-1), малый Т-антиген вируса полиомы

клеток Меркеля, большой Т-антиген вируса полиомы клеток Меркеля, литический ядерный антиген герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши (KSHV), и латентный ядерный антиген KSHV. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит SEQ ID NO: 321 и/или 322.

Шарнирный/спейсерный домен

[0331] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно настоящему раскрытию содержит шарнирный или спейсерный домен. В некоторых вариантах осуществления шарнирный/спейсерный домен может представлять собой усеченный шарнирный/спейсерный домен (THD). THD домен представляет собой усеченный вариант полного шарнирного/спейсерного домена («CHD»). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен происходит или получен (например содержит весь или фрагмент) ErbB2, гликофорина (GrA), CD2, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD4, CD7, CD8a, CD8[T CD1 la (IT GAL), CD1 lb (IT GAM), CD1 lc (ITGAX), CD1 ld (IT GAD), CD18 (ITGB2), CD19 (B4), CD27 (TNFRSF7), CD28, CD28T, CD29 (ITGB1), CD30 (TNFRSF8), CD40 (TNFRSF5), CD48 (SLAMF2), CD49a (ITGA1), CD49d (ITGA4), CD49f (ITGA6), CD66a (CEACAM1), CD66b (CEACAM8), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3), CD66e (CEACAM5), CD69 (CLEC2), CD79A (альфа-цепи, связанной с комплексом В-клеточного антигенного рецептора), CD79B (бета-цепи, связанной с комплексом В-клеточного антигенного рецептора), CD84 (SLAMF5), CD96 (Tactile), CD100 (SEMA4D), CD103 (ITGAE), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD158A (KIR2DL1), CD158B1 (KIR2DL2), CD158B2 (KIR2DL3), CD158C (KIR3DP1), CD158D (KIRDL4), CD158F1 (KIR2DL5A), CD158F2 (KIR2DL5B), CD158K (KIR3DL2), CD160 (BY55), CD162 (SELPLG), CD226 (DNAM1), CD229 (SLAMF3), CD244 (SLAMF4), CD247 (CD3-дзета), CD258 (LIGHT), CD268 (BAFFR), CD270 (TNFSF14), CD272 (BTLA), CD276 (B7-H3), CD279 (PD-1), CD314 (NKG2D), CD319 (SLAMF7), CD335 (NK-p46), CD336 (NK-p44), CD337 (NK-p30), CD352 (SLAMF6), CD353 (SLAMF8), CD355 (CRT AM), CD357 (TNFRSF18), костимулятора индуцибельных Т-клеток (ICOS), LFA-1 (CD1 la/CD18), NKG2C, DAP-10, ICAM-1, NKp80 (KLRF1), IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, LFA-1, SLAMF9, LAT, GADS (GrpL), SLP-76 (LCP2), PAG1/CBP, лиганда CD83, рецептора Fc-гамма, молекулы МНС класс 1, молекулы МНС класс 2, рецепторного белка TNF, белка иммуноглобулина, цитокинового рецептора, интегрина, активирующих NK-клетки рецепторов, рецептора лиганда Toll и их фрагментов или комбинаций. Шарнирный или спейсерный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника.

[0332] В некоторых вариантах осуществления шарнирный или спейсерный домен расположен между антигенсвязывающей молекулой (например scFv) и трансмембранным доменом. В этой ориентации шарнирный/спейсерный домен обеспечивает расстояние между антигенсвязывающей молекулой и поверхностью клеточной мембраны, на которой экспрессируется CAR. В некоторых вариантах осуществления шарнирный или спейсерный домен происходит или получен из иммуноглобулина. В некоторых вариантах

осуществления шарнирный или спейсерный домен выбирают из шарнирных/спейсерных областей IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE и IgM или их фрагмента. В некоторых вариантах осуществления шарнирный или спейсерный домен содержит, происходит или получен из шарнирной/спейсерной области CD8 альфа. В некоторых вариантах осуществления шарнирный или спейсерный домен содержит, происходит или получен из шарнирной/спейсерной области CD28. В некоторых вариантах осуществления шарнирный или спейсерный домен содержит фрагмент шарнирной/спейсерной области CD8 альфа или фрагмент шарнирной/спейсерной области CD28, причем фрагмент представляет собой нечто меньшее целой шарнирной/спейсерной области. В некоторых вариантах осуществления фрагмент CD8 альфа шарнирной/спейсерной области или фрагмент CD28 шарнирной/спейсерной области содержит аминокислотную последовательность, которая исключает по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 аминокислот на N-конце или C-С-конце, или на обоих, шарнирной/спейсерной области CD8 альфа или шарнирной/спейсерной области CD28.

Трансмембранный домен

[0333] CAR согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать трансмембранный домен и/или внутриклеточный сигнальный домен. Трансмембранный домен может быть сконструирован для слияния с внеклеточным доменом CAR. Аналогичным образом он может быть слит с внутриклеточным доменом CAR. В некоторых вариантах осуществления использован трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован (например путем замены аминокислоты), чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами одного того же или разных белков поверхностной мембраны, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка.

[0334] Трансмембранные области могут быть получены (то есть содержат) рецепторную тирозинкиназу (например ErbB2), гликофорин А (GrA), 4-1BB/CD137, активирующие NK-клетки рецепторы, белок иммуноглобулина, B7-H3, BAFFR, BFAME (SEAMF8), BTEA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD 18, CD 19, CD 19a, CD2, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD30, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD7, CD84, CD8альфа, CD8бета, CD96 (Tactile), CD1 Ia, CD1 Ib, CD1 Ic, CD1 Id, CDS, CEACAM1, CRT AM, цитокиновый рецептор, DAP-10, DNAM1 (CD226), рецептор Fc гамма, GADS, GITR, HVEM (EIGHTR), IA4, ICAM-1,

ICAM-1, Ig альфа (CD79a), IE-2R бета, IE-2R гамма, IE-7R альфа, индуцибельный Т-клеточный костимулятор (ICOS), интегрины, ITGA4, ITGA4, ITGA6, IT GAD, ITGAE, ITGAE, IT GAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, EAT, LFA-1, LFA-1, лиганд, который специфически связывается с CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1; CD1-1a/CD18), молекулу МНС класса 1, N KG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, белок запрограммированной смерти-1 (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), SLAM (СЛАМФ1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Lyl08), SLAMF7, SLP-76, рецепторные белки TNF, TNFR2, TNFSF14, рецептор лиганда Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6 или их фрагмент, усечение или комбинацию.

[0335] В некоторых вариантах осуществления подходящий внутриклеточный сигнальный домен содержит без ограничения активирующие макрофаг/миелоидные клетки рецепторы CSFR1, MYD88, CD14, TIE2, TLR4, CR3, CD64, TREM2, DAP10, DAP12, CD169, DECTIN1, CD206, CD47, CD163, CD36, MARCO, TIM4, MERTK, F4/80, CD91, C₁QR, LOX-1, CD68, SRA, BAI-1, ABCA7, CD36, CD31, лактоферрин или их фрагмент, усечение или комбинацию.

[0336] В некоторых вариантах осуществления рецепторная тирозинкиназа может быть получена (например содержит) рецептор инсулина (InsR), рецептор инсулиноподобного фактора роста I (IGF1R), рецептор, связанный с рецептором инсулина (IRR), рецептор альфа тромбоцитарного фактора роста (PDGFR α), бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR β), рецепторную тирозинкиназу протоонкогена KIT (Kit), рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSFR), родственную fms тирозинкиназу 3 (FLT3), родственную fms тирозинкиназу 1 (VEGFR-1), рецептор домена вставки киназы (VEGFR-2), родственную fms тирозинкиназу 4 (VEGFR-3), рецептор 1 фактора роста фибробластов (FGFR1), рецептор 2 фактора роста фибробластов (FGFR2), рецептор 3 фактора роста фибробластов (FGFR3), рецептор 4 фактора роста фибробластов (FGFR4), протеинтирозинкиназу 7 (ССК4), нейротрофическую рецепторную тирозинкиназу 1 (trkA), нейротрофическую рецепторную тирозинкиназу 2 (trkB), нейротрофическую рецепторную тирозинкиназу 3 (trkC), подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор 1 (ROR1), подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор 2 (ROR2), ассоциированную с мышцами рецепторную тирозинкиназу (MuSK), рецепторную тирозинкиназу протоонкогена MET (MET), стимулирующий макрофаги рецептор 1 (Ron), рецепторную тирозинкиназу AXL (Axl), протеинтирозинкиназу TYRO3 (Туго3), тирозинкиназу протоонкогена MER (Mer), тирозинкиназу с иммуноглобулиноподобными и EGF-подобными доменами 1 (TIE1), рецепторную тирозинкиназу ТЕК (TIE2), рецептор A1 EPH (EphA1), рецептор A2 EPH (EphA2), рецептор A3 EPH (EphA3), рецептор EPH A4 (EphA4), EPH рецептор A5 (EphA5), рецептор A6 EPH (EphA6), рецептор A7 EPH (EphA7), рецептор A8 EPH (EphA8), рецептор A10 EPH (EphA10), рецептор B1 EPH (EphB1), рецептор B2 EPH (EphB2), рецептор B3 EPH

(EphB3), рецептор B4 EPH (EphB4), рецептор B6 EPH (EphB6), протоонкоген ret (Ret), рецептороподобную тирозинкиназу (RYK), рецепторную тирозинкиназу 1 дискоидинового домена (DDR1), рецепторную тирозинкиназу дискоидинового домена 2 (DDR2), онкоген c-ros 1, рецепторную тирозинкиназу (ROS), ассоциированную с апоптозом тирозинкиназу (Lmr1), тирозинкиназу 2 лемура (Lmr2), тирозинкиназу 3 лемура (Lmr3), рецепторную тирозинкиназу лейкоцитов (LTK), рецепторную тирозинкиназу ALK (ALK) или серин/треонин/тирозинкиназу 1 (STYK1).

Костимулирующий домен

[0337] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит 4-1BB (CD137), CD28 либо и то, и другое и/или внутриклеточный сигнальный домен Т-клеток. В предпочтительном варианте осуществления костимулирующий домен представляет собой человеческий CD28, человеческий 4-1BB либо и то, и другое, а внутриклеточный сигнальный домен Т-клеток представляет собой человеческий CD3 дзета (ζ). 4-1BB, CD28, CD3 дзета или любой из них может содержать меньше, чем целый 4-1BB, CD28 или CD3 дзета, соответственно. Химерные антигенные рецепторы могут содержать костимулирующие (сигнальные) домены для повышения своей силы. См. Патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Krause et al. И Finney et al. (выше), Song et al., Blood 119:696-706 (2012); Kalos et al., Sci Transl. Med. 3:95 (2011); Porter et al., N. Engl. J. Med. 365:725-33 (2011), and Gross et al., Amur. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56:59-83 (2016).

[0338] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318 или 320.

Внутриклеточный сигнальный домен

[0339] Внутриклеточный (сигнальный) домен сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе, может обеспечивать передачу сигнала активирующему домену, который затем активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций иммунной клетки. Эффекторной функцией Т-клетки может быть, например, цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

[0340] В некоторых вариантах осуществления подходящий внутриклеточный сигнальный домен включает (например содержит) без ограничения 4-1BB/CD137, активирующие NK-клетки рецепторы, белок иммуноглобулина, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD 19a, CD2, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD30, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD7, CD84, CD8альфа, CD8бета, CD96 (Tactile), CD1 la, CD1 lb, CD1 lc, CD1 Id, CDS, CEACAM1, CRT AM, цитокиновый рецептор, DAP-10, DNAM1 (CD226), рецептор Fc-гамма, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig альфа (CD79a), IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), интегрины, ITGA4, ITGA4, ITGA6, IT GAD, ITGAE, ITGAL, IT GAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, лиганд, который специфически связывается с CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), Lyl08), антиген-1,

ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1; CD1-1a/CD18), молекулу MHC класс 1, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, белок 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A, SLAMF7, SLP-76, белки рецептора TNF, TNFR2, TNFSF14, рецептор лиганда Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6 или их фрагмент, усечение или комбинацию.

[0341] CD3 представляет собой элемент Т-клеточного рецептора на нативных Т-клетках, и было показано, что он является важным внутриклеточным активирующим элементом в CAR. В некоторых вариантах осуществления CD3 представляет собой CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления активирующий домен содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или приблизительно 100% последовательности полипептида SEQ ID NO: 319.

3.4 Т-клеточные рецепторы

[0342] TCR описаны с использованием номенклатуры TCR Международной иммуногенетики (IMGT) и ссылок на общедоступную базу данных последовательностей TCR IMGT. Нативные альфа-бета гетеродимерные TCR имеют альфа-цепь и бета-цепь. В широком смысле каждая цепь может содержать переменную, соединительную и константную области, а бета-цепь также обычно содержит короткую область разнообразия между переменной и соединительной областями, но эту область разнообразия часто рассматривают как часть соединительной области. Каждая переменная область может содержать три CDR (определяющие комплементарность области), встроенные в каркасную последовательность, одна из которых представляет собой гиперпеременную область, названную CDR3. Существует несколько типов переменных областей альфа-цепи ($V\alpha$) и несколько типов переменных областей бета-цепи ($V\beta$), различающихся их каркасом, последовательностями CDR1 и CDR2 и частично определенной последовательностью CDR3. Типы $V\alpha$ обозначаются в номенклатуре IMGT уникальным номером TRAV. Таким образом, «TRAV21» определяет область TCR $V\alpha$, имеющую уникальную каркасную область и последовательности CDR1 и CDR2, и последовательность CDR3, которая частично определяется аминокислотной последовательностью, которая сохраняется от TCR до TCR, но которая также включает аминокислотную последовательность, которая меняется от TCR к TCR. Таким же образом «TRBV5-1» определяет область TCR $V\beta$, имеющую уникальную каркасную область и последовательности CDR1 и CDR2, но только с частично определенной последовательностью CDR3.

[0343] Соединительные области TCR аналогичным образом определяются уникальной номенклатурой TRAJ и TRBJ IMGT, а константные области - номенклатурой TRAC и TRBC IMGT.

[0344] Область разнообразия бета-цепи упоминается в номенклатуре IMGT аббревиатурой TRBD, и, как уже упоминалось, цепочкообразные области TRBD/TRBJ часто рассматриваются вместе как соединительная область.

[0345] Уникальные последовательности, определенные номенклатурой IMGT, широко известны и доступны для тех, кто работает в области TCR. Например, их можно найти в общедоступной базе данных IMGT. В «T cell Receptor Factsbook», (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8 также раскрыты последовательности, определенные номенклатурой IMGT, но из-за даты публикации и последующего временного отставания для содержащейся в нем информации иногда требуется подтверждение ссылкой на базу данных IMGT.

[0346] Нативные TCR существуют в гетеродимерных формах $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$. Однако ранее было показано, что рекомбинантные TCR, состоящие из гомодимеров $\alpha\alpha$ или $\beta\beta$, связываются с пептидными молекулами МНС. Следовательно, TCR согласно изобретению может быть гетеродимерным $\alpha\beta$ TCR или может быть $\alpha\alpha$ или $\beta\beta$ гомодимерным TCR.

[0347] Для применения в адоптивной терапии $\alpha\beta$ гетеродимерный TCR можно, например, трансфицировать в виде полноразмерных цепей, имеющих как цитоплазматический, так и трансмембранный домены. В некоторых вариантах осуществления TCR согласно изобретению могут иметь введенную дисульфидную связь между остатками соответствующих константных доменов, как описано, например, в WO 2006/000830.

[0348] TCR согласно изобретению, в частности альфа-бета гетеродимерные TCR, могут содержать последовательность константного домена TRAC альфа-цепи и/или последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2 бета-цепи. Последовательности константных доменов альфа- и бета-цепи могут быть модифицированы путем укорочения или замены для удаления нативной дисульфидной связи между Cys4 экзона 2 TRAC и Cys2 экзона 2 TRBC1 или TRBC2. Последовательность (последовательности) константных доменов альфа- и/или бета-цепи также можно модифицировать путем замены остатков цистеина на Thr 48 TRAC и Ser 57 TRBC1 или TRBC2, при этом указанные цистеины образуют дисульфидную связь между альфа- и бета-константными доменами TCR.

[0349] Аффинность связывания (обратно пропорциональная константе равновесия KD) и период полураспада связывания (выраженный как $T_{1/2}$) можно определить любым подходящим способом. Следует понимать, что удвоение аффинности TCR приводит к уменьшению вдвое KD. $T_{1/2}$ рассчитывают как $\ln 2$, деленное на скорость диссоциации (koff). Таким образом, удвоение $T_{1/2}$ приводит к уменьшению вдвое koff. Значения KD и koff для TCR обычно измеряют для растворимых форм TCR, то есть тех форм, которые усекают для удаления остатков цитоплазматического и трансмембранного доменов. Следовательно,

следует понимать, что данный TCR имеет улучшенную аффинность связывания и/или период полураспада связывания для исходного TCR, если растворимая форма этого TCR обладает указанными характеристиками. Предпочтительно аффинность связывания или период полураспада данного TCR измеряют несколько раз, например, 3 или более раз, используя один и тот же протокол анализа, и получают среднее значение результатов.

[0350] Поскольку TCR согласно изобретению применимы в адоптивной терапии, изобретение включает неприродную и/или очищенную, и/или сконструированную клетку, особенно Т-клетку, презентирующую TCR согласно изобретению. Существует ряд способов, подходящих для трансфекции Т-клеток нуклеиновой кислотой (такой как ДНК, кДНК или РНК), кодирующей TCR согласно изобретению (см., например, Robbins et al., (2008) *J Immunol.* 180: 6116- 6131). Т-клетки, экспрессирующие TCR согласно изобретению, будут пригодны для использования в основанном на адоптивной терапии лечении рака, такого как рак поджелудочной железы и печени. Как известно специалистам в данной области, существует ряд подходящих способов, с помощью которых можно проводить адоптивную терапию (см., например, Rosenberg et al., (2008) *Nat Rev Cancer* 8(4): 299-308).

[0351] Как хорошо известно в данной области, TCR согласно изобретению могут подвергаться посттрансляционным модификациям при экспрессии трансфицированными клетками. Гликозилирование является одной из таких модификаций, которая может включать ковалентное присоединение фрагментов олигосахаридов к определенным аминокислотам в цепи TCR. Например, хорошо известными местами прикрепления олигосахаридов являются остатки аспарагина или остатки серина/треонина. Статус гликозилирования конкретного белка зависит от ряда факторов, включая последовательность белка, конформацию белка и доступность определенных ферментов. Кроме того, статус гликозилирования (то есть тип олигосахарида, ковалентная связь и общее количество присоединений) может влиять на функцию белка. Поэтому при получении рекомбинантных белков часто нужно регулировать гликозилирование. Гликозилирование трансфицированных TCR можно регулировать с помощью мутаций трансфицированного гена (Kuball J et al. (2009), *J Exp Med* 206(2):463-475). Такие мутации также включены в данное изобретение.

[0352] TCR может быть специфичным в отношении антигена из группы MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-A13, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (AGE-B4), гликогенфосфорилаза головного мозга, мелан-А, MAGE-C₁, MAGE-C₂, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2(НОМ-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1, CT-7, альфа-актинин-4, слитый белок Vcr-Abl, Casp-8, бета-катенин, cdc27, cdk4, cdkn2a, соа-1, слитый белок deksan, EF2, слитый белок ETV6-AML1, слитый белок LDLR-фукозилтрансфераза AS, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-2 и 3, нео-PAP, миозин класса I, OS-9, слитый белок pml-RARa, PTPRK, K-ras, N-ras, изомеры триозофосфатов, GnTV, Herv-K-

mel, Lage-1, MAGE-C2, NA-88, Lage-2, SP17 и TRP2-Int2, (MART-I), gp100 (Pmel 17), TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, p15(58), CEA, NY-ESO (LAGE), SCP-1, Hom/Mel-40, p53, H-Ras, HER-2/neu, BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, антигены вируса Эпштейна-Барр, EBNA, антигены E6 и E7 вируса папилломы человека (HPV), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72 -4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, PSCA, CT7, теломераза, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, α -фетопротеин, 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27,29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\170K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (связывающий Mac-2 белок/ассоциированный с циклофилином С белок), TAAL6, TAG72, TLP и TPS.

3.5 Факторы транскрипции

[0353] Регуляторные Т-клетки (Treg) важны для поддержания гомеостаза, регулирования величины и продолжительности воспалительной реакции, а также для предотвращения аутоиммунных и аллергических реакций.

[0354] В общем, считается, что Treg в основном участвуют в подавлении иммунных ответов, частично функционируя как «самопроверка» иммунной системы для предотвращения чрезмерных реакций. В частности, Treg участвуют в поддержании толерантности к аутоантигенам, безвредным средствам, таким как пыльца или пища, и в подавлении аутоиммунных заболеваний.

[0355] Treg обнаруживаются по всему телу, включая без ограничения кишечник, кожу, легкие и печень. Кроме того, клетки Treg также могут быть обнаружены в определенных частях тела, которые не подвергаются непосредственному воздействию внешней среды, таких как селезенка, лимфатические узлы и даже жировая ткань. Известно или подозревается, что каждая из этих популяций Treg-клеток обладает одной или несколькими уникальными особенностями, и дополнительную информацию можно найти у Lehtimäki и Lahesmaa, *Regulatory T cells control immune responses through their non-redundant tissue specific features*, 2013, *FRONTIERS IN IMMUNOL.*, 4(294): 1-10, раскрытие которой полностью включено в настоящий документ.

[0356] Как правило, известно, что Treg требуют TGF- β и IL-2 для надлежащей активации и развития. Treg, экспрессирующие большое количество рецептора IL-2 (IL-2R), зависят от IL-2, продуцируемого активированными Т-клетками. Известно, что Treg продуцируют как IL-10, так и TGF- β , оба сильнодействующие иммуносупрессивные цитокины. Кроме того, известно, что Treg ингибируют способность антигенпрезентирующих клеток (APC) стимулировать Т-клетки. Один из предложенных механизмов ингибирования APC осуществляется через CTLA-4, который экспрессируется Foxp3+ Treg. Считается, что CTLA-4 может связываться с молекулами B7 на APC и либо блокировать эти молекулы, либо удалять их, вызывая интернализацию, что приводит к снижению доступности B7 и неспособности обеспечить адекватную ко-стимуляцию для иммунных ответов. Дополнительное обсуждение происхождения, дифференцировки и

функции Treg можно найти в Dhamne et al., *Peripheral and thymic Foxp3+ regulatory T cells in search of origin, distinction, and function*, 2013, *Frontiers in Immunol.*, 4 (253): 1-11, раскрытие которой полностью включено в настоящий документ.

[0357] Описания и/или аминокислотные последовательности FOXP3, STAT5B и/или HELIOS представлены в настоящем документе и в базе данных www.uniprot.org под учетными номерами: Q9BZS1 (FOXP3), P51692 (STAT5b) и/или Q9UKS7 (HELIOS).

Foxp3

[0358] В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции представляет собой фактор транскрипции Forkhead box P3 (Foxp3). Было показано, что Foxp3 является ключевым регулятором дифференцировки и активности Treg. Фактически, было показано, что мутации с потерей функции в гене Foxp3 приводят к летальному синдрому IPeX (иммунная дисрегуляция, полиэндокринопатия, энтеропатия, X-сцепленный). Пациенты с IPeX страдают тяжелыми аутоиммунными реакциями, персистирующей экземой и колитом. Клетки Treg, экспрессирующие Foxp3, играют ключевую роль в ограничении воспалительных реакций в кишечнике (Josefowicz, S.Z. et al. *Nature*, 2012, 482, 395-U1510).

STAT

[0359] Члены семейства белков преобразователя сигнала и активатора транскрипции (STAT) представляют собой внутриклеточные факторы транскрипции, которые опосредуют многие аспекты клеточного иммунитета, пролиферации, апоптоза и дифференцировки. В первую очередь они активируются янус-киназами, ассоциированными с мембранными рецепторами (JAK). Нарушение регуляции этого пути часто наблюдается в первичных опухолях и приводит к усилению ангиогенеза, повышению выживаемости опухолей и иммуносупрессии. Исследования с нокаутом гена предоставили доказательства того, что белки STAT участвуют в развитии и функционировании иммунной системы и играют роль в поддержании иммунной толерантности и надзоре за опухолью.

[0360] Было идентифицировано семь членов семейства STAT млекопитающих: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 (включая STAT5A и STAT5B) и STATE.

[0361] Внеклеточное связывание цитокинов или факторов роста вызывает активацию связанных с рецептором янус-киназ, которые фосфорилируют специфический остаток тирозина в белке STAT, способствуя димеризации через их домены SH2. Затем фосфорилированный димер активно транспортируется в ядро через тройной комплекс импорта α/β . Первоначально белки STAT были описаны как латентные цитоплазматические факторы транскрипции, поскольку считалось, что фосфорилирование необходимо для удержания в ядре. Однако нефосфорилированные белки STAT также перемещаются между цитозолем и ядром и играют роль в экспрессии генов. Как только STAT достигает ядра, он связывается с консенсусным мотивом распознавания ДНК, называемым гамма-активированными сайтами (GAS), в промоторной области генов, индуцируемых цитокинами, и активирует транскрипцию. Белок STAT может быть дефосфорилирован ядерными фосфатазами, что приводит к инактивации STAT и последующему транспорту из ядра комплексом экспортин-RanGTP.

[0362] В некоторых вариантах осуществления белок STAT согласно настоящему изобретению может представлять собой белок STAT, содержащий модификацию, которая модулирует уровень его экспрессии или активность. В некоторых вариантах осуществления такие модификации включают, среди прочего, мутации, влияющие на димеризацию STAT, связывание белка STAT с партнерами по передаче сигнала, локализацию белка STAT или деградацию белка STAT. В некоторых вариантах осуществления белок STAT согласно настоящему изобретению является конститутивно активным. В некоторых вариантах осуществления белок STAT согласно настоящему изобретению является конститутивно активным благодаря конститутивной димеризации. В некоторых вариантах осуществления белок STAT согласно настоящему изобретению является конститутивно активным благодаря конститутивному фосфорилированию, как описано у Onishi, M. et al., *Mol. Cell. Biol.* July 1998 vol. 18 no. 7 3871-3879, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

3.6 Вакцины

[0363] В одном варианте осуществления одна или несколько последовательностей экспрессии кодирует антиген, например, опухолевый антиген или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления экспрессия такой последовательности продуцирует иммуногенную композицию, например вакцинную композицию, способную давать специфический ответ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой неоантиген.

4. Сайт расщепления

[0364] В некоторых вариантах осуществления две или более последовательности экспрессии в конструкции полинуклеотида могут быть разделены одной или несколькими последовательностями сайта расщепления.

[0365] Сайт расщепления может представлять собой любую последовательность, которая позволяет разделить два или более полипептидов. Сайт расщепления может быть саморасщепляющимся, так что при получении полипептида он немедленно расщепляется на отдельные полипептиды без необходимости какой-либо внешней расщепляющей активности.

[0366] Сайт расщепления может представлять собой сайт расщепления фурином.

[0367] Фурин представляет собой фермент, принадлежащий к семейству субтилизин-подобных пропротеинконвертаз. Членами этого семейства являются пропротеинконвертазы, которые процессируют латентные белки-предшественники в их биологически активные продукты. Фурин представляет собой кальций-зависимую сериновую эндопротеазу, которая может эффективно расщеплять белки-предшественники в их сайтах процессинга основных парных аминокислот. Примеры субстратов фурина включают пропаратиреоидный гормон, предшественник трансформирующего фактора роста бета 1, проальбумин, пробета-секретазу, матриксную металлопротеиназу мембранного типа 1, бета-субъединицу пронервного фактора роста и фактор фон Виллебранда. Фурин расщепляет белки сразу после целевой последовательности основных

аминокислот (канонически Arg-X-(Arg/Lys)-Arg) и накапливается в аппарате Гольджи.

[0368] Сайт расщепления может кодировать саморасщепляющийся пептид.

[0369] Сайт расщепления может функционировать за счет проскока рибосомы, такого как проскок глицил-пропильной связи на С-конце саморасщепляющегося пептида 2А. В некоторых вариантах осуществления стерические затруднения вызывают проскок рибосом. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид 2А содержит последовательность GDVEXNPGP (SEQ ID NO: 324), где X представляет собой Е или S. В некоторых вариантах осуществления белок, кодируемый перед саморасщепляющимся пептидом 2А, присоединяется к саморасщепляющемуся пептиду 2А после трансляции за исключением С-концевого пролина. В некоторых вариантах осуществления белок, кодируемый после саморасщепляющегося пептида 2А, присоединяется после трансляции к пролину на его N-конце.

[0370] Саморасщепляющийся пептид может представлять собой саморасщепляющийся пептид 2А из апто- или кардиовирусов. Первичное расщепление 2А/2В апто- или кардиовирусов опосредовано расщеплением 2А на его собственном С-конце. В arthoviruse, таких как вирусы ящура (FMDV) и вирус ринита лошадей А, область 2А представляет собой короткий участок примерно из 18 аминокислот, который вместе с N-концевым остатком белка 2В (консервативный остаток пролин) представляет собой автономный элемент, способный опосредовать расщепление на своем собственном С-конце (Donnelly et al. (2001)).

[0371] 2А-подобные последовательности были обнаружены в пикорнавирусах, отличных от апто- или кардиовирусов, «пикорнавирусоподобных» вирусах насекомых, ротавирусах типа С и повторяющихся последовательностях у видов *Tyranosoma* и бактериальной последовательности (Donnelly et al. (2001)). Сайт расщепления может содержать одну из этих 2А-подобных последовательностей, таких как перечислены в таблице 8.

[0372] В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой F2А. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид получают из вируса ящура. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой E2А. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид получают из вируса ринита А лошадей. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой P2А. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид получают из свиного teschovirus-1. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой T2А. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид получен из вируса *thosea asigna*. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид имеет последовательность, указанную в таблице 8.

[0373] В одном варианте осуществления последовательности экспрессии, кодирующие терапевтические белки, разделенные сайтом расщепления, имеют одинаковый

уровень экспрессии белка.

[0374] В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид описан в Liu, Z., Chen, O., Wall, J.B.J. et al. Систематическое сравнение пептидов 2A для клонирования мультигенов в полицистронном векторе. *Sci Rep* 7, 2193 (2017).

5. Полинуклеотиды, содержащие второй IRES

[0375] В некоторых вариантах осуществления отношения экспрессии терапевтических белков, кодируемых первой и второй последовательностями экспрессии, можно регулировать или на них может влиять IRES, используемый в *circRNA*, и то, разделяет ли сайт расщепления или второй IRES первую и вторую последовательности экспрессии. Когда желательна одинаковая экспрессия белков, кодируемых первой и второй последовательностями экспрессии, *circRNA* может кодировать сайт расщепления, например, саморасщепляющийся пептид 2A, между первой последовательностью экспрессии и второй последовательностью экспрессии. Когда желательна более высокая экспрессия белка, кодируемого первой последовательностью экспрессии, *circRNA* может кодировать первую IRES и вторую IRES, при этом первый IRES связана с большей экспрессией, чем второй IRES, или при этом второй IRES представляет собой межгенную область (IGR) IRES. Когда желательна более высокая экспрессия белка, кодируемого второй последовательностью экспрессии, *circRNA* может кодировать первую IRES и вторую IRES, при этом второй IRES связана с большей экспрессией, чем первый IRES.

[0376] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид РНК содержит первый IRES и второй IRES, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ДНК-вектор кодирует первый IRES и второй IRES, как описано в настоящем документе.

[0377] В варианте осуществления первый IRES и второй IRES имеют одинаковую последовательность. В варианте осуществления первый IRES и второй IRES имеют разные последовательности. В одном варианте осуществления первый IRES представляет собой IRES, имеющий последовательность, указанную в таблице 1 (SEQ ID NO: 1-72). В некоторых вариантах осуществления первый IRES представляет собой IRES *Salivirus*. В некоторых вариантах осуществления первый IRES представляет собой IRES *Salivirus* SZ1. В одном варианте осуществления второй IRES представляет собой IRES, имеющий последовательность, указанную в таблице 1 (SEQ ID NO: 1-72). В некоторых вариантах осуществления второй IRES представляет собой IRES *Salivirus*. В некоторых вариантах осуществления первый IRES представляет собой IRES *Salivirus* SZ1.

[0378] В некоторых вариантах осуществления первый IRES связан с большей экспрессией, чем второй IRES (например с экспрессией на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% выше по сравнению с конструкциями, содержащими один IRES). В некоторых вариантах осуществления второй IRES связан с большей экспрессией, чем первый IRES (например с экспрессией 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% выше по сравнению с использованием конструкций, содержащих один IRES). В некоторых вариантах осуществления второй IRES представляет собой межгенную область

(IGR) IRES.

[0379] Экспрессия 2 белков с одним полинуклеотидом *circRNA* имеет преимущества по сравнению с экспрессией с использованием нескольких полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления экспрессия 2 белков из полинуклеотида *circRNA* согласно изобретению приводит к более стабильным отношениям экспрессии, чем экспрессия из нескольких полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления экспрессия 2 белков из полинуклеотида *circRNA* согласно изобретению приводит к временной экспрессии, которая может быть нужной по сравнению с длительной экспрессией ДНК.

6. Получение полинуклеотидов

[0380] Векторы, представленные в данном документе, могут быть получены с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Например, различные элементы векторов, представленных в данном документе, могут быть получены с использованием рекомбинантных способов, например за счет скрининга кДНК и геномных библиотек из клеток или путем получения полинуклеотидов из вектора, который, как известно, их содержит.

[0381] Различные элементы векторов, представленных в настоящем документе, также могут быть получены синтетическим путем, а не клонированы, на основе известных последовательностей. Полная последовательность может быть собрана из перекрывающихся олигонуклеотидов, полученных стандартными способами, и собрана в полную последовательность. См., например, Edge, *Nature* (1981) 292:756; Nambair et al., *Science* (1984) 223 : 1299; and Jay et al., *J. Biol. Chem.* (1984) 259:631 1.

[0382] Таким образом, определенные нуклеотидные последовательности могут быть получены из векторов, содержащих нужные последовательности, или синтезированы полностью или частично с использованием различных методик синтеза олигонуклеотидов, известных в данной области, таких как методы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР), когда это подходит. Один из способов получения нуклеотидных последовательностей, кодирующих нужные элементы вектора, заключается в отжиге комплементарных наборов перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов, полученных в обычном автоматическом синтезаторе полинуклеотидов, с последующим лигированием соответствующей ДНК-лигазой и амплификации лигированной нуклеотидной последовательности с помощью ПЦР. См., например, Jayagaman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:4084-4088. Кроме того, можно использовать олигонуклеотид-направленный синтез (Jones et al., *Nature* (1986) 54:75-82), олигонуклеотид-направленный мутагенез ранее существовавших нуклеотидных участков Riechmann et al., *Nature* (1988) 332:323-327 и Verhoeven et al., *Science* (1988) 239: 1534-1536), и ферментативное заполнение олигонуклеотидов с гэпами с использованием ДНК-полимеразы Т4 (Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86: 10029-10033).

[0383] Предшественник РНК, представленный в настоящем документе, может быть получен путем инкубации вектора, представленного в настоящем документе, в условиях, допускающих транскрипцию предшественника РНК, кодируемого вектором. Например, в

некоторых вариантах осуществления предшественник РНК синтезируют путем инкубации вектора, представленного в настоящем документе, который содержит промотор РНК-полимеразы перед его 5'-образующей дуплекс областью и/или последовательностями экспрессии с совместимым ферментом РНК-полимеразы в условиях, допускающих транскрипцию *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления вектор инкубируют внутри клетки с помощью РНК-полимеразы бактериофага или в ядре клетки с помощью РНК-полимеразы II хозяина.

[0384] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ получения предшественника РНК путем проведения транскрипции *in vitro* с использованием вектора, представленного в настоящем документе, в качестве матрицы (например вектора, представленного в настоящем документе, с промотором РНК-полимеразы, расположенным перед 5'-образующей дуплекс областью).

[0385] В некоторых вариантах осуществления полученный предшественник РНК можно использовать для получения кольцевой РНК (например полинуклеотида кольцевой РНК, представленного в настоящем документе) путем инкубации его в присутствии ионов магния и гуанозинового нуклеотида или нуклеозида при температуре, при которой происходит циркуляризация РНК (например от 20°C до 60°C).

[0386] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ получения кольцевой РНК. В некоторых вариантах осуществления способ включает синтез предшественника РНК путем транскрипции (например последовательной транскрипции) с использованием в качестве матрицы вектора, представленного в настоящем документе (например 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), последовательность экспрессии, полинуклеотидная последовательность, кодирующая сайт расщепления, вторая последовательность экспрессии и 5'-фрагмент интрона группы I), и инкубирование полученного предшественника РНК в присутствии двухвалентных катионов (например ионов магния) и GTP, чтобы циркуляризовать его с образованием кольцевой РНК. В некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящем документе предшественник РНК способен к циркуляризации в отсутствие ионов магния и GTP и/или без стадии инкубации с ионами магния и GTP. Было обнаружено, что кольцевая РНК обладает пониженной иммуногенностью по сравнению с соответствующей мРНК, по меньшей мере частично, потому что мРНК содержит иммуногенный 5'-кэп. При транскрипции ДНК-вектора с определенных промоторов (например промотора T7) для получения предшественника РНК следует понимать, что 5'-конец предшественника РНК представляет собой G. Для снижения иммуногенности композиции кольцевой РНК, которая содержит низкий уровень примесной линейной мРНК во время транскрипции может быть обеспечен избыток GMP по сравнению с GTP, так что большинство транскриптов содержат 5'-GMP, который не может быть экпирован. Поэтому в некоторых вариантах транскрипцию проводят при наличии избытка GMP. В некоторых вариантах осуществления транскрипцию проводят, когда отношение концентрации GMP к концентрации GTP находится в диапазоне

от примерно 3:1 до примерно 15:1, например, от примерно 3:1 до примерно 10:1, от примерно 3:1 до примерно 5:1, примерно 3:1, примерно 4:1 или примерно 5:1.

[0387] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую кольцевую РНК, очищали. Кольцевая РНК может быть очищена любым известным методом, обычно используемым в данной области, таким как колоночная хроматография, гель-фильтрационная хроматография и эксклюзионная хроматография. В некоторых вариантах осуществления очистка включает одну или несколько из следующих стадий: обработка фосфатазой, эксклюзионная очистка методом HPLC и расщепление РНКазой R. В некоторых вариантах осуществления очистка включает следующие этапы по порядку: расщепление РНКазой R, обработка фосфатазой и очистка методом эксклюзионной HPLC. В некоторых вариантах осуществления очистка включает HPLC с обращенной фазой. В некоторых вариантах осуществления очищенная композиция содержит меньше двухцепочечной РНК, фрагментов ДНК, трифосфорилированной РНК, белков-фосфатаз, протеин-лигаз, кэпирующих ферментов и/или РНК с разрывами, чем неочищенная РНК. В некоторых вариантах осуществления очищенная композиция менее иммуногенна, чем неочищенная композиция. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки, подвергнутые воздействию очищенной композиции, продуцируют меньше TNF α , RIG-I, IL-2, IL-6, IFN γ и/или интерферона типа 1, например IFN- β 1, чем иммунные клетки, подвергнутые воздействию неочищенного сочинения.

7. Наночастицы

[0388] В некоторых аспектах в данном документе представлены фармацевтические композиции, содержащие кольцевую РНК, представленную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие фармацевтические композиции составляют с наночастицами для облегчения доставки.

[0389] В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК, представленная в настоящем документе, может быть доставлена и/или нацелена на клетку в переносчике, например в наночастице или композиции, содержащей наночастицу. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК также может быть доставлена субъекту в переносчике или композиции, содержащей переносчик. В некоторых вариантах осуществления переносчик представляет собой наночастицу. В некоторых вариантах осуществления наночастица представляет собой липидную наночастицу, твердую липидную наночастицу, полимерную наночастицу ядро-оболочка или биоразлагаемую наночастицу. В некоторых вариантах осуществления переносчик содержит или покрыт одним или несколькими катионными липидами, некаатионными липидами, ионизируемыми липидами, PEG-модифицированными липидами, полимерами полиглутаминовой кислоты, полимерами гиалуроновой кислоты, поли- β -аминоэфирными, поли-бета-аминопептидами, или положительно заряженными пептидами.

[0390] В одном варианте осуществления переносчик может быть выбран и/или получен для оптимизации доставки circRNA в клетку-мишень. Например, если клетка-мишень представляет собой гепатоцит, свойства переносчика (например размер, заряд

и/или рН) могут быть оптимизированы для эффективной доставки такого переносчика в клетку-мишень, снижения иммунного клиренса и/или стимулирования удержания в этой клетке-мишени.

[0391] Использование переносчиков для облегчения доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени предусмотрено настоящим изобретением. Липосомы (например липосомальные липидные наночастицы), как правило, применимы в различных вариантах применения в исследованиях, промышленности и медицине, особенно для их использования в качестве переносчиков диагностических или терапевтических соединений *in vivo* (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998; Drummond et al., Pharmacol. Rev., 51: 691-743, 1999) и обычно характеризуются как микроскопические везикулы, имеющие внутреннее водное пространство, отделенное от внешней среды мембраной из одного или нескольких двойных слоев. Двухслойные мембраны липосом обычно образованы амфифильными молекулами, такими как липиды синтетического или природного происхождения, которые содержат пространственно разделенные гидрофильные и гидрофобные домены (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Бислойные мембраны липосом также могут быть образованы амфифильными полимерами и поверхностно-активными веществами (например полимеросомами, ниосомами и так далее).

[0392] В контексте настоящего изобретения переносчик обычно служит для транспорта *circRNA* в клетку-мишень. Для целей настоящего изобретения получают переносчики, содержащие или инкапсулирующие нужные нуклеиновые кислоты. Процесс включения нужного объекта (например нуклеиновой кислоты) в липосому часто называют загрузкой (Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Включенные в липосомы нуклеиновые кислоты могут быть полностью или частично расположены во внутреннем пространстве липосомы, внутри двухслойной мембраны липосомы или связаны с внешней поверхностью липосомной мембраны. Целью включения *circRNA* в переносчик, такой как липосома, часто является защита нуклеиновой кислоты от окружающей среды, которая может содержать ферменты или химические вещества, разлагающие нуклеиновые кислоты, и/или системы или рецепторы, вызывающие быстрое выделение нуклеиновой кислоты. Соответственно, в варианте осуществления настоящего изобретения выбранный переносчик способен повышать стабильность содержащейся в нем *circRNA*. Липосома может позволить инкапсулированной *circRNA* достичь клетки-мишени или, альтернативно, ограничить доставку такой *circRNA* в другие участки или клетки, где присутствие введенной *circRNA* может быть бесполезным или нежелательным. Кроме того, включение *circRNA* в переносчик, такой как, например, катионная липосома, также облегчает доставку такой *circRNA* в клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления переносчик, раскрытый в настоящем документе, может служить для стимуляции эндосомального или лизосомального высвобождения, например, содержимого, которое инкапсулировано в переносчике (например в липидных наночастицах).

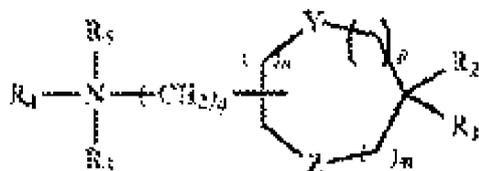
[0393] В идеале, переносчики готовят для инкапсуляции одной или нескольких нужных кольцевых РНК таким образом, чтобы композиции демонстрировали высокую

эффективность трансфекции и повышенную стабильность. В то время как липосомы могут облегчить введение нуклеиновых кислот в клетки-мишени, добавление поликатионов (например поли-L-лизина и протамина) в качестве сополимера может в некоторых случаях заметно повысить эффективность трансфекции некоторых типов катионных липосом в 2-28 раз в ряде клеточных линий как *in vitro*, так и *in vivo*. (См. N J. Caplen, et al., *Gene Ther.* 1995; 2: 603; S. Li, et al., *Gene Ther.* 1997; 4, 891.)

[0394] В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, представлены ионизируемые липиды, которые можно использовать в качестве компонента переносчика для облегчения или улучшения доставки и высвобождения кольцевой РНК в одну или несколько клеток-мишеней (например путем проникновения или слияния с липидными мембранами таких клеток-мишеней). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид содержит одну или несколько расщепляемых функциональных групп (например дисульфид), которые позволяют, например, гидрофильной функциональной головной группе диссоциировать от липофильной функциональной хвостовой группы соединения (например при воздействии окислительных, восстановительных или кислых условий), тем самым облегчая фазовый переход в липидном бислое одной или нескольких клеток-мишеней.

[0395] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой липид, описанный в международной заявке на патент PCT/US2018/058555.

[0396] В некоторых вариантах осуществления катионный липид имеет следующую формулу:



где:

R_1 и R_2 являются либо одинаковыми, либо разными и независимо необязательно представляют замещенный C_{10} - C_{24} алкил, необязательно замещенный C_{10} - C_{24} алкенил, необязательно замещенный C_{10} - C_{24} алкинил или необязательно замещенный C_{10} - C_{24} ацил;

R_3 и R_4 являются либо одинаковыми, либо разными и независимо необязательно представляют замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкенил или необязательно замещенный C_2 - C_6 алкинил, и R_3 и R_4 можно объединить для образования необязательно замещенного гетероциклического кольца от 4 до 6 атомов углерода и 1 или 2 гетероатомов, выбранных из азота и кислорода;

R_5 либо отсутствует, либо присутствует, а когда присутствует, представляет водород или C_1 - C_6 алкил; m , n и p являются либо одинаковыми, либо разными и независимо представляют либо 0, либо 1 при условии, что m , n и p одновременно не равны 0; q составляет 0, 1, 2, 3 или 4; и

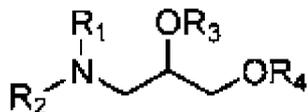
Y и Z являются либо одинаковыми, либо разными и независимо представляют O, S

или NH.

[0397] В одном варианте осуществления R_1 и R_2 каждый представляет линолеил, а аминоклипид представляет собой дилинолеиламиноклипид.

[0398] В одном варианте осуществления аминоклипид представляет собой дилинолеиламиноклипид.

[0399] В разных других вариантах осуществления катионный липид имеет следующую структуру:



или фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

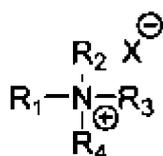
R_1 и R_2 каждый независимо выбирают из группы, состоящей из H и C_1 - C_3 алкилов;

и

R_3 и R_4 каждый независимо представляет алкильную группу, имеющую от приблизительно 10 до приблизительно 20 атомов углерода, причем по меньшей мере один из R_3 и R_4 содержит по меньшей мере два участка ненасыщенности.

[0400] В некоторых вариантах осуществления R_3 и R_4 каждый независимо выбирают из додекадиенила, тетрадекадиенила, гексадекадиенила, линолеила и икосадиенила. В одном варианте осуществления R_3 и R_4 оба представляют собой линолеил. В некоторых вариантах осуществления R_3 и/или R_4 могут содержать по меньшей мере три участка ненасыщенности (например R_3 и/или R_4 могут представлять собой, например, додекатриенил, тетрадекатриенил, гексадекатриенил, линоленил и икосатриенил).

[0401] В некоторых вариантах осуществления катионный липид имеет следующую структуру:



или фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

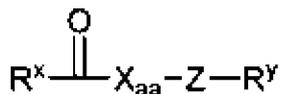
R_1 и R_2 каждый независимо выбирают из H и C_1 - C_3 алкилов;

R_3 и R_4 каждый независимо представляет алкильную группу, имеющую от приблизительно 10 до приблизительно 20 атомов углерода, причем по меньшей мере один из R_3 и R_4 содержит по меньшей мере два участка ненасыщенности.

[0402] В одном варианте осуществления R_3 и R_4 являются одинаковыми, например в некоторых вариантах осуществления R_3 и R_4 оба представляют собой линолеил (C_{18} -алкил). В другом варианте осуществления R_3 и R_4 разные, например в некоторых вариантах осуществления R_3 представляет тетрадекатриенил (C_{14} -алкил), а R_4 представляет собой линолеил (C_{18} -алкил). В предпочтительном варианте осуществления катионный липид

(липиды) согласно настоящему изобретению являются симметричными, то есть R_3 и R_4 являются одинаковыми. В другом предпочтительном варианте осуществления и R_3 и R_4 содержат по меньшей мере два участка ненасыщенности. В некоторых вариантах осуществления R_3 и R_4 каждый независимо выбирают из додекадиенила, тетрадекадиенила, гексадекадиенила, линолеила и икосадиенила. В одном варианте осуществления R_3 и R_4 оба представляют собой линолеил. В некоторых вариантах осуществления R_3 и/или R_4 содержат по меньшей мере три участка ненасыщенности, и каждый независимо выбирают из додекатриенила, тетрадекатриенила, гексадекатриенила, линоленила и икосатриенила.

[0403] В различных вариантах осуществления катионный липид имеет формулу:



или фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

X_{aa} представляет собой D- или L-аминокислотный остаток, имеющий формулу - $NR^N-CR^1R^2-C(C=O)-$ или пептид или пептид из аминокислотных остатков, имеющий формулу $-\{NR^N-CR^1R^2-C(C=O)\}_n-$, где n является целым числом от 2 до 20;

R^1 независимо в каждом случае представляет собой неводородную или замещенную или незамещенную боковую цепь аминокислоты;

R^2 и R^N независимо в каждом случае представляют собой водород, органическую группу, состоящую из атомов углерода, кислорода, азота, серы и водорода или любой комбинации вышеперечисленного и имеющую от 1 до 20 атомов углерода, $C_{(1-5)}$ алкил, циклоалкил, циклоалкилалкил, $C_{(1-5)}$ алкенил, $C_{(1-5)}$ алкинил, $C_{(1-5)}$ алканоил, $C_{(1-5)}$ алканоилокси, $C_{(1-5)}$ алкокси, $C_{(1-5)}$ алкокси- $C_{(1-5)}$ алкил, $C_{(1-5)}$ алкокси- $C_{(1-5)}$ алкокси, $C_{(1-5)}$ алкил-амино- $C_{(1-5)}$ алкил-, $C_{(1-5)}$ диалкил-амино- $C_{(1-5)}$ алкил-, нитро- $C_{(1-5)}$ алкил, циано- $C_{(1-5)}$ алкил, арил- $C_{(1-5)}$ алкил, 4-бифенил- $C_{(1-5)}$ алкил, карбоксил или гидроксил;

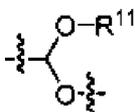
Z представляет -NH-, -O-, -S-, -CH₂S-, -CH₂S(O)- или органический линкер, состоящий из 1-40 атомов, выбранных из атомов водорода, углерода, кислорода, азота и серы (предпочтительно, Z представляет -NH- или -O-);

R^x и R^y независимо представляют собой (i) липофильный хвост, полученный из липида (который может быть природным или синтетическим), например фосфолипида, гликолипида, триацилглицерина, глицерофосфолипида, сфинголипида, керамида, сфингомиелина, цереброзида или ганглиозида, причем хвост необязательно включает в себя стероид; (ii) концевую группу аминокислоты, выбранную из водорода, гидроксила, amino и органической защитной группы; или (iii) замещенный или незамещенный $C_{(3-22)}$ алкил, $C_{(6-12)}$ циклоалкил, $C_{(6-12)}$ циклоалкил- $C_{(3-22)}$ алкил, $C_{(3-22)}$ алкенил, $C_{(3-22)}$ алкинил, $C_{(3-22)}$ алкокси или $C_{(6-12)}$ -алкокси $C_{(3-22)}$ алкил;

[0404] В некоторых вариантах осуществления один из R^x и R^y представляет собой липофильный хвост согласно определению выше, а другой представляет собой концевую группы аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления и R^x и R^y представляют

собой липофильные хвосты.

[0405] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из R^x и R^y прерывается одной или несколькими биоразлагаемыми группами (например $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{SC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$, $-\text{OC}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{C}(\text{O})(\text{NR}^5)-$, $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{S})(\text{NR}^5)-$, $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OSi}(\text{R}^5)_2\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})-$ или



$\text{OC}(\text{O})(\text{CR}^3\text{R}^4)\text{C}(\text{O})-$ или

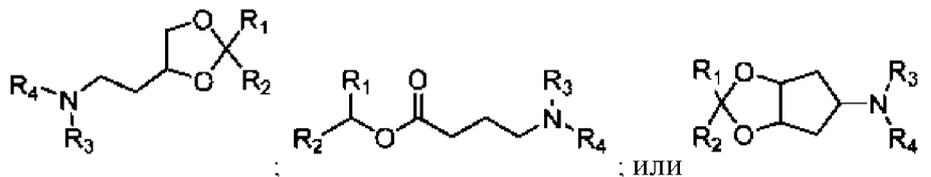
[0406] В некоторых вариантах осуществления R^{11} представляет собой C_2 - C_8 алкил или алкенил.

[0407] В некоторых вариантах осуществления R^5 в каждом случае независимо представляет собой H или алкил.

[0408] В некоторых вариантах осуществления R^3 и R^4 в каждом случае независимо представляют собой H, галоген, OH, алкил, алкокси, $-\text{NH}_2$, алкиламино или диалкиламино; или R^3 и R^4 вместе с атомом углерода, к которому они непосредственно прикреплены, образуют циклоалкильную группу. В некоторых отдельных вариантах осуществления в каждом случае R^3 и R^4 независимо представляют собой H или C_1 - C_4 алкил.

[0409] В некоторых вариантах осуществления R^x и R^y каждый независимо имеет одну или несколько двойных связей углерод-углерод.

[0410] В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой одно из следующего:

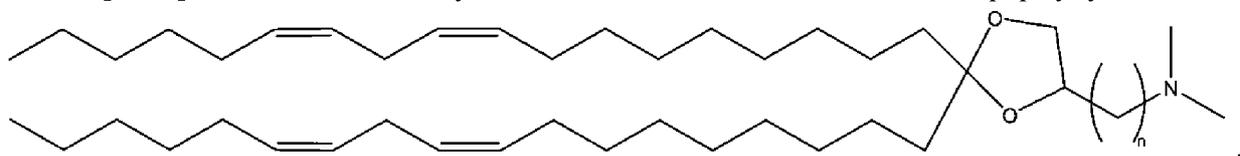


или их фармацевтически приемлемой соли, таутомера, пролекарства или стереоизомера, где:

R_1 и R_2 каждый независимо представляет алкил, алкенил или алкинил, каждый из которых может быть необязательно замещенным;

R_3 и R_4 каждый независимо представляет C_1 - C_6 алкил, или R_3 и R_4 взяты вместе для образования необязательно замещенного гетероциклического кольца.

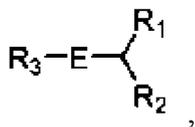
[0411] Типичный используемый дилинолеиламинолипид имеет формулу:



где n составляет 0, 1, 2, 3 или 4.

[0412] В одном варианте осуществления катионный липид представляет DLin-K-DMA. В одном варианте осуществления катионный липид представляет DLin-kC2-DMA (DLin-K-DMA выше, где n составляет 2).

[0413] В одном варианте осуществления катионный липид имеет следующую структуру:



или фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

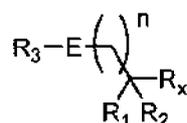
R_1 и R_2 каждый независимо представляет в каждом случае необязательно замещенный C_{10} - C_{30} алкил, необязательно замещенный C_{10} - C_{30} алкенил, необязательно замещенный C_{10} - C_{30} алкинил или необязательно замещенный C_{10} - C_{30} ацил;

R_3 представляет H, необязательно замещенный C_2 - C_{10} алкил, необязательно замещенный C_2 - C_{10} алкенил, необязательно замещенный C_2 - C_{10} алкилил, алкилгетроцикл, алкилфосфат, алкилфосфотиоат, алкилфосфородитиоат, алкилфосфонат, алкиламин, гидроксилалкил, ω -аминоалкил, ω -(замещенный)аминоалкил, ω -фосфоалкил, ω -тиофосфоалкил, необязательно замещенный полиэтиленгликоль (PEG, мм 100-40 K), необязательно замещенный mPEG (мм 120-40 K), гетероарил или гетероцикл, или линкер-лиганд, например в некоторых вариантах осуществления R_3 представляет $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_n-$, где n составляет 1, 2, 3 или 4;

E представляет O, S, N(Q), C(O), OC(O), C(O)O, N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)NfQ), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, арил, гетероарил, циклический или гетероцикл, например -C(O)O, где - представляет место соединения с R_3 ;

а Q представляет H, алкил, ω -аминоалкил, ω -(замещенный)аминоалкил, ω -фосфоалкил или ω -тиофосфоалкил.

В одном конкретном варианте осуществления катионный липид вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 имеет следующую структуру:



или ее фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

E представляет O, S, N(Q), CfO), N(Q)CiO), CCO)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, арил, гетероарил, циклический или гетероцикл;

Q представляет H, алкил, ω -аминоалкил, ω -(замещенный)аминоалкил, ω -фосфоалкил или ω -тиофосфоалкил;

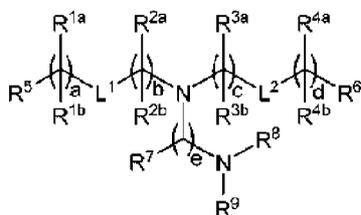
R_1 и R_2 и R_x в каждом случае каждый независимо представляет H, необязательно

замещенный C_1 - C_{10} алкил, необязательно замещенный C_{10} - C_{30} алкил, необязательно замещенный C_{10} - C_{30} алкенил, необязательно замещенный C_{10} - C_{30} алкинил, необязательно замещенный C_{10} - C_3 ацил, или линкер-лиганд, при условии, что по меньшей мере один из R_1 , R_2 и R_x не является H;

R_3 представляет H, необязательно замещенный C_1 - C_{10} алкил, необязательно замещенный C_2 - C_{10} алкенил, необязательно замещенный C_2 - C_{10} алкинил, алкилгетероцикл, алкилфосфат, алкилфосфотиоат, алкилфосфородитиоат, алкилфосфонат, алкиламин, гидроксильный алкил, ω -аминоалкил, ω -(замещенный)аминоалкил, ω -фосфоалкил, ω -тиофосфоалкил, необязательно замещенный полиэтиленгликоль (PEG, мм 100-40К), необязательно замещенный mPEG (мм 120-40К), гетероарил, или гетероцикл, или линкер-лиганд; а

n составляет 0, 1, 2, или 3.

В одном варианте осуществления катионный липид вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 имеет структуру формулы I:



I

или ее фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

один из L^1 или L^2 представляет $O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)X-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NRaC(=O)-$, $-C(=O)NRa-$, $NRaC(=O)NRa-$, $-OC(=O)NRa-$ или $-NRaC(=O)O-$, а другой из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)X-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NRaC(=O)-$, $-C(=O)NRa-$, $NRaC(=O)NRa-$, $-OC(=O)NRa-$

или

$-NRaC(=O)O-$ или прямую связь;

Ra представляет H или C_1 - C_{12} алкил;

R^{1a} и R^{1b} в каждом случае независимо представляют либо (a) H и C_1 - C_{12} алкил, либо (b) R^{1a} представляет H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{2a} и R^{2b} в каждом случае независимо представляют либо (a) H и C_1 - C_{12} алкил, либо (b) R^{2a} представляет H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{3a} и R^{3b} в каждом случае независимо представляют либо (a) H и C_1 - C_{12} алкил, либо (b) R^{3a} представляет H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он

связан, и вместе с соседним R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют либо (а) Н и C_1-C_{12} алкил, либо (б) R^{4a} представляет Н или C_1-C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^5 и R^6 каждый независимо представляет метил или циклоалкил;

R^7 в каждом случае независимо представляет Н или C_1-C_{12} алкил;

R^8 и R^9 каждый независимо представляет незамещенный C_1-C_{12} алкил; или R^8 и R^9 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5, 6 или 7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее один атом азота;

а и d каждый независимо составляет целое число от 0 до 24;

b и c каждый независимо составляет целое число от 1 до 24;

e составляет 1 или 2;

а x составляет 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления формулы I L^1 и L^2 независимо представляют $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$.

В некоторых вариантах осуществления формулы I по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} или R^{4a} представляет C_1-C_{12} алкил, или по меньшей мере один из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$. В других вариантах осуществления R^{1a} и R^{1b} не являются изопропилом, когда a составляет 6, или n-бутилом, когда a составляет 8.

В других вариантах осуществления формулы I по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} или R^{4a} представляет C_1-C_{12} алкил, или по меньшей мере один из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$; а

R^{1a} и R^{1b} не являются изопропилом, когда a составляет 6 или n-бутилом, когда a составляет 8.

В других вариантах осуществления формулы I R^8 и R^9 каждый независимо представляет незамещенный C_1-C_{12} алкил; или R^8 и R^9 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5, 6 или 7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее один атом азота;

В некоторых вариантах осуществления формулы I любой из L^1 или L^2 может представлять $-O(C=O)-$ или двойную углерод-углеродную связь. L^1 и L^2 каждый может представлять $-O(C=O)-$, или каждый может представлять двойную углерод-углеродную связь.

В некоторых вариантах осуществления формулы I один из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$. В других вариантах осуществления и L^1 и L^2 представляют $-O(C=O)-$.

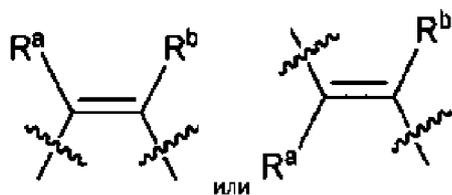
В некоторых вариантах осуществления формулы I один из L^1 или L^2 представляет $-(C=O)O-$. В других вариантах осуществления и L^1 и L^2 представляют $-(C=O)O-$.

В некоторых других вариантах осуществления формулы I один из L^1 или L^2 представляет двойную углерод-углеродную связь. В других вариантах осуществления и L^1

и L^2 представляют двойную углерод-углеродную связь.

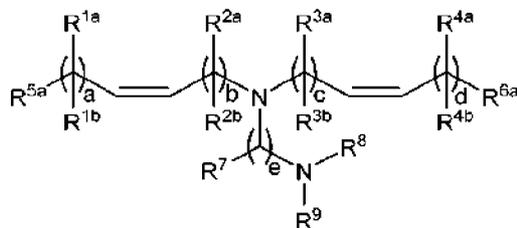
В других вариантах осуществления формулы I один из L^1 или L^2 представляет -O(C=O)-, а другой из L^1 или L^2 представляет -(C=O)O-. В других вариантах осуществления один из L^1 или L^2 представляет -O(C=O)-, а другой из L^1 или L^2 представляет двойную углерод-углеродную связь. В других вариантах осуществления один из L^1 или L^2 представляет -(C=O)O-, а другой из L^1 или L^2 представляет двойную углерод-углеродную связь.

Понятно, что «углерод-углеродная» двойная связь в рамках настоящего изобретения относится к одной из следующих структур:



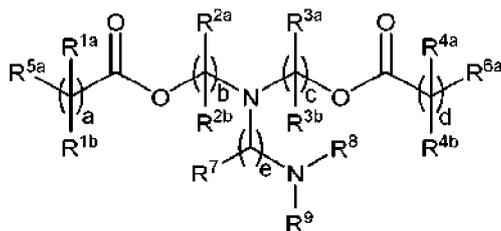
где R^a и R^b в каждом случае независимо представляют H или заместитель. Например, в некоторых вариантах осуществления R^a и R^b в каждом случае независимо представляют H, C_1 - C_{12} алкил или циклоалкил, например H или C_1 - C_{12} алкил.

В других вариантах осуществления липидные соединения формулы I имеют следующую формулу (Ia):



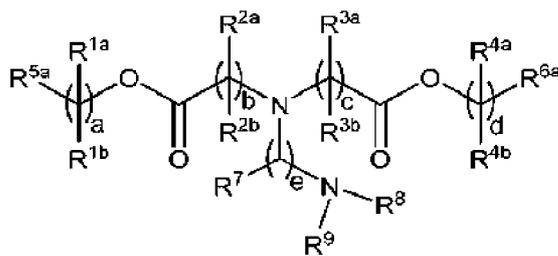
(Ia)

В других вариантах осуществления липидные соединения формулы I имеют следующую формулу (Ib):



(Ib)

В других вариантах осуществления липидные соединения формулы I имеют следующую формулу (Ic):



(Ic)

В некоторых вариантах осуществления липидного соединения формулы I a, b, c и d каждый независимо составляет целое число от 2 до 12 или целое число от 4 до 12. В других вариантах осуществления a, b, c и d каждый независимо составляет целое число от 8 до 12 или от 5 до 9. В некоторых определенных вариантах осуществления a составляет 0. В некоторых вариантах осуществления a составляет 1. В других вариантах осуществления a составляет 2. В других вариантах осуществления a составляет 3. В других вариантах осуществления a составляет 4. В некоторых вариантах осуществления a составляет 5. В других вариантах осуществления a составляет 6. В других вариантах осуществления a составляет 7. В других вариантах осуществления a составляет 8. В некоторых вариантах осуществления a составляет 9. В других вариантах осуществления a составляет 10. В других вариантах осуществления a составляет 11. В других вариантах осуществления a составляет 12. В некоторых вариантах осуществления a составляет 13. В других вариантах осуществления a составляет 14. В других вариантах осуществления a составляет 15. В других вариантах осуществления a составляет 16.

В некоторых других вариантах осуществления формулы I b составляет 1. В других вариантах осуществления b составляет 2. В других вариантах осуществления b составляет 3. В других вариантах осуществления b составляет 4. В некоторых вариантах осуществления b составляет 5. В других вариантах осуществления b составляет 6. В других вариантах осуществления b составляет 7. В других вариантах осуществления b составляет 8. В некоторых вариантах осуществления b составляет 9. В других вариантах осуществления b составляет 10. В других вариантах осуществления b составляет 11. В других вариантах осуществления b составляет 12. В некоторых вариантах осуществления b составляет 13. В других вариантах осуществления b составляет 14. В других вариантах

осуществления b составляет 15. В других вариантах осуществления b составляет 16.

В некоторых других вариантах осуществления формулы I c составляет 1. В других вариантах осуществления c составляет 2. В других вариантах осуществления c составляет 3. В других вариантах осуществления c составляет 4. В некоторых вариантах осуществления c составляет 5. В других вариантах осуществления c составляет 6. В других вариантах осуществления c составляет 7. В других вариантах осуществления c составляет 8. В некоторых вариантах осуществления c составляет 9. В других вариантах осуществления c составляет 10. В других вариантах осуществления c составляет 11. В других вариантах осуществления c составляет 12. В некоторых вариантах осуществления c составляет 13. В других вариантах осуществления c составляет 14. В других вариантах осуществления c составляет 15. В других вариантах осуществления c составляет 16.

В некоторых определенных других вариантах осуществления формулы I d составляет 0. В некоторых вариантах осуществления d составляет 1. В других вариантах осуществления d составляет 2. В других вариантах осуществления d составляет 3. В других вариантах осуществления d составляет 4. В некоторых вариантах осуществления d составляет 5. В других вариантах осуществления d составляет 6. В других вариантах осуществления d составляет 7. В других вариантах осуществления d составляет 8. В некоторых вариантах осуществления d составляет 9. В других вариантах осуществления d составляет 10. В других вариантах осуществления d составляет 11. В других вариантах осуществления d составляет 12. В некоторых вариантах осуществления d составляет 13. В других вариантах осуществления d составляет 14. В других вариантах осуществления d составляет 15. В других вариантах осуществления d составляет 16.

В некоторых других вариантах осуществления формулы I a и d одинаковые.

В некоторых других вариантах осуществления b и c одинаковые. В некоторых других конкретных вариантах осуществления a и d одинаковые, и b и c одинаковые.

Сумма a и b и сумма c и d в формуле I являются факторами, которые можно варьировать для получения липида формулы I, обладающего нужными свойствами. В одном варианте осуществления a и b выбирают так, чтобы их сумма составляла целое число в диапазоне от 14 до 24. В других вариантах осуществления c и d выбирают так, чтобы их сумма составляла целое число в диапазоне от 14 до 24. В дополнительном варианте осуществления сумма a и b и сумма c и d одинаковые. Например, в некоторых вариантах осуществления сумма a и b и сумма c и d обе составляют одинаковое целое число, которое может колебаться от 14 до 24. В других вариантах осуществления a , b , c и d выбирают так, чтобы сумма a и b и сумма c и d составляла 12 или более.

В некоторых вариантах осуществления формулы I e составляет 1. В других вариантах осуществления e составляет 2.

Заместители в R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} формулы I конкретно не ограничены. В некоторых вариантах осуществления R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} в каждом случае представляют H. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_{12} алкил. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} ,

R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_8 алкил. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_6 алкил. В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил представляет метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, трет-бутил, n-гексил или n-октил.

В некоторых вариантах осуществления формулы I R^{1a} , R^{1b} , R^{4a} и R^{4b} в каждом случае представляют C_1 - C_{12} алкил.

В дополнительных вариантах осуществления формулы I по меньшей мере один из R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} представляет H, или R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} в каждом случае представляют H.

В некоторых вариантах осуществления формулы I R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь. В других вариантах осуществления вышеуказанный R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

Заместители в R5 и R6 формулы I в вышеуказанных вариантах осуществления конкретно не ограничены. В некоторых вариантах осуществления один или оба R5 или R6 представляют метил. В некоторых других вариантах осуществления один или оба R5 или R6 представляют циклоалкил, например циклогексил. В этих вариантах осуществления циклоалкил может быть замещенным или не замещенным. В некоторых других вариантах осуществления циклоалкил замещен на C_1 - C_{12} алкил, например трет-бутил.

Заместители в R7 в вышеуказанных вариантах осуществления конкретно не ограничены формулы I. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R7 представляет H. В некоторых других вариантах осуществления R7 в каждом случае представляет H. В некоторых других вариантах осуществления R7 представляет C_1 - C_{12} алкил.

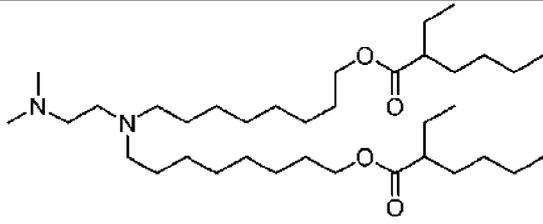
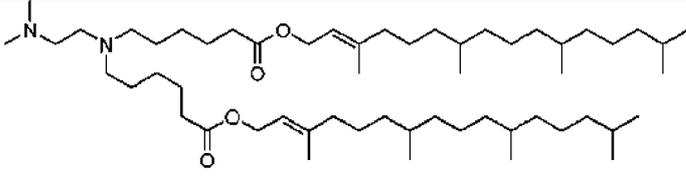
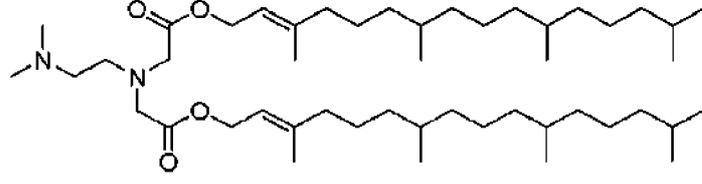
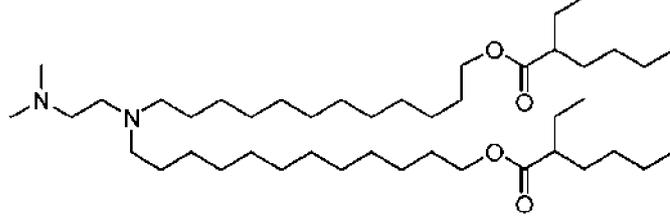
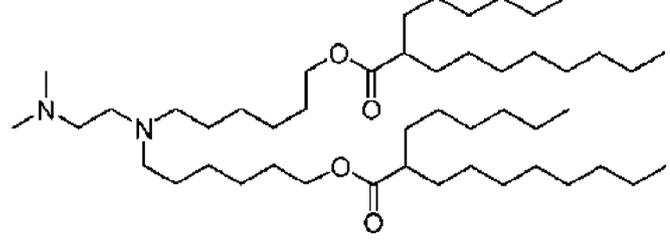
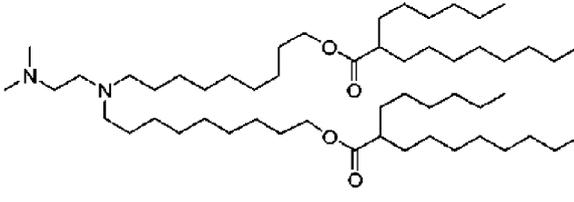
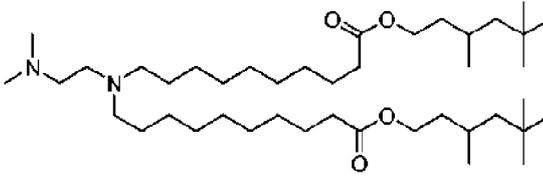
В некоторых других вышеуказанных вариантах осуществления формулы I один из R^8 или R^9 представляет метил. В других вариантах осуществления R^8 и R^9 представляют метил.

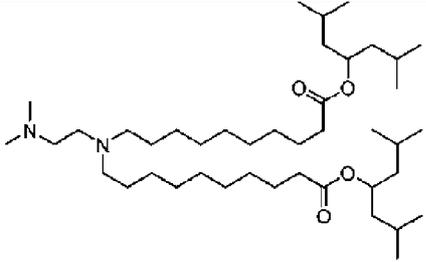
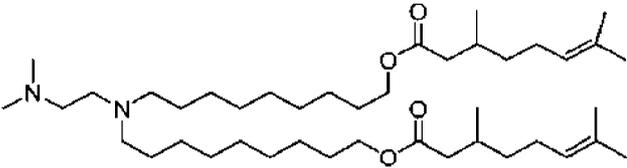
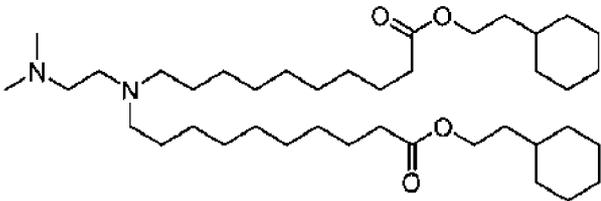
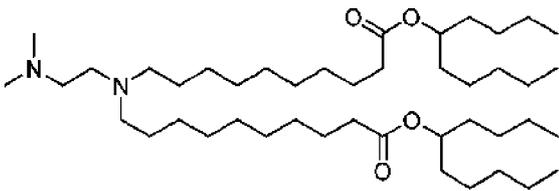
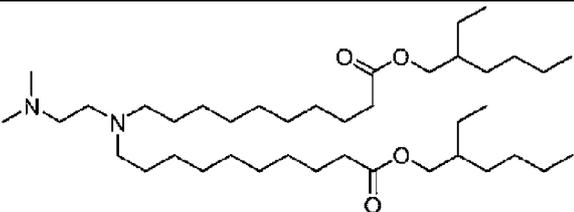
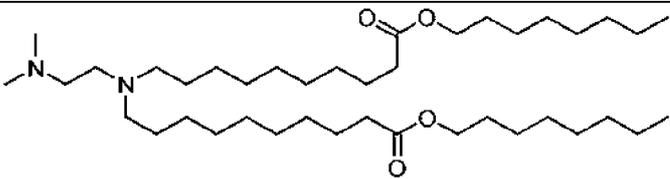
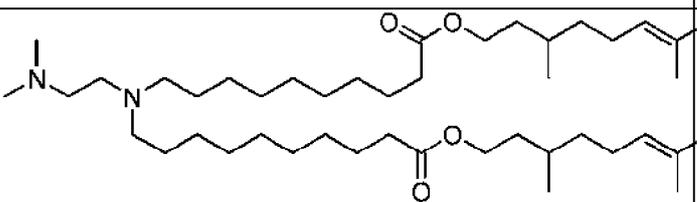
В некоторых различных вариантах осуществления формулы I R^8 и R^9 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5, 6 или 7-членное гетероциклическое кольцо. В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления R^8 и R^9 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5-членное гетероциклическое кольцо, например пирролидинильное кольцо.

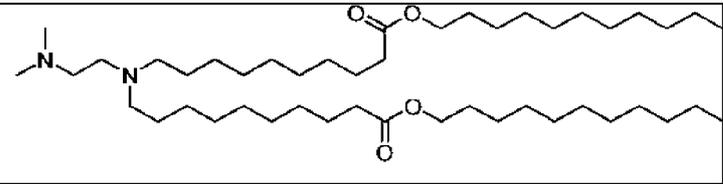
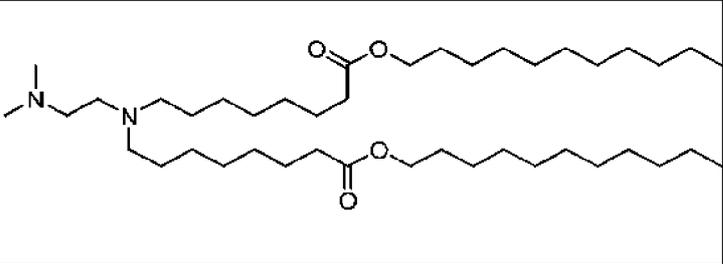
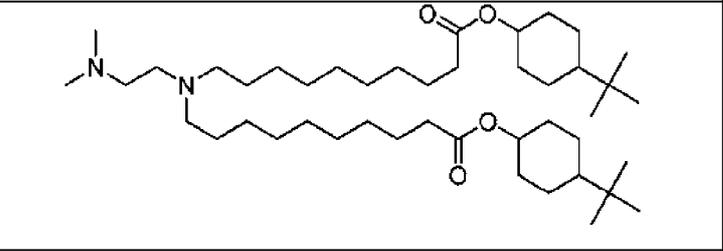
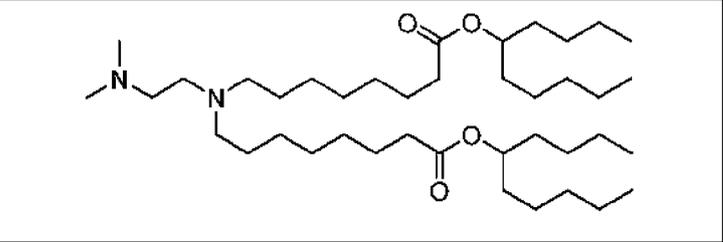
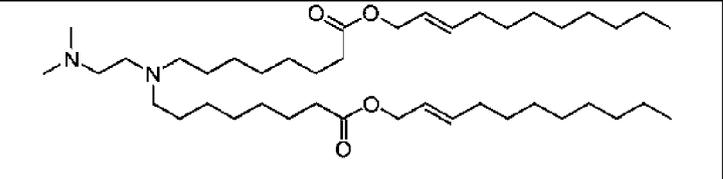
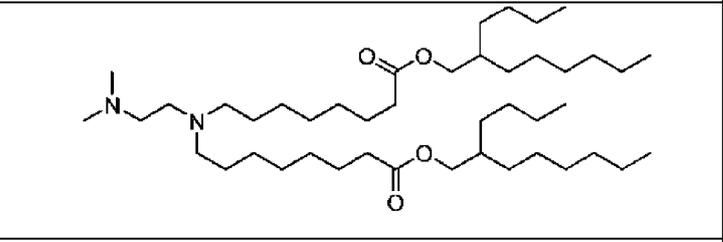
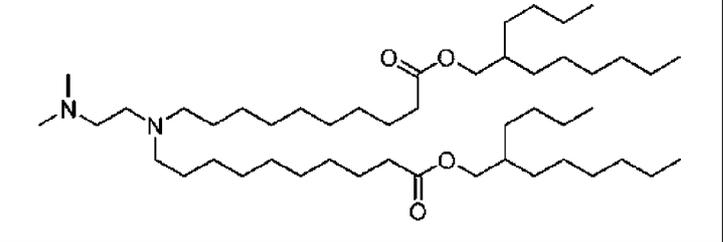
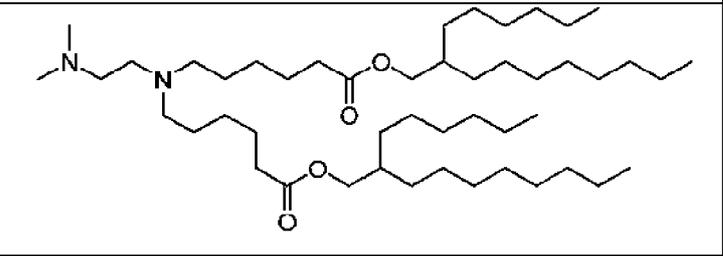
В некоторых версиях варианта осуществления 3 первый и второй катионные липиды каждый независимо выбирают из липида формулы I.

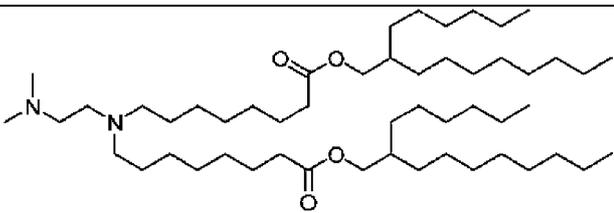
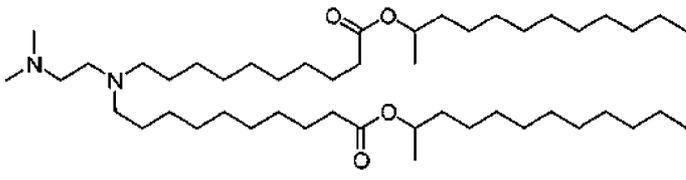
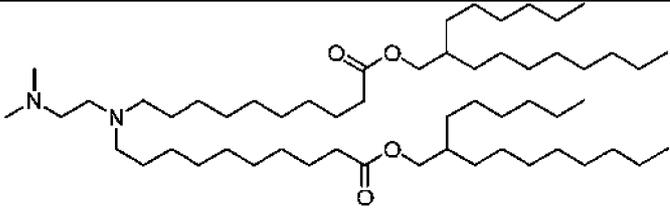
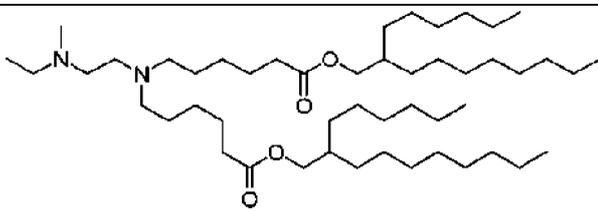
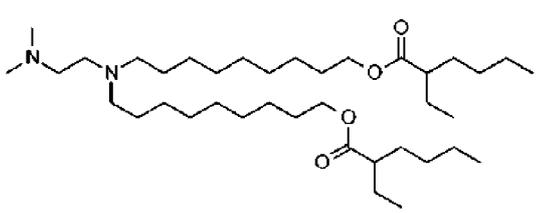
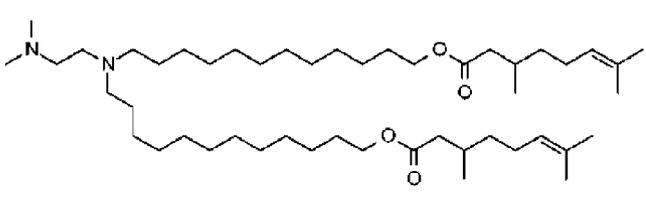
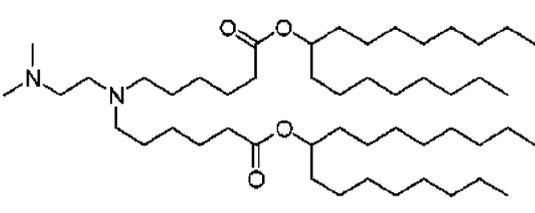
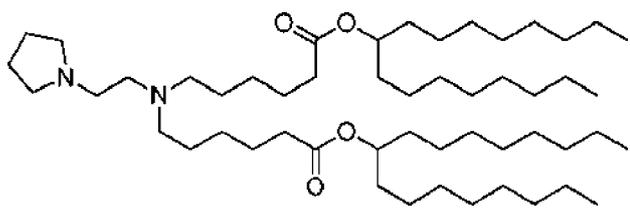
В разных других вариантах осуществления липид формулы I имеет одну из структур, приведенных в таблице 1 ниже.

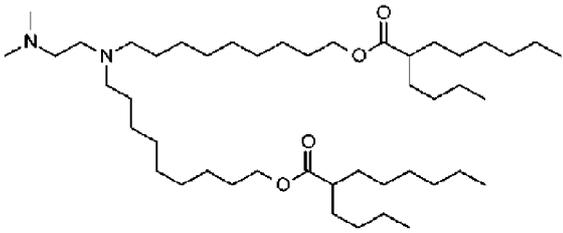
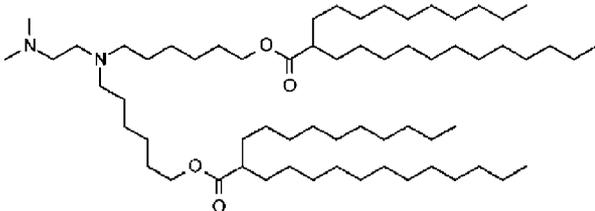
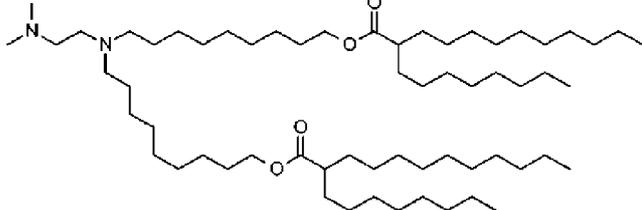
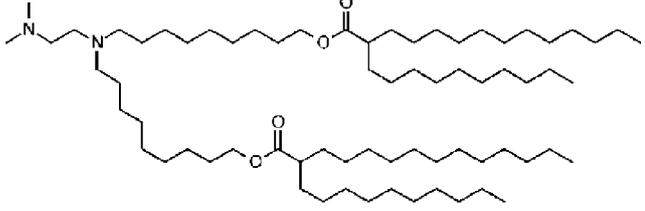
Таблица 1: Типовые липиды формулы I

№	Структура	pKa
I-1		-
I-2		5.64
I-3		7.15
I-4		6.43
I-5		6.28
I-6		6.12
I-7		-

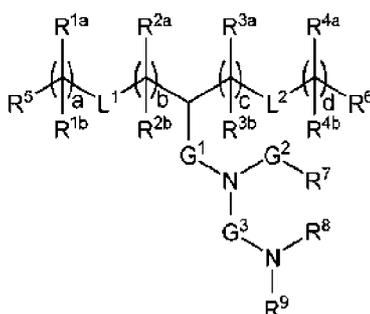
I-8		-
I-9		-
I-10		-
I-11		6.36
I-12		-
I-13		6.51
I-14		-

-15		6.30
I-16		6.63
I-17		-
I-18		-
I-19		6.72
I-20		6.44
I-21		6.28
I-22		6.53

I-23		6.24
I-24		6.28
I-25		6.20
I-33		6.27
I-34		-
I-35		6.21
I-36		-
I-37		-

I-38		6.24
I-39		5.82
I-40		6.38
I-41		5.91

В некоторых вариантах осуществления катионный липид вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 имеет структуру формулы II:



II

или ее фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

один из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ или $-NR^aC(=O)O-$, а другой из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ или

$-\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ или прямую связь;

G1 представляет C1-C2 алкилен, $-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{SC}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})-$ или прямую связь;

G2 представляет $-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^a-$ или прямую связь;

G3 представляет C1-C6 алкилен;

Ra представляет H или C₁-C₁₂ алкил;

R^{1a} и R^{1b} в каждом случае независимо представляют либо: (a) H или C₁-C₁₂ алкил; либо (b) R^{1a} представляет H или C₁-C₁₂ алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{2a} и R^{2b} в каждом случае независимо представляют либо: (a) H или C₁-C₁₂ алкил; либо (b) R^{2a} представляет H или C₁-C₁₂ алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{3a} и R^{3b} в каждом случае независимо представляют либо (a): H или C₁-C₁₂ алкил; либо (b) R^{3a} представляет H или C₁-C₁₂ алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют либо: (a) H или C₁-C₁₂ алкил; либо (b) R^{4a} представляет H или C₁-C₁₂ алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R5 и R6 каждый независимо представляет H или метил;

R7 представляет C4-C₂₀ алкил;

R⁸ и R⁹ каждый независимо представляет C₁-C₁₂ алкил; или R⁸ и R⁹, вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5, 6 или 7-членное гетероциклическое кольцо;

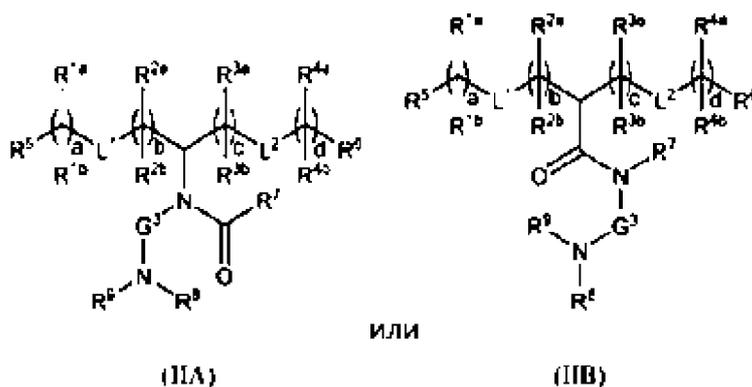
a, b, c и d каждый независимо составляет целое число от 1 до 24; и

x составляет 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) L¹ и L² каждый независимо представляет $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ или прямую связь. В других вариантах осуществления G1 и G2 каждый независимо представляет $-(\text{C}=\text{O})-$ или прямую связь. В некоторых различных вариантах осуществления L¹ и L² каждый независимо представляет $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ или прямую связь; и G1 и G2 каждый независимо представляет $-(\text{C}=\text{O})-$ или прямую связь.

В некоторых различных вариантах осуществления формулы (II) L¹ и L² каждый независимо представляет $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})\text{x}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$, $-\text{SC}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^a-$, $-\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^a-$, $-\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{NR}^a-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^a-$, $-\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})\text{xNR}^a-$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})\text{x}-$ или $-\text{S}(\text{O})\text{xNR}^a-$.

В других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (II) липидное соединение имеет одну из следующих формул (IIA) или (IIB):



В некоторых вариантах осуществления формулы (II) липидное соединение имеет формулу (IIA). В других вариантах осуществления липидное соединение имеет формулу (IIB).

В любых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (II) один из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет $-O(C=O)-$.

В некоторых различных вариантах осуществления формулы (II) один из L^1 или L^2 представляет $-(C=O)O-$. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет $-(C=O)O-$.

В различных вариантах осуществления формулы (II) один из L^1 или L^2 представляет прямую связь. В рамках настоящего изобретения «прямая связь» означает, что группа (например L^1 или L^2) отсутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет прямую связь.

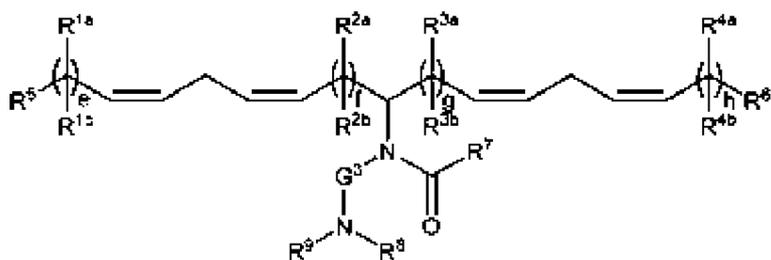
В других различных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере для одного случая из R^{1a} и R^{1b} , R^{1a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

В других различных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере для одного случая из R^{4a} и R^{4b} , R^{4a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

В других вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере для одного случая из R^{2a} и R^{2b} , R^{2a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

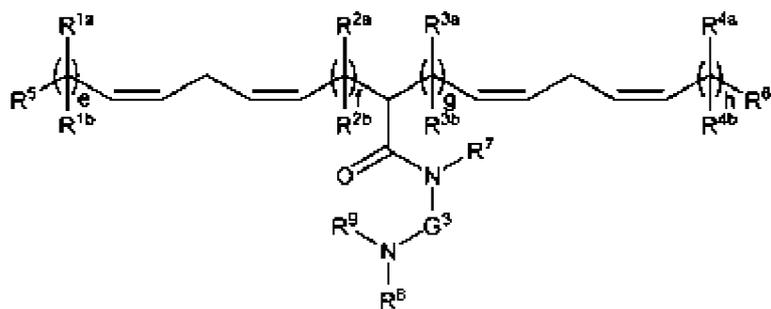
В других различных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере для одного случая из R^{3a} и R^{3b} , R^{3a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

В других различных вариантах осуществления формулы (II) липидное соединение имеет одну из следующих формул (IIC) или (IID):



ИЛИ

(IIC)



(IID)

где e, f, g и h каждый независимо составляет целое число от 1 до 12.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) липидное соединение имеет формулу (IIC). В других вариантах осуществления липидное соединение имеет формулу (IID).

В различных вариантах осуществления формул (IIC) или (IID), e, f, g и h каждый независимо составляет целое число от 4 до 10.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) a, b, c и d каждый независимо составляет целое число от 2 до 12 или целое число от 4 до 12. В других вариантах осуществления a, b, c и d каждый независимо составляет целое число от 8 до 12 или от 5 до 9. В некоторых определенных вариантах осуществления a составляет 0. В некоторых вариантах осуществления a составляет 1. В других вариантах осуществления a составляет 2. В других вариантах осуществления a составляет 3. В других вариантах осуществления a составляет 4. В некоторых вариантах осуществления a составляет 5. В других вариантах осуществления a составляет 6. В других вариантах осуществления a составляет 7. В других вариантах осуществления a составляет 8. В некоторых вариантах осуществления a составляет 9. В других вариантах осуществления a составляет 10. В других вариантах осуществления a составляет 11. В других вариантах осуществления a составляет 12. В некоторых вариантах осуществления a составляет 13. В других вариантах осуществления a составляет 14. В других вариантах осуществления a составляет 15. В других вариантах осуществления a составляет 16.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) b составляет 1. В других

В других вариантах осуществления f составляет 4. В некоторых вариантах осуществления f составляет 5. В других вариантах осуществления f составляет 6. В других вариантах осуществления f составляет 7. В других вариантах осуществления f составляет 8. В некоторых вариантах осуществления f составляет 9. В других вариантах осуществления f составляет 10. В других вариантах осуществления f составляет 11. В других вариантах осуществления f составляет 12.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) g составляет 1. В других вариантах осуществления g составляет 2. В других вариантах осуществления g составляет 3. В других вариантах осуществления g составляет 4. В некоторых вариантах осуществления g составляет 5. В других вариантах осуществления g составляет 6. В других вариантах осуществления g составляет 7. В других вариантах осуществления g составляет 8. В некоторых вариантах осуществления g составляет 9. В других вариантах осуществления g составляет 10. В других вариантах осуществления g составляет 11. В других вариантах осуществления g составляет 12.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) h составляет 1. В других вариантах осуществления e составляет 2. В других вариантах осуществления h составляет 3. В других вариантах осуществления h составляет 4. В некоторых вариантах осуществления e составляет 5. В других вариантах осуществления h составляет 6. В других вариантах осуществления h составляет 7. В других вариантах осуществления h составляет 8. В некоторых вариантах осуществления h составляет 9. В других вариантах осуществления h составляет 10. В других вариантах осуществления h составляет 11. В других вариантах осуществления h составляет 12.

В некоторых других вариантах осуществления формулы (II) a и d одинаковые. В некоторых других вариантах осуществления b и c одинаковые. В некоторых других конкретных вариантах осуществления a и d одинаковые, и b и c одинаковые.

Сумма a и b и сумма c и d формулы (II) являются факторами, которые можно варьировать для получения липида, обладающего нужными свойствами. В одном варианте осуществления a и b выбирают так, чтобы их сумма составляла целое число в диапазоне от 14 до 24. В других вариантах осуществления c и d выбирают так, чтобы их сумма составляла целое число в диапазоне от 14 до 24. В дополнительном варианте осуществления сумма a и b и сумма c и d одинаковые. Например, в некоторых вариантах осуществления сумма a и b и сумма c и d обе составляют одинаковое целое число, которое может колебаться от 14 до 24. В других вариантах осуществления a , b , c и d выбирают так, чтобы сумма a и b и сумма c и d составляла 12 или более.

Заместители в R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} формулы (II) конкретно не ограничены. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет H. В некоторых вариантах осуществления R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} в каждом случае представляют H. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_{12} алкил. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_8 алкил. В некоторых других вариантах

осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_6 алкил. В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил представляет метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, трет-бутил, *n*-гексил или *n*-октил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) R^{1a} , R^{1b} , R^{4a} и R^{4b} в каждом случае представляют C_1 - C_{12} алкил.

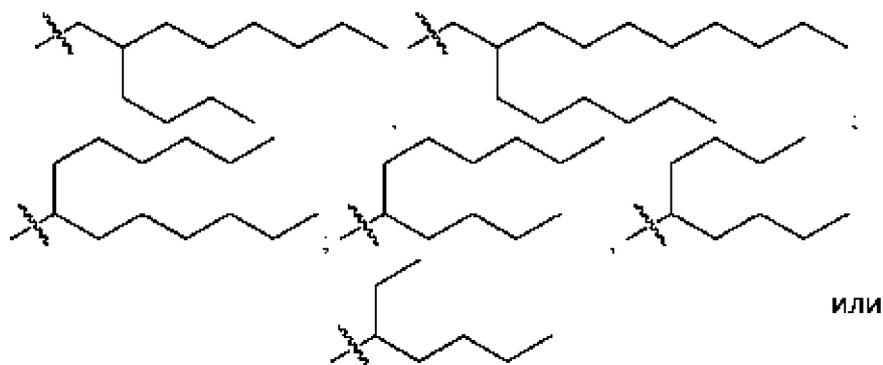
В дополнительных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере один из R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} представляет H или R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} в каждом случае представляют H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь. В других вариантах осуществления вышеуказанный R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

Заместители в R5 и R6 формулы (II) в вышеуказанных вариантах осуществления конкретно не ограничены. В некоторых вариантах осуществления один из R5 или R6 представляет метил. В других вариантах осуществления каждый из R5 или R6 представляет метил.

Заместители в R7 формулы (II) в вышеуказанных вариантах осуществления конкретно не ограничены. В некоторых вариантах осуществления R7 представляет C_6 - C_{16} алкил. В некоторых других вариантах осуществления R7 представляет C_6 - C_9 алкил. В некоторых этих вариантах осуществления R7 замещен $-(C=O)ORb$, $-O(C=O)Rb$, $-C(=O)Rb$, $-ORb$, $-S(O)_xRb$, $-S-SRb$, $-C(=O)SRb$, $-SC(=O)Rb$, $-NRaRb$, $-NRaC(=O)Rb$, $-C(=O)NRaRb$, $-NRaC(=O)NRaRb$, $-OC(=O)NRaRb$, $-NRaC(=O)ORb$, $-NRaS(O)_xNRaRb$, $-NRaS(O)_xRb$ or $-S(O)_xNRaRb$, где: R^a представляет H или C_1 - C_{12} алкил; Rb представляет C_1 - C_{15} алкил; а x составляет 0, 1 или 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R' замещен $-(C=O)ORb$ или $-O(C=O)Rb$.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (II) Rb представляет разветвленный C_1 - C_{16} алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления Rb имеет одну из следующих структур:



В некоторых других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (II) один из

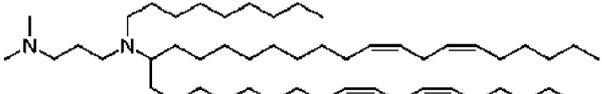
R^8 или R^9 представляет метил. В других вариантах осуществления и R^8 и R^9 представляют метил.

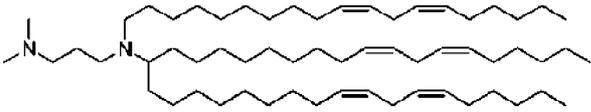
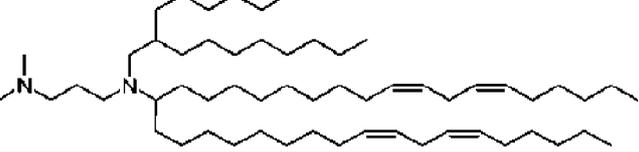
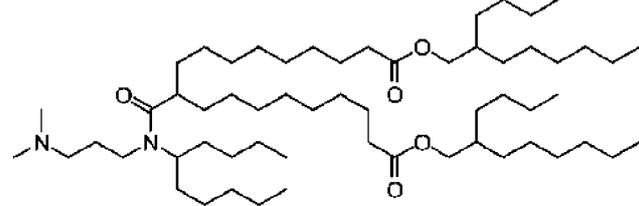
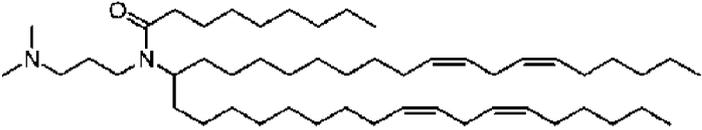
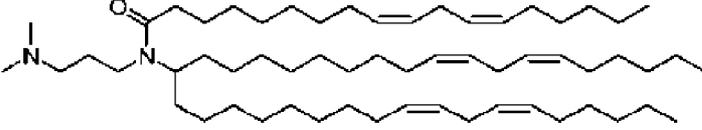
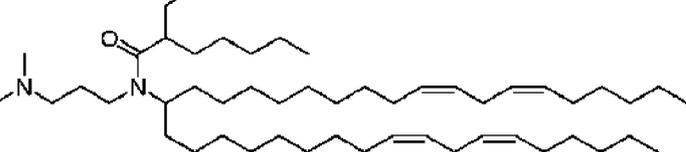
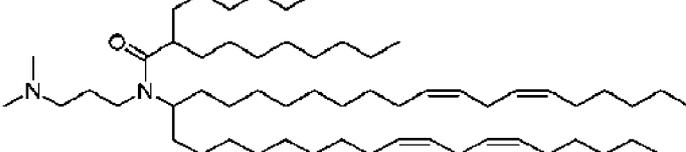
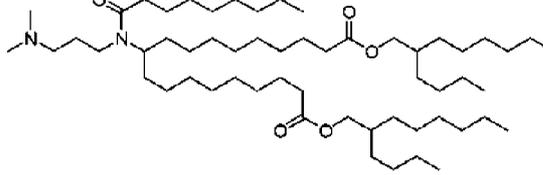
В некоторых различных вариантах осуществления формулы (II) R^8 и R^9 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5, 6 или 7-членное гетероциклическое кольцо. В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления R^8 и R^9 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5-членное гетероциклическое кольцо, например пирролидинильное кольцо. В некоторых различных вариантах осуществления вышеуказанные R^8 и R^9 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 6-членное гетероциклическое кольцо, например a piperazinyl кольцо.

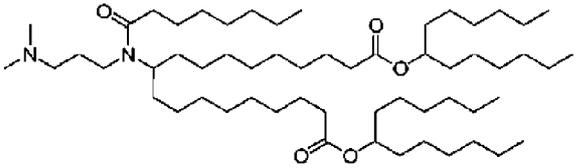
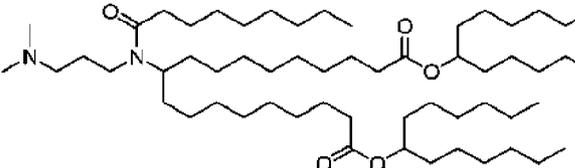
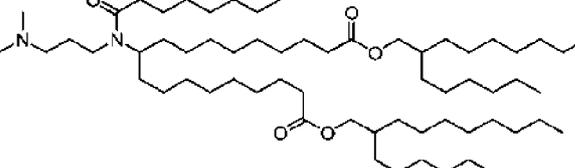
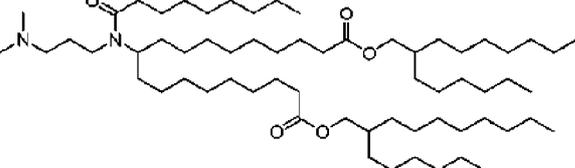
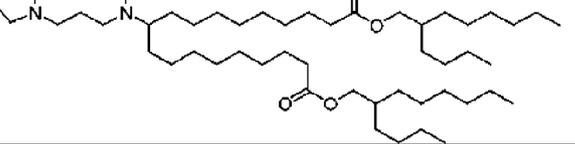
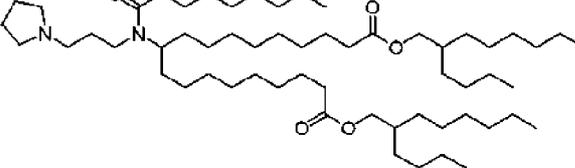
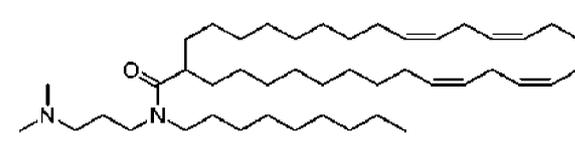
В некоторых версиях варианта осуществления 3, первый и второй катионные липиды каждый независимо выбирают из липида формулы II.

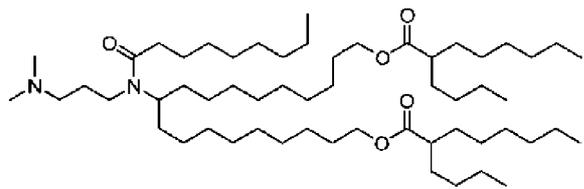
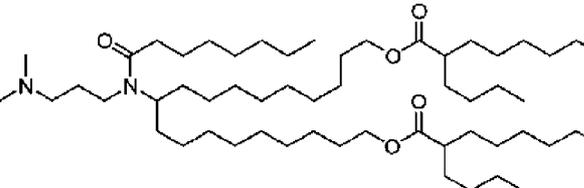
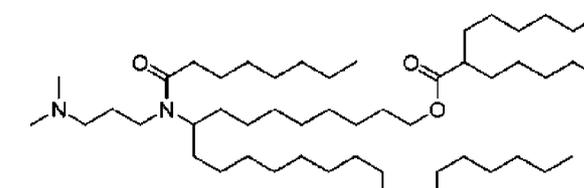
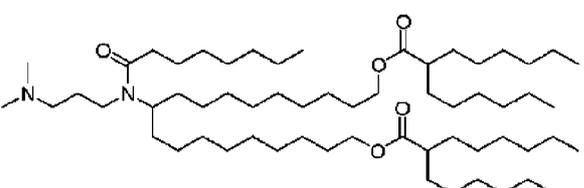
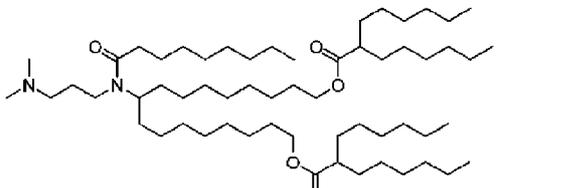
В других вышеуказанных вариантах осуществления липиды формулы (II) G3 представляет C2-C4 алкилен, например C3 алкилен. В разных других вариантах осуществления липидное соединение имеет одну из структур, приведенных в таблице 2 ниже

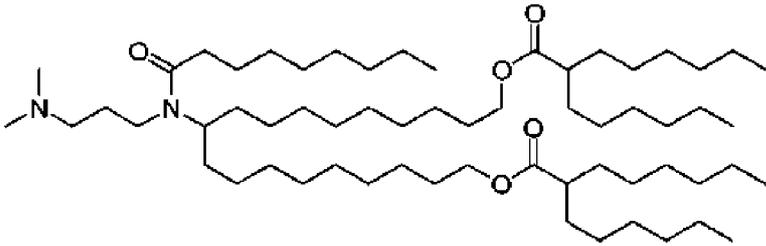
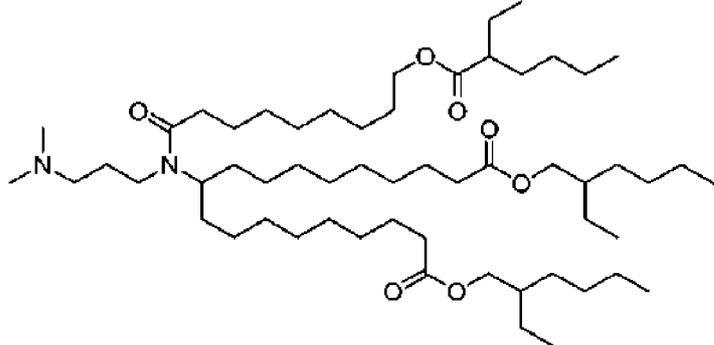
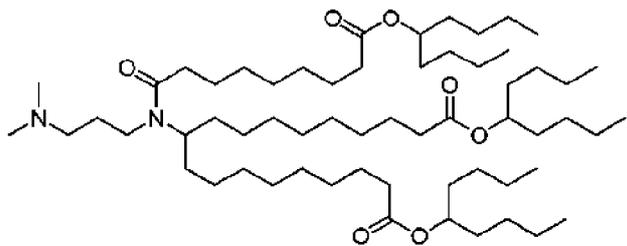
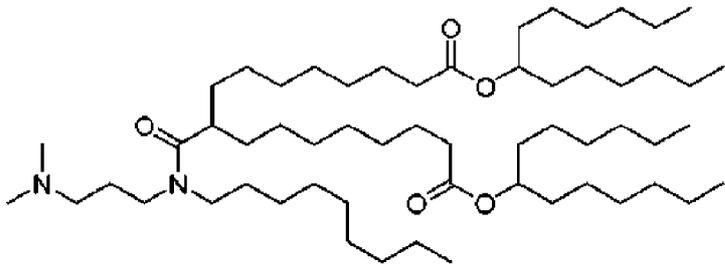
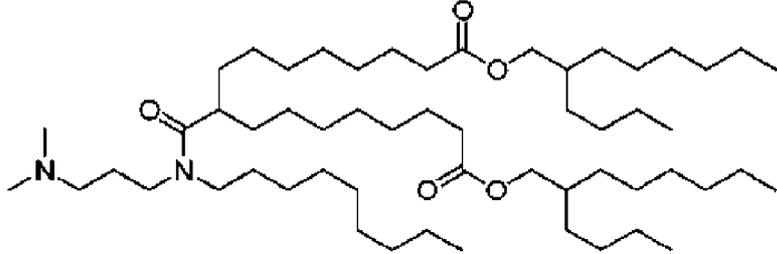
Таблица 2: Типовые липиды формулы (II)

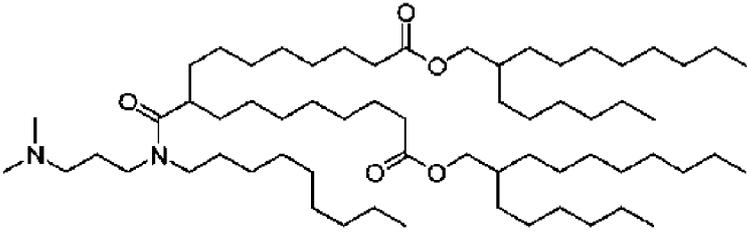
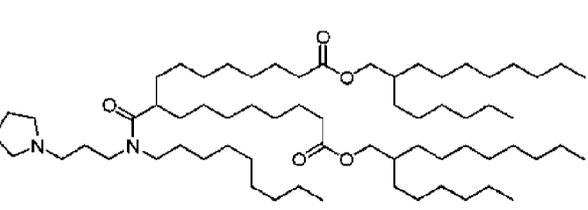
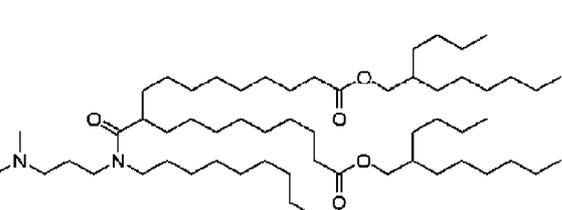
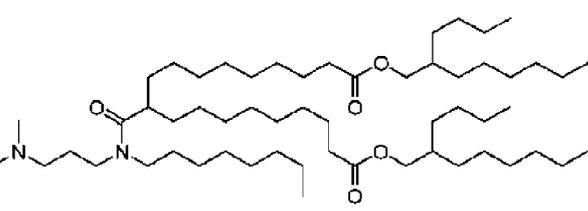
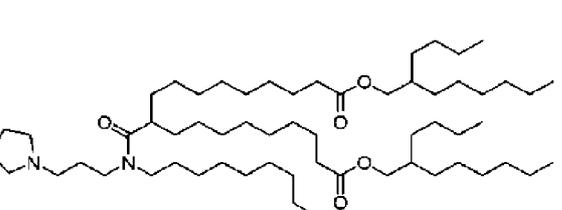
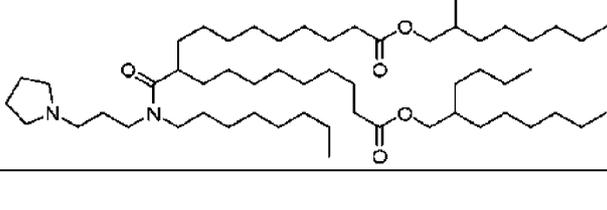
№	Структура	pKa
II-1		5.64

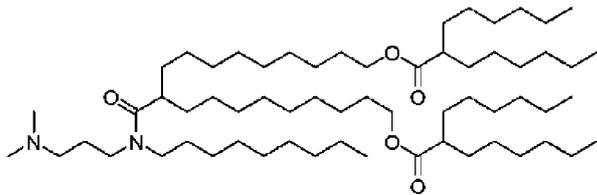
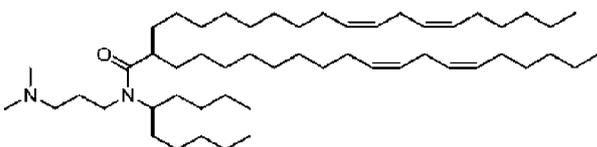
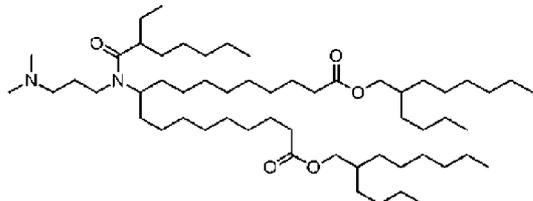
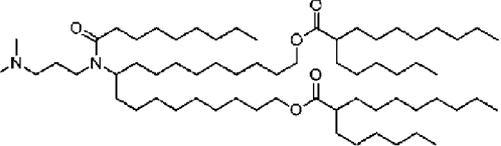
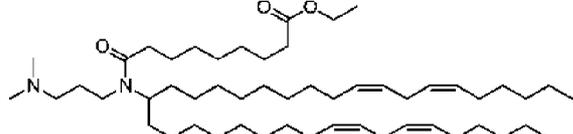
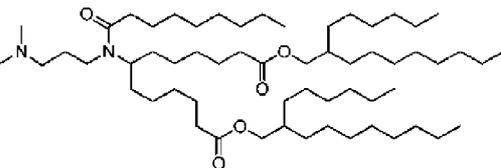
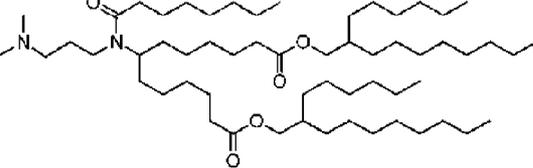
No.	Structure	pKa
II-2		-
II-3		-
II-4		-
II-5		6.27
II-6		6.14
II-7		5.93
II-8		5.35
II-9		6.27

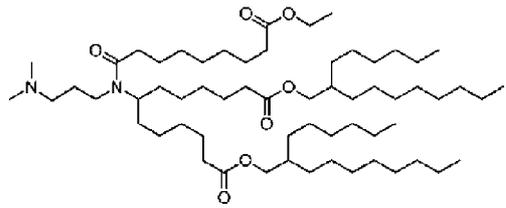
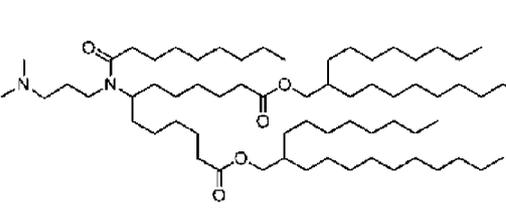
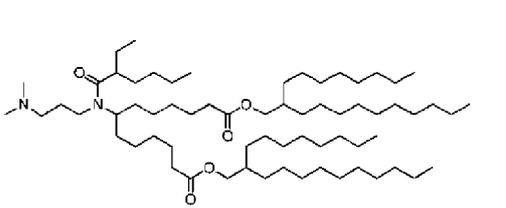
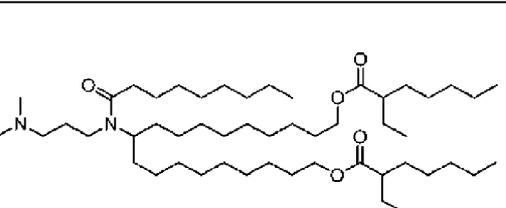
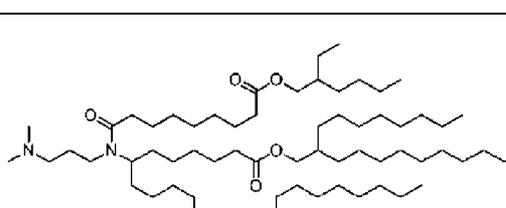
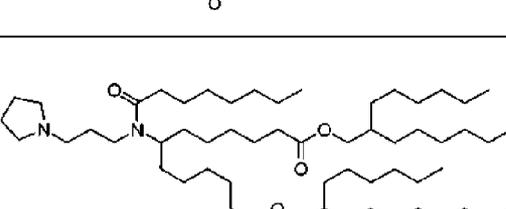
No.	Structure	pKa
II-10		6.16
II-11		6.13
II-12		6.21
II-13		6.22
II-14		6.33
II-15		6.32
II-16		6.37

No.	Structure	pKa
II-17		6.27
II-18		-
II-19		-
II-20		-
II-21		-

No.	Structure	pKa
II-22		-
II-23		-
II-24		6.14
II-25		-
II-26		-

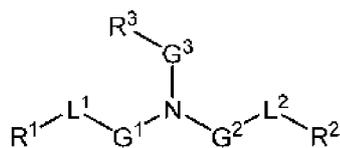
No.	Structure	pKa
II-27		-
II-28		-
II-29		-
II-30		-
II-31		-
II-32		-

No.	Structure	pKa
II-33		-
II-34		-
II-35		5.97
II-36		6.13
II-37		5.61
II-38		6.45
II-39		6.45

No.	Structure	pKa
II-40		6.57
II-41		-
II-42		-
II-43		-
II-44		-
II-45		-

No.	Structure	pKa
II-46		-

В некоторых других вариантах осуществления катионный липид вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 имеет структуру формулы III:



III

или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или стереоизомер, где:

один из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ или $-NR^aC(=O)O-$, а другой из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ или $-NR^aC(=O)O-$ или прямую связь;

G^1 и G^2 каждый независимо представляет незамещенный C_1-C_{12} алкилен или C_1-C_{12} алкенилен;

G^3 представляет C_1-C_{24} алкилен, C_1-C_{24} алкенилен, C_3-C_8 циклоалкилен, C_3-C_8 циклоалкенилен;

R^a представляет H или C_1-C_{12} алкил;

R^1 и R^2 каждый независимо представляет C_6-C_{24} алкил или C_6-C_{24} алкенил;

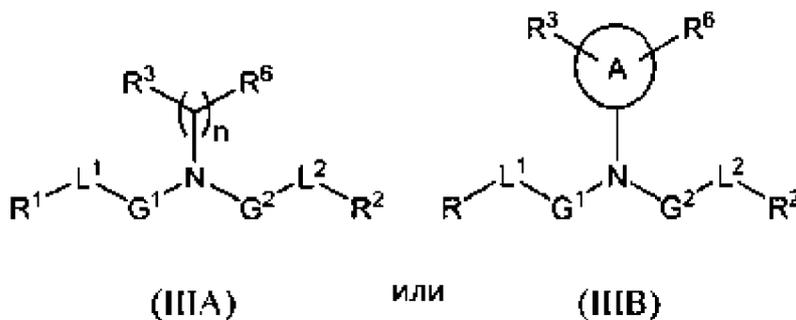
R^3 представляет H, OR₅, CN, $-C(=O)OR_4$, $-OC(=O)R_4$ или $-NR^5C(=O)R_4$;

R_4 представляет C_1-C_{12} алкил;

R^5 представляет H или C_1-C_6 алкил; а

x составляет 0, 1 или 2.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) липид имеет одну из следующих формул (IIIA) или (IIIB):



где:

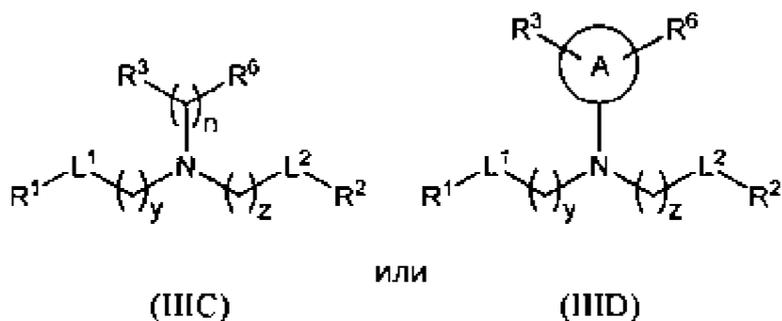
A представляет 3-8-членное циклоалкильное или циклоалкиленовое кольцо;

R⁶ в каждом случае независимо представляет H, OH или C1-C₂₄ алкил;

n составляет целое число в диапазоне от 1 до 15.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) липид имеет формулу (IIIА), а в других вариантах осуществления липид имеет формулу (IIIВ).

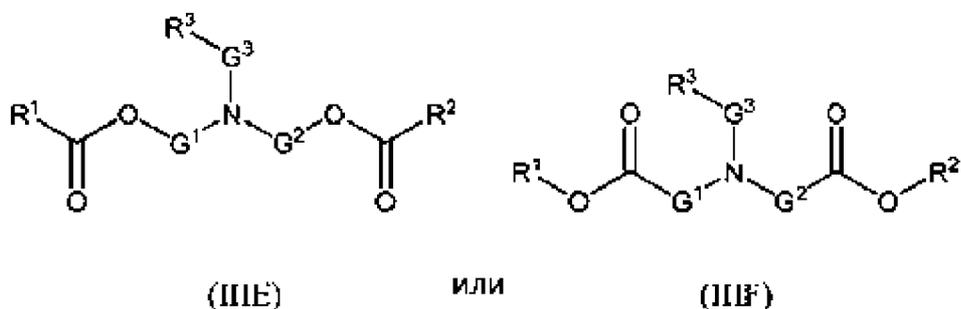
В других вариантах осуществления формулы (III) липид имеет одну из следующих формул (IIIС) или (IIIД):



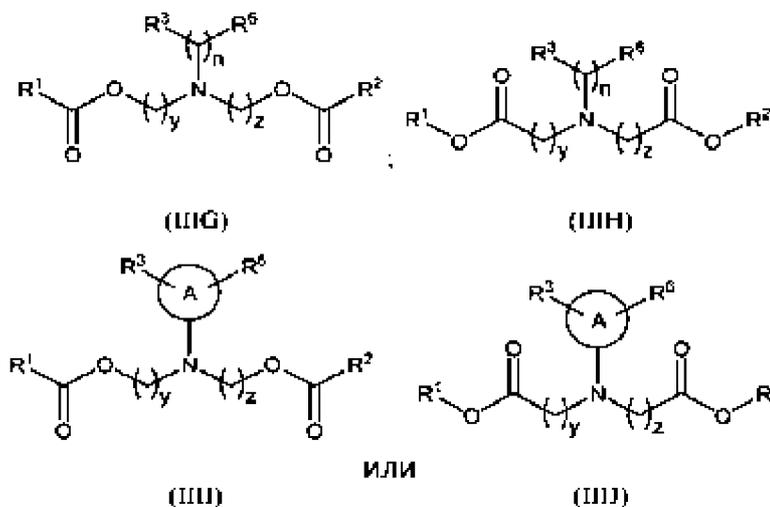
где y и z каждый независимо составляет целое число в диапазоне от 1 до 12.

В любых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) один из L¹ или L² представляет -O(C=O)-. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L¹ и L² представляет -O(C=O)-. В некоторых различных вышеуказанных вариантах осуществления L¹ и L² каждый независимо представляет -(C=O)O- или -O(C=O)-. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L¹ и L² представляет -(C=O)O-

В некоторых различных вариантах осуществления формулы (III) липид имеет одну из следующих формул (IIIЕ) или (IIIФ):



В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) липид имеет одну из следующих формул (III G), (III H), (III I), или (III J):



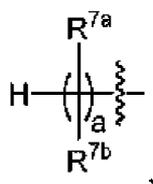
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) n составляет целое число в диапазоне 2 до 12, например, от 2 до 8 или от 2 до 4. Например, в некоторых вариантах осуществления n составляет 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3. В некоторых вариантах осуществления n составляет 4. В некоторых вариантах осуществления n составляет 5. В некоторых вариантах осуществления n составляет 6.

В некоторых других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) y и z каждый независимо составляет целое число в диапазоне от 2 до 10. Например, в некоторых вариантах осуществления y и z каждый независимо составляет целое число в диапазоне от 4 до 9 или от 4 до 6.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) R^6 представляет H. В других вышеуказанных вариантах осуществления R^6 представляет C_1-C_{24} алкил. В других вариантах осуществления R^6 представляет OH.

В некоторых вариантах осуществления формулы (III) G^3 не замещен. В других вариантах осуществления G^3 замещен. В разных других вариантах осуществления G^3 представляет линейный C_1-C_{24} алкилен или линейный C_1-C_{24} алкенилен.

В некоторых других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) R_1 или R_2 , или оба, представляет C_6-C_{24} алкенил. Например, в некоторых вариантах осуществления R_1 и R_2 каждый независимо имеет следующую структуру:



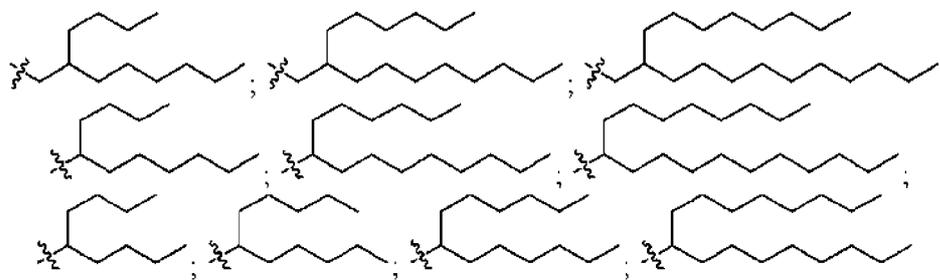
где:

R^{7a} и R^{7b} в каждом случае независимо представляют H или C_1-C_{12} алкил; а составляет целое число от 2 до 12,

где R^{7a} , R^{7b} и а каждый выбирают таким образом, что R1 и R2 каждый независимо содержит от 6 до 20 атомов углерода. Например, в некоторых вариантах осуществления а составляет целое число в диапазоне от 5 до 9 или от 8 до 12.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) по меньшей мере в одном случае R^{7a} представляет H. Например, в некоторых вариантах осуществления R^{7a} в каждом случае представляет H. В других различных вышеуказанных вариантах осуществления по меньшей мере в одном случае R^{7b} представляет C_1-C_8 алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления C_1-C_8 алкил представляет метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, трет-бутил, n-гексил или n-октил.

В различных вариантах осуществления формулы (III) R1 или R2, или оба, имеет одну из следующих структур:



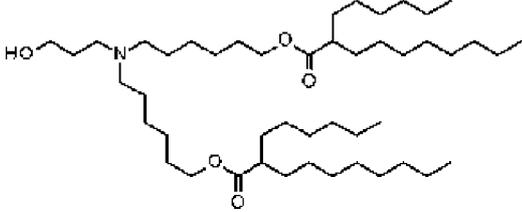
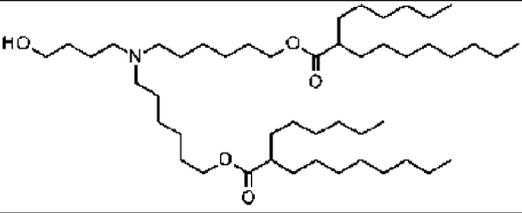
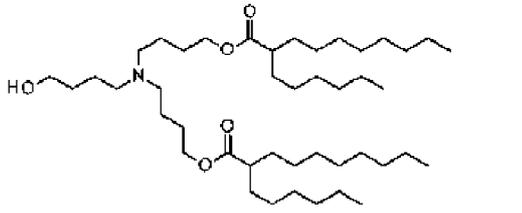
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) R3 представляет OH, CN, $-C(=O)OR_4$, $-OC(=O)R_4$ или $-NHC(=O)R_4$. В некоторых вариантах осуществления R4 представляет метил или этил.

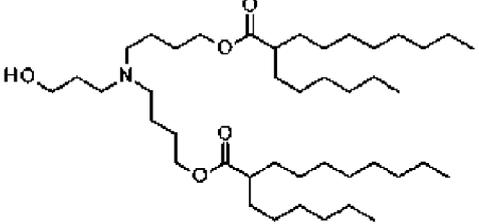
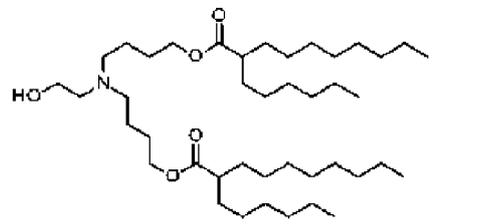
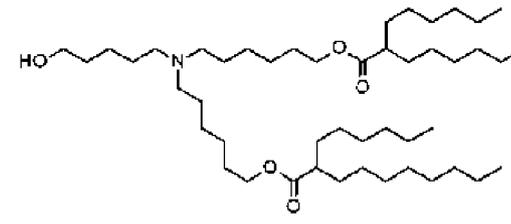
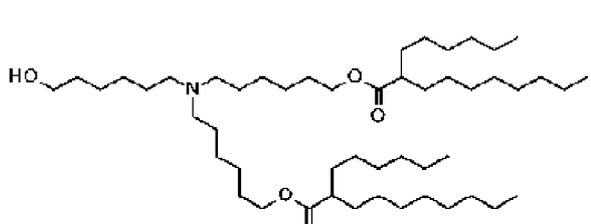
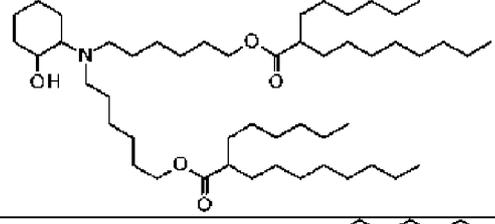
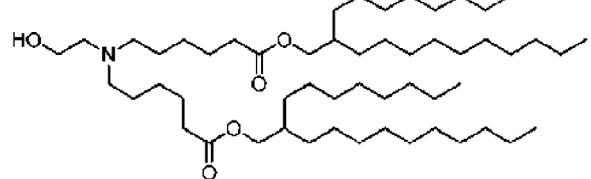
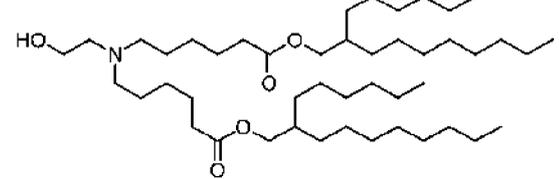
В некоторых конкретных версиях варианта осуществления 3 первый и второй катионные липиды каждый независимо выбирают из липида формулы III.

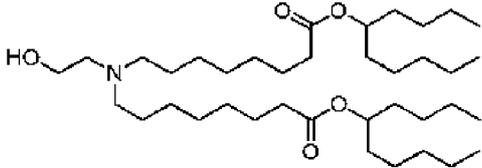
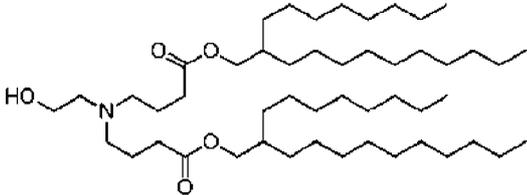
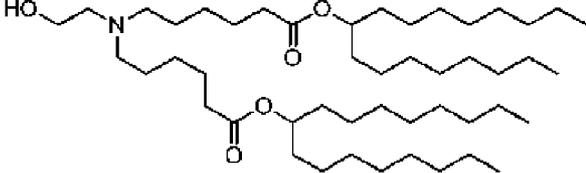
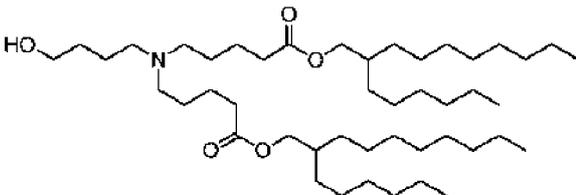
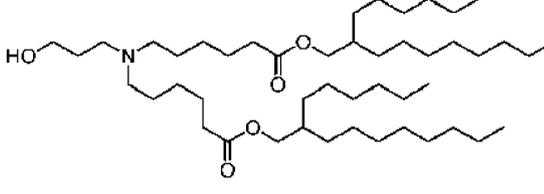
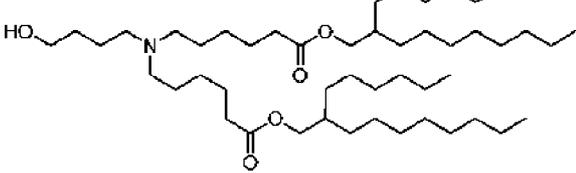
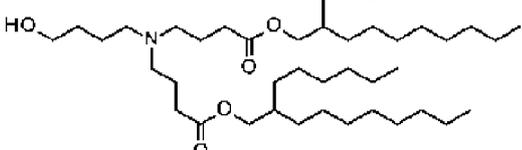
В разных других вариантах осуществления а катионный липид любого из раскрытых вариантов осуществления (например, катионный липид, первый катионный липид, второй катионный липид) формулы (III) имеет одну из структур, приведенных в таблице 3 ниже.

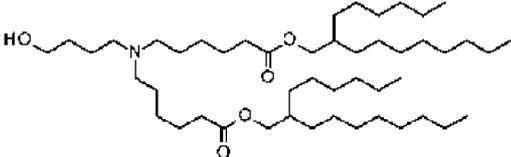
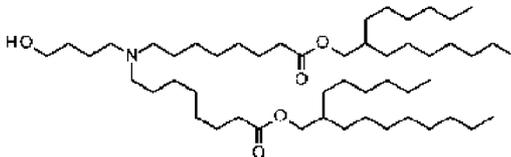
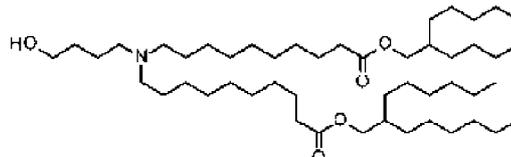
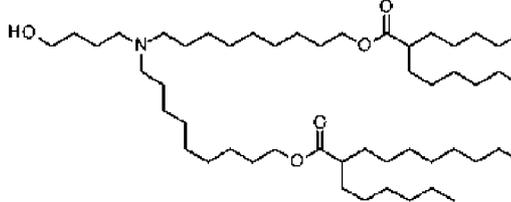
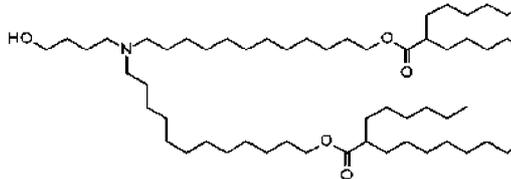
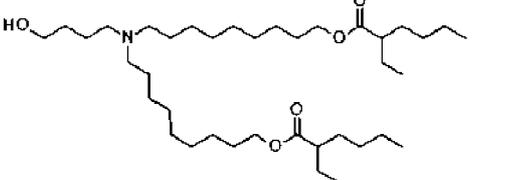
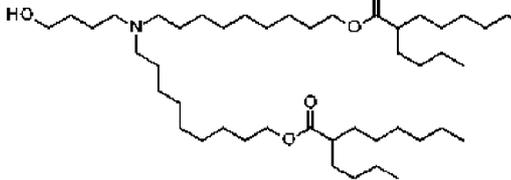
Таблица 3: Типовые Соединения формулы (III)

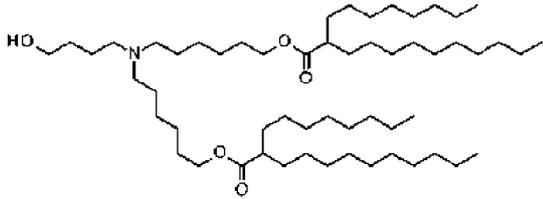
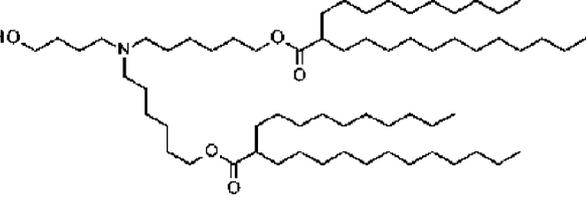
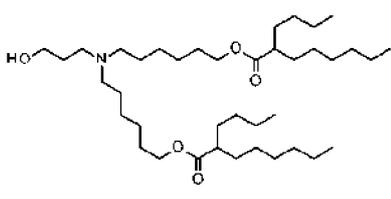
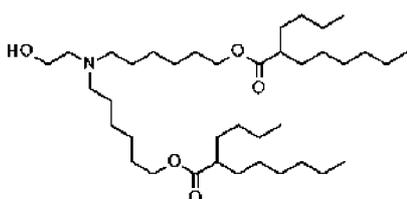
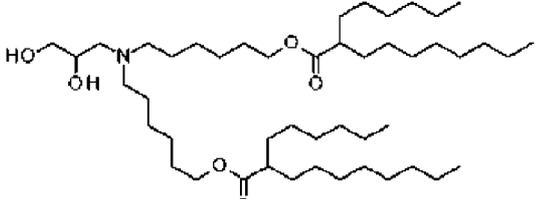
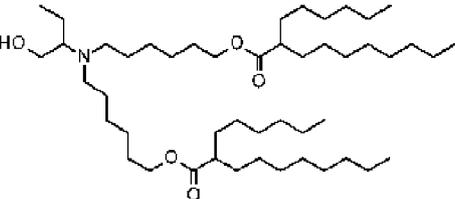
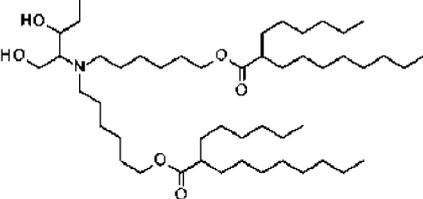
№	Структура	pKa
III-1		5.89

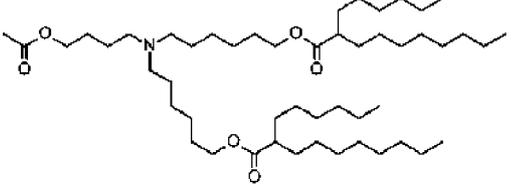
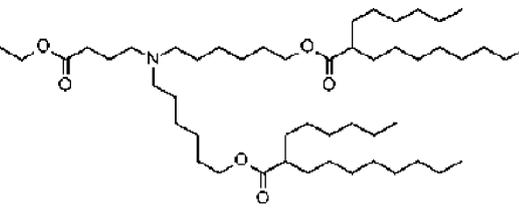
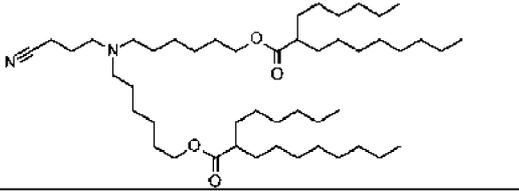
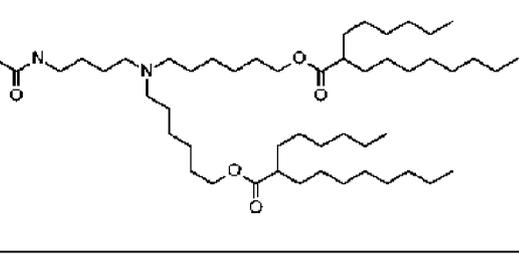
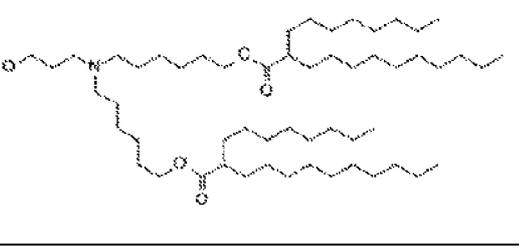
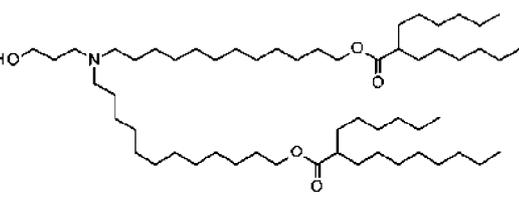
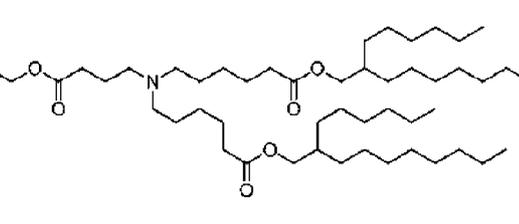
III-2		6.05
III-3		6.09
III-4		5.60

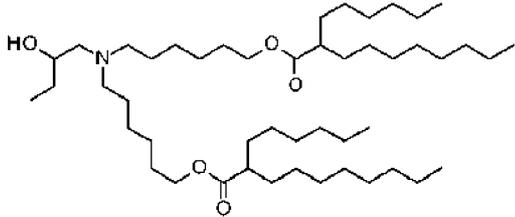
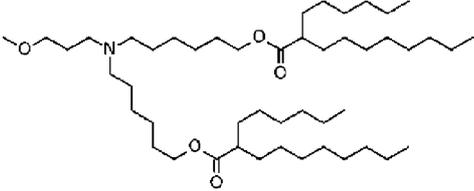
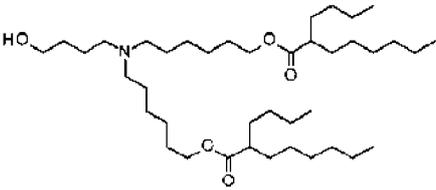
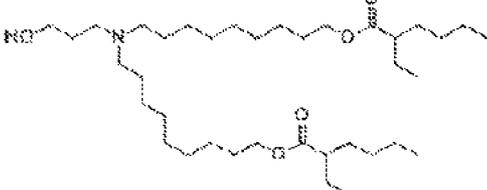
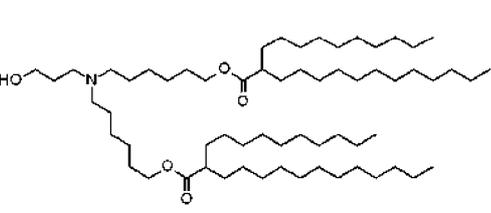
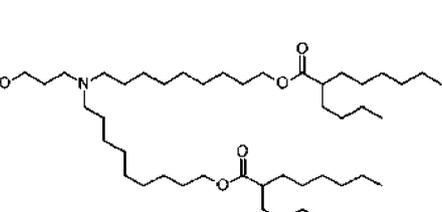
No.	Structure	pKa
III-5		5.59
III-6		5.42
III-7		6.11
III-8		5.84
III-9		-
III-10		-
III-11		-

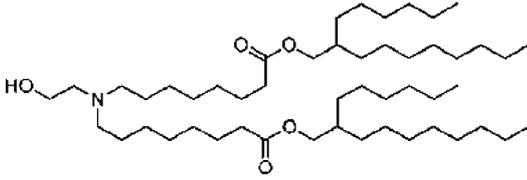
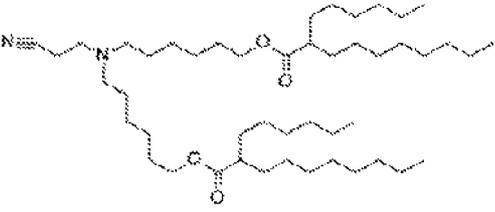
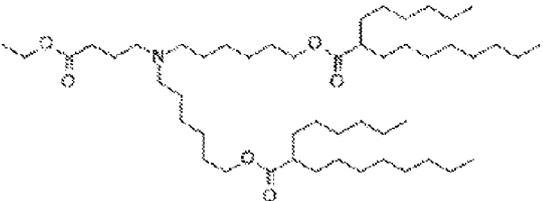
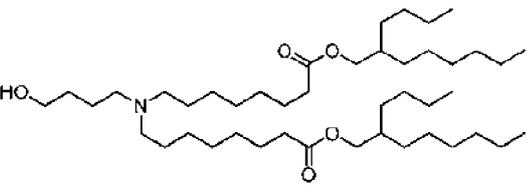
No.	Structure	pKa
III-12		-
III-13		-
III-14		-
III-15		6.14
III-16		6.31
III-17		6.28
III-18		-

No.	Structure	pKa
III-19		-
III-20		6.36
III-21		-
III-22		6.10
III-23		5.98
III-24		-
III-25		6.22

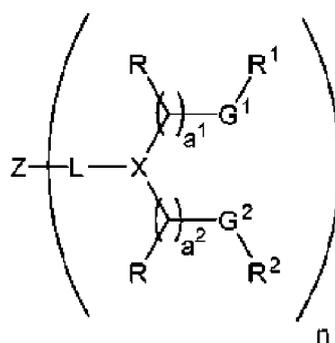
No.	Structure	pKa
III-26		5.84
III-27		5.77
III-28		-
III-29		-
III-30		6.09
III-31		-
III-32		-

No.	Structure	pKa
III-33		-
III-34		-
III-35		-
III-36		-
III-37		-
III-38		-
III-39		-

No.	Structure	pKa
III-40		-
III-41		-
III-42		-
III-43		-
III-44		-
III-45		-

No.	Structure	pKa
III-46		-
III-47		-
III-48		-
III-49		-

В одном варианте осуществления катионный липид по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 имеет структуру формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или стереоизомер, где:
 один из G1 или G2 в каждом случае представляет -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-,
 -S(O)r, -S-S-, -C(=O)S-, SC(=O)-, -N(Ra)C(=O)-, -C(=O)N(Ra)-, -N(Ra)C(=O)N(Ra)-, -
 OC(=O)N(Ra)- или -N(Ra)C(=O)O-, а другой из G1 или G2 в каждом случае представляет -

O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)_r, -S-S-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -N(Ra)C(=O)-, -C(=O)N(Ra)-, -N(Ra)C(=O)N(Ra)-, -OC(=O)N(Ra)- или -N(Ra)C(=O)O- или прямую связь;

L в каждом случае представляет ~O(C=O)-, где ~ представляет ковалентную связь с X;

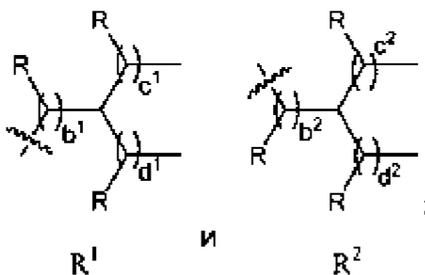
X представляет CRa;

Z представляет алкил, циклоалкил или одновалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу, когда n составляет 1; или Z представляет алкилен, циклоалкилен или многовалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу, когда n составляет более 1;

R^a в каждом случае независимо представляет H, C₁-C₁₂ алкил, C₁-C₁₂ гидроксилалкил, C₁-C₁₂ аминоалкил, C₁-C₁₂ алкиламинилалкил, C₁-C₁₂ алкоксиалкил, C₁-C₁₂ алкоксикарбонил, C₁-C₁₂ алкилкарбонилокси, C₁-C₁₂ алкилкарбонилоксиалкил или C₁-C₁₂ алкилкарбонил;

R в каждом случае независимо представляет либо: (a) H или C₁-C₁₂ алкил; либо (b) R вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R¹ и R² в каждом случае имеют следующую структуру, соответственно:



a₁ и a₂ в каждом случае независимо представляют целое число от 3 до 12;

b₁ и b₂ в каждом случае независимо представляют 0 или 1;

c₁ и c₂ в каждом случае независимо представляют целое число от 5 до 10;

d₁ и d₂ в каждом случае независимо представляют целое число от 5 до 10;

u в каждом случае независимо представляет целое число от 0 до 2; a

n составляет целое число от 1 до 6,

где каждый алкил, алкилен, гидроксилалкил, аминоалкил, алкиламинилалкил, алкоксиалкил, алкоксикарбонил, алкилкарбонилокси, алкилкарбонилоксиалкил и алкилкарбонил необязательно замещен одним или несколькими заместителями.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IV) G₁ и G₂ каждый независимо представляет -O(C=O)- или -(C=O)O-.

В других вариантах осуществления формулы (IV) X представляет CH.

В различных вариантах осуществления формулы (IV) сумма a₁+b₁+c₁ или сумма a₂+b₂+c₂ составляет целое число от 12 до 26.

В других вариантах осуществления формулы (IV) a_1 и a_2 независимо представляют целое число от 3 до 10. Например, в некоторых вариантах осуществления a_1 и a_2 независимо представляют целое число от 4 до 9.

В различных вариантах осуществления формулы (IV) b_1 и b_2 представляют 0. В различных вариантах осуществления b_1 и b_2 представляют 1.

В других вариантах осуществления формулы (IV) c_1 , c_2 , d_1 и d_2 независимо представляют целое число от 6 до 8.

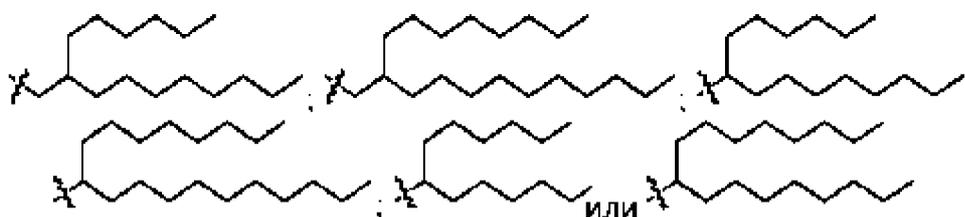
В других вариантах осуществления формулы (IV) c_1 и c_2 в каждом случае независимо представляют целое число от 6 до 10, и d_1 и d_2 в каждом случае независимо представляют целое число от 6 до 10.

В других вариантах осуществления формулы (IV) c_1 и c_2 в каждом случае независимо представляют целое число от 5 до 9, и d_1 и d_2 в каждом случае независимо представляют целое число от 5 до 9.

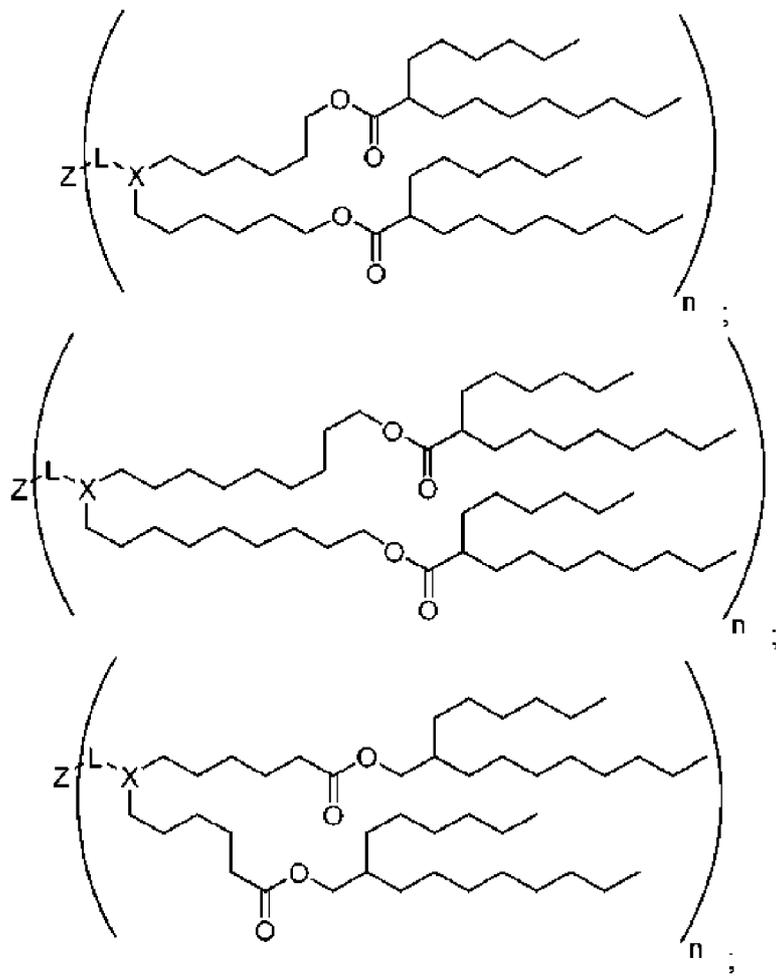
В других вариантах осуществления формулы (IV) Z представляет алкил, циклоалкил или одновалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу, когда n составляет 1. В других вариантах осуществления Z представляет алкил.

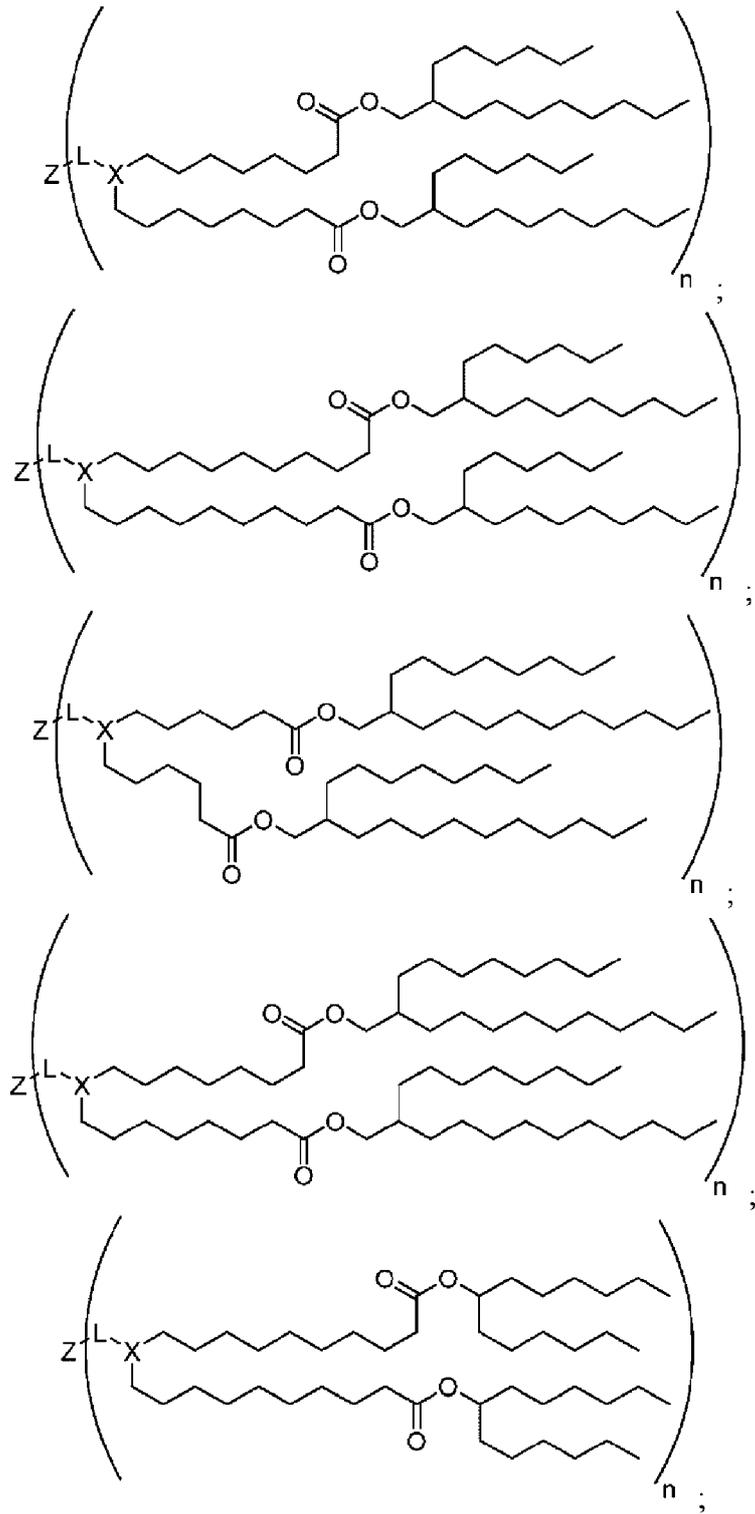
В различных вариантах осуществления вышеуказанной формулы (IV) R в каждом случае независимо представляет либо: (а) H или метил; либо (b) R вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь. В некоторых вариантах осуществления каждый R представляет H . В других вариантах осуществления по меньшей мере один R вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

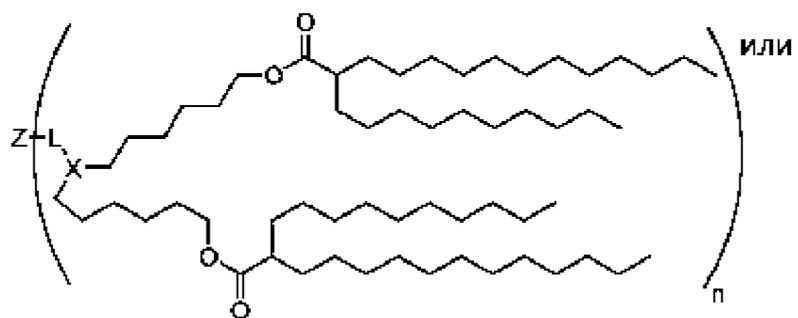
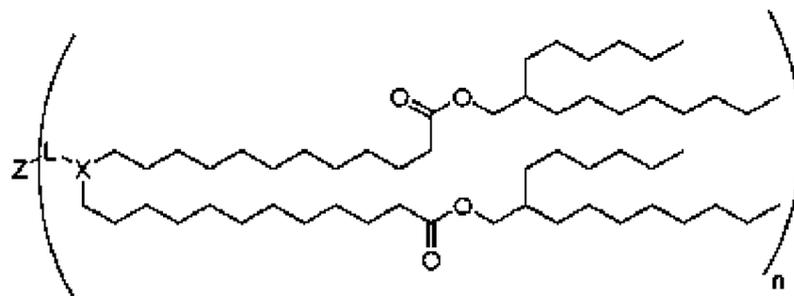
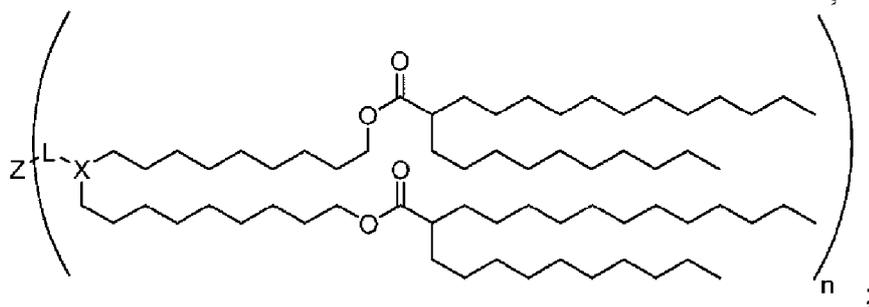
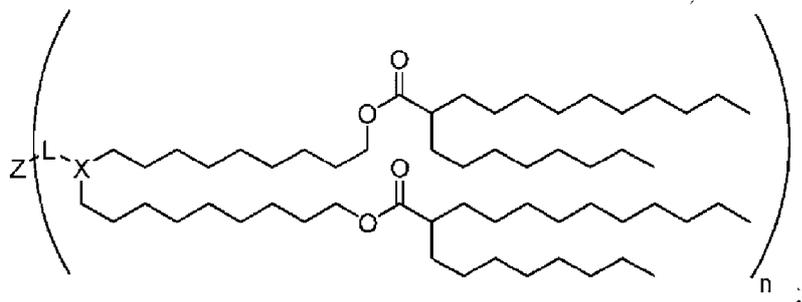
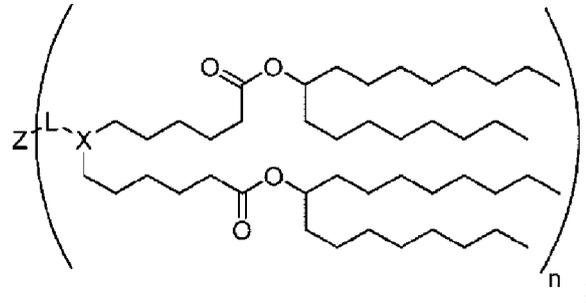
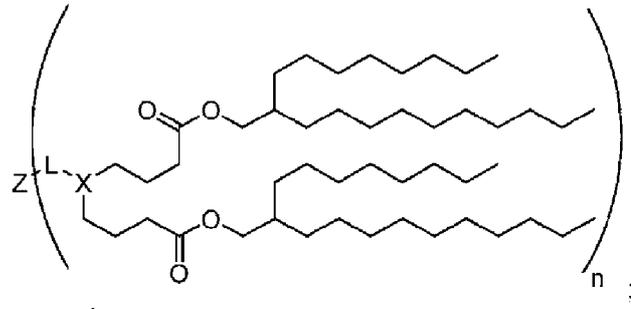
В других вариантах осуществления соединения формулы (IV) R_1 и R_2 независимо имеют одну из следующих структур:



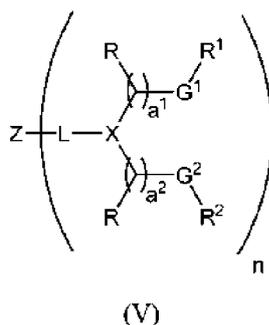
В некоторых вариантах осуществления формулы (IV) соединение имеет одну из следующих структур:







В различных других вариантах осуществления катионный липид вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 имеет структуру формулы (V):



или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или стереоизомер, где:
 один из G¹ или G² в каждом случае представляет -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)_r, -S-S-, -C(=O)S-, SC(=O)-, -N(Ra)C(=O)-, -C(=O)N(Ra)-, -N(Ra)C(=O)N(Ra)-, -OC(=O)N(Ra)- или -N(Ra)C(=O)O-, а другой из G¹ или G² в каждом случае представляет -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)_y-, -S-S-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -N(Ra)C(=O)-, -C(=O)N(Ra)-, -N(Ra)C(=O)N(Ra)-, -OC(=O)N(Ra)- или -N(Ra)C(=O)O- или прямую связь;

L в каждом случае представляет ~O(C=O)-, где ~ представляет ковалентную связь с X;

X представляет CRa;

Z представляет алкил, циклоалкил или одновалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу, когда n составляет 1; или Z представляет алкилен, циклоалкилен или многовалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу, когда n составляет более 1;

Ra в каждом случае независимо представляет H, C₁-C₁₂ алкил, C₁-C₁₂ гидроксилалкил, C₁-C₁₂ аминоалкил, C₁-C₁₂ алкиламинилалкил, C₁-C₁₂ алкоксиалкил, C₁-C₁₂ алкоксикарбонил, C₁-C₁₂ алкилкарбонилокси, C₁-C₁₂ алкилкарбонилоксиалкил или C₁-C₁₂ алкилкарбонил;

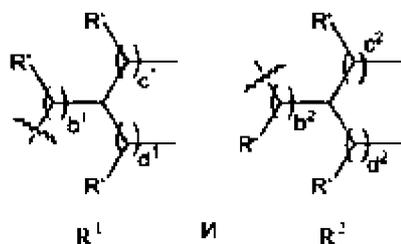
R в каждом случае независимо представляет либо: (a) H или C₁-C₁₂ алкил; либо (b) R вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R¹ и R² в каждом случае имеют следующую структуру, соответственно:

R¹ в каждом случае независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил;

a¹ и a² в каждом случае независимо представляют целое число от 3 до 12;

b¹ и b² в каждом случае независимо представляют 0 или 1;



C_1 и c_2 в каждом случае независимо представляют целое число от 2 до 12;

d_1 и d_2 в каждом случае независимо представляют целое число от 2 до 12;

u в каждом случае независимо представляет целое число от 0 до 2; и

n составляет целое число от 1 до 6,

где a_1 , a_2 , C_1 , c_2 , d_1 и d_2 выбирают так, чтобы сумма $a_1+c_1+d_1$ составляла целое число от 18 до 30, и сумма $a_2+c_2+d_2$ составляла целое число от 18 до 30, и где каждый алкил, алкилен, гидроксилалкил, аминокалкил, алкиламинилалкил, алкоксиалкил, алкоксикарбонил, алкилкарбонилокси, алкилкарбонилоксиалкил и алкилкарбонил необязательно замещен одним или несколькими заместителями.

В некоторых вариантах осуществления формулы (V) G_1 и G_2 каждый независимо представляет $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$.

В других вариантах осуществления формулы (V) X представляет СН.

В некоторых вариантах осуществления формулы (V) сумма $a_1+c_1+d_1$ составляет целое число от 20 до 30, и сумма $a_2+c_2+d_2$ составляет целое число от 18 до 30. В других вариантах осуществления формулы (V) сумма $a_1+c_1+d_1$ составляет целое число от 20 до 30, и сумма $a_2+c_2+d_2$ составляет целое число от 20 до 30. В других вариантах осуществления формулы (V) сумма $a_1+b_1+c_1$ или сумма $a_2+b_2+c_2$ составляет целое число от 12 до 26. В других вариантах осуществления a_1 , a_2 , C_1 , c_2 , d_1 и d_2 выбирают так, чтобы сумма $a_1+c_1+d_1$ составляла целое число от 18 до 28, и сумма $a_2+c_2+d_2$ составляла целое число от 18 до 28.

В других вариантах осуществления формулы (V) a_1 и a_2 независимо представляют целое число от 3 до 10, например целое число от 4 до 9.

В других вариантах осуществления формулы (V) b_1 и b_2 представляют 0. В различных вариантах осуществления b_1 и b_2 представляют 1.

В некоторых других вариантах осуществления формулы (V) C_1 , c_2 , d_1 и d_2 независимо представляют целое число от 6 до 8.

В разных других вариантах осуществления формулы (V) Z представляет алкил или одновалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу, когда n составляет 1; или Z представляет алкилен или многовалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу, когда n составляет более 1.

В других вариантах осуществления формулы (V) Z представляет алкил, циклоалкил или одновалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу, когда n составляет 1. В других вариантах осуществления Z представляет алкил.

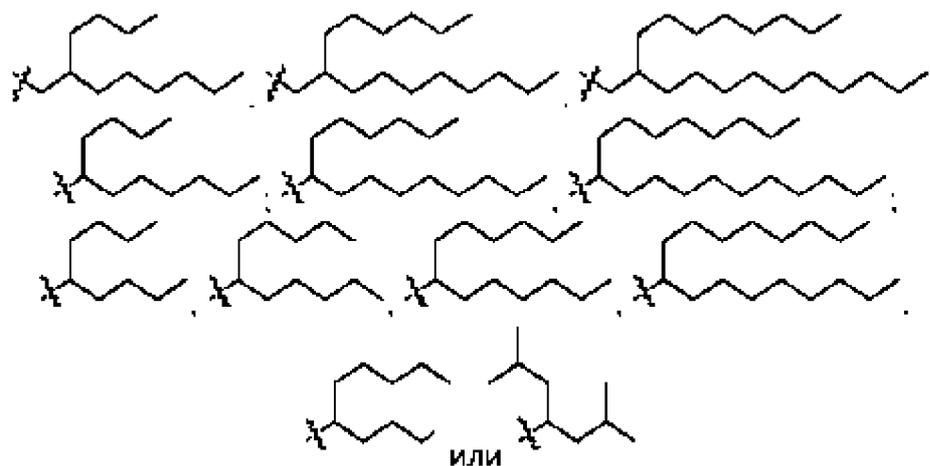
В других различных вариантах осуществления формулы (V) R в каждом случае независимо представляет либо: (а) Н или метил; либо (б) R вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь. Например в некоторых вариантах осуществления каждый R представляет Н. В других вариантах осуществления по меньшей мере один R вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R и атомом

углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

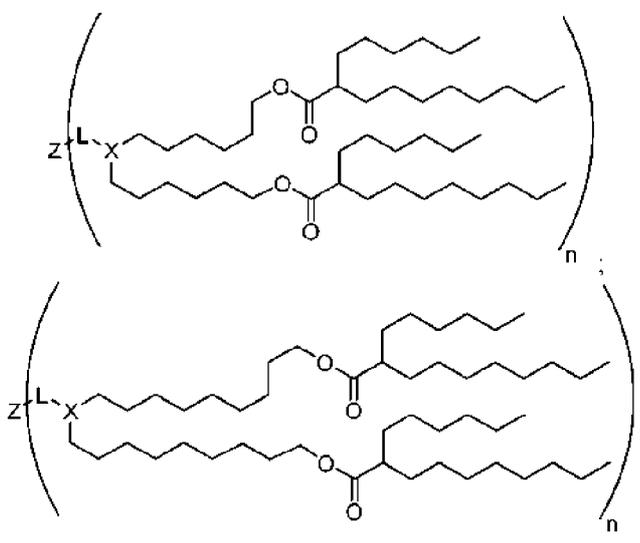
В других вариантах осуществления каждый R' представляет H.

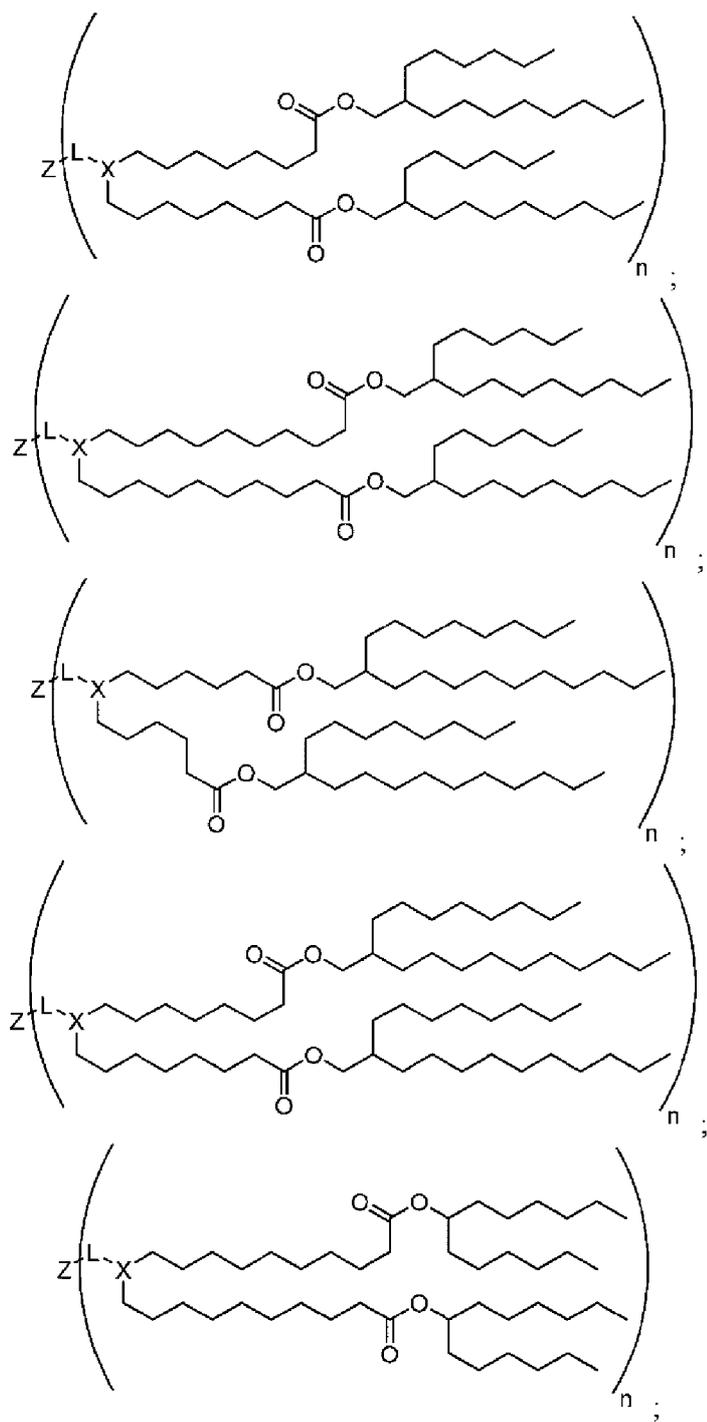
В некоторых вариантах осуществления формулы (V) сумма $a1+c1+d1$ составляет целое число от 20 до 25, и сумма $a2+c2+d2$ составляет целое число от 20 до 25.

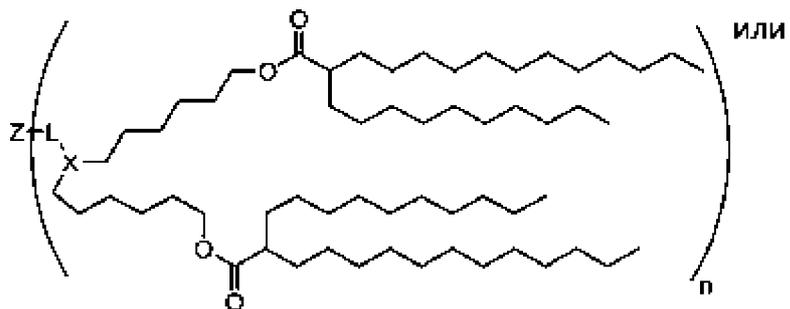
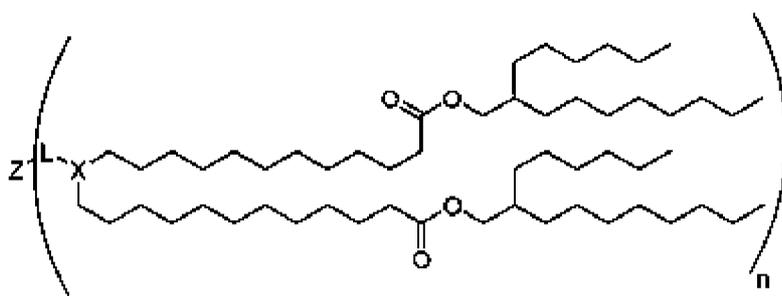
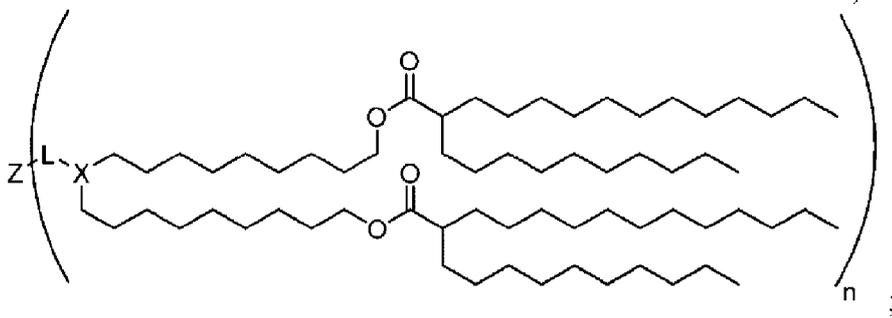
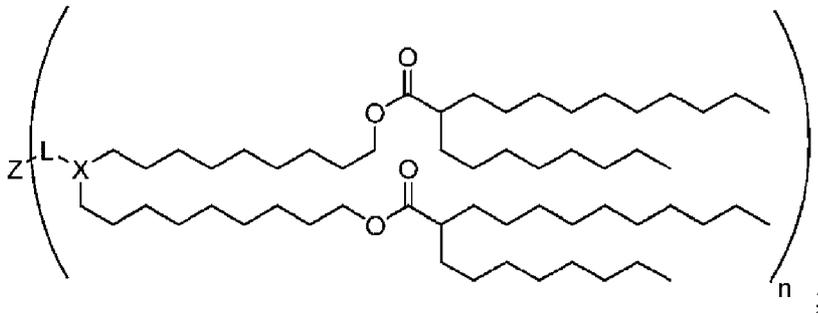
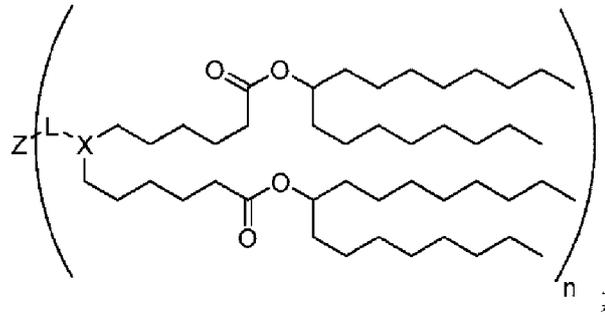
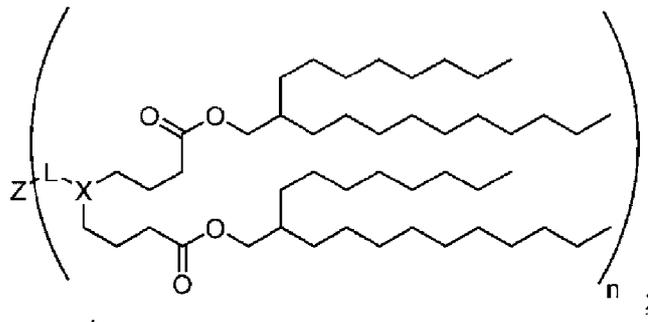
В других вариантах осуществления формулы (V) R1 и R2 независимо имеют одну из следующих структур:



В других вариантах осуществления формулы (V) соединение имеет одну из следующих структур:







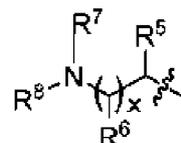
В любых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (IV) или (Y), n составляет 1. В других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (IV) или (V) n составляет более 1.

В других любых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (IV) или (V) Z представляет одно или многовалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления Z представляет одновалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу. В других вариантах осуществления Z представляет многовалентный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну полярную функциональную группу.

В других любых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (IV) или (V) полярную функциональную группу представляет функциональная группа гидроксил, алкокси, сложный эфир, циано, амид, amino, алкиламинил, гетероциклил или гетероарил.

В любых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (IV) или (V) Z представляет гидроксил, гидроксилалкил, алкоксиалкил, amino, aminoалкил, алкиламинил, алкиламинилалкил, гетероциклил или гетероциклилалкил.

В некоторых других вариантах осуществления формулы (IV) или (V) Z имеет следующую структуру:

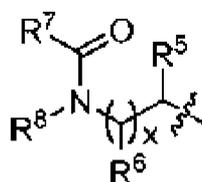


где: R5 и R6 независимо представляют H или C₁-C₆ алкил;

R7 и R⁸ независимо представляют H или C₁-C₆ алкил или R7 и R⁸, вместе с атомом азота, с которым они связаны, соединены с образованием 3-7 членного гетероциклического кольца; и

x составляет целое число от 0 до 6.

В различных других вариантах осуществления формулы (IV) или (V) Z имеет следующую структуру:



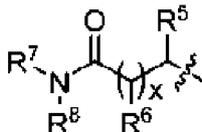
где: R5 и R6 независимо представляют H или C₁-C₆ алкил;

R7 и R⁸ независимо представляют H или C₁-C₆ алкил или R7 и R⁸, вместе с атомом азота, с которым они связаны, соединены с образованием 3-7 членного гетероциклического кольца; и

x составляет целое число от 0 до 6.

В различных других вариантах осуществления формулы (IV) или (V) Z имеет

следующую структуру:



где:

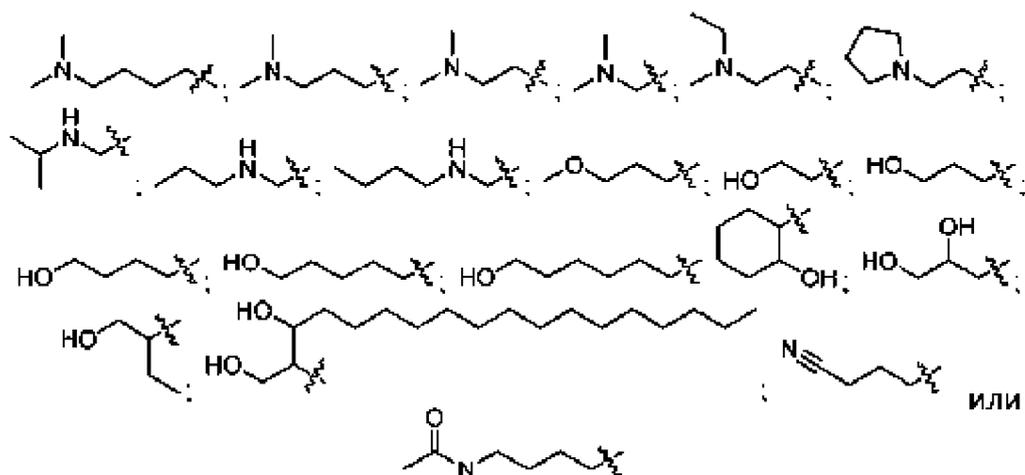
R5 и R6 независимо представляют H или (C1-C6 алкил);

R7 и R⁸ независимо представляют H или C₁-C₆ алкил или R7 и R⁸, вместе с атомом азота, с которым они связаны, соединены с образованием 3-7 членного гетероциклического кольца; и

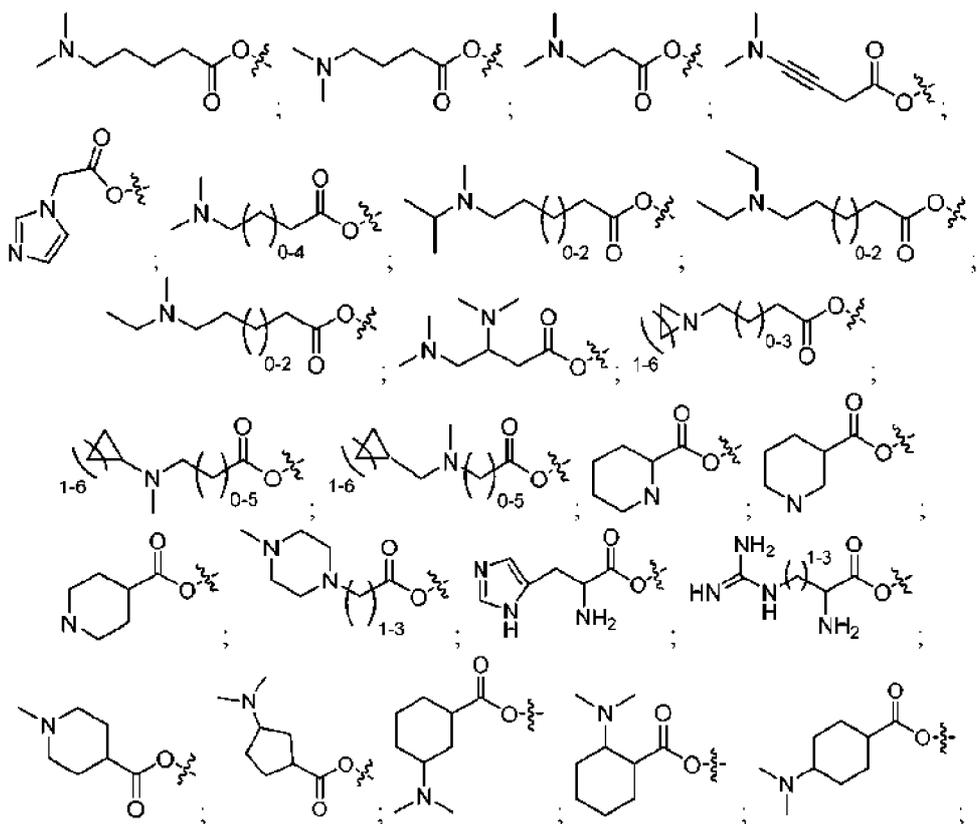
x составляет целое число от 0 до 6.

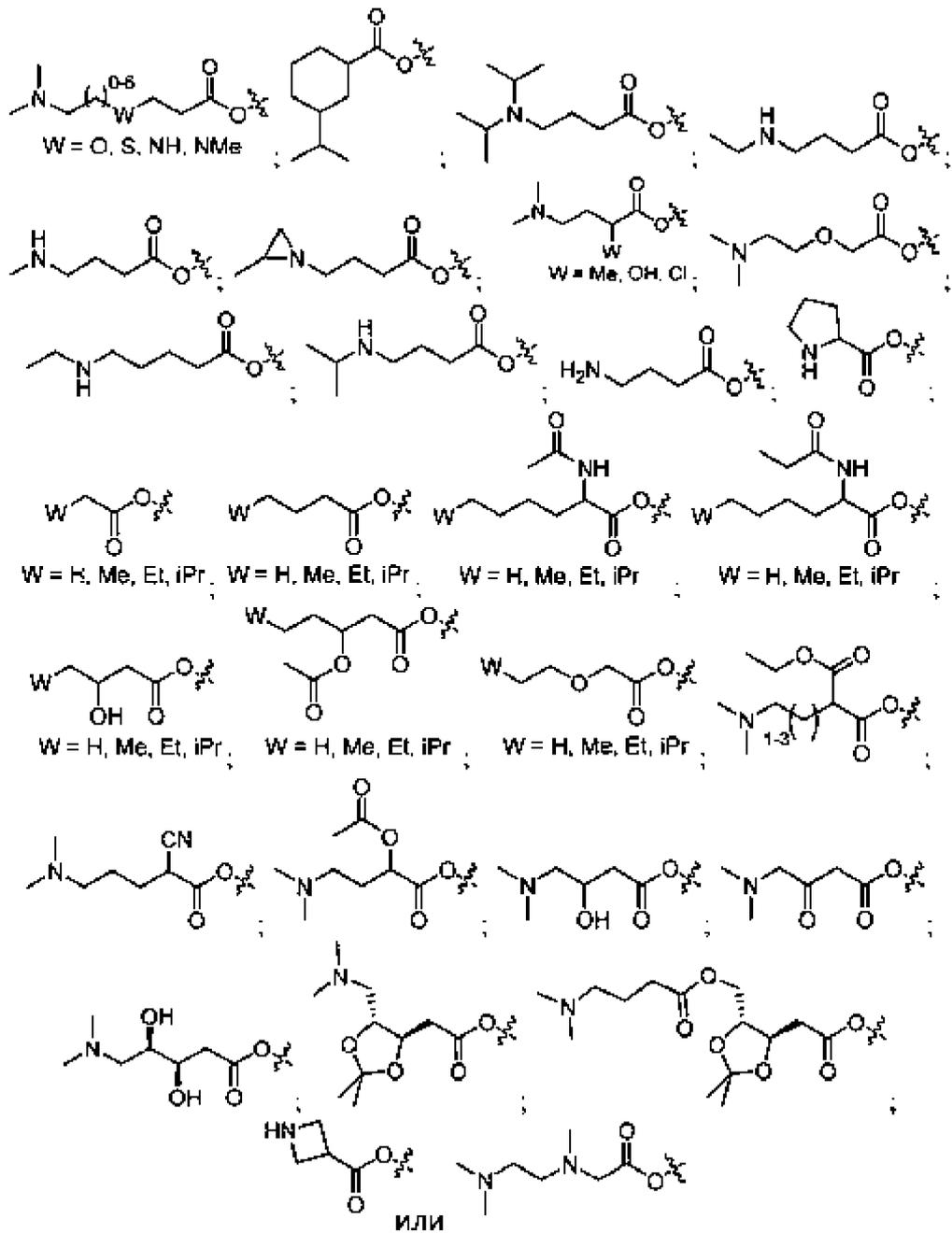
В некоторых других вариантах осуществления формулы (IV) или (V) Z представляет гидроксилалкил, цианоалкил или алкил, замещенный одним или несколькими сложными эфирами или амидными группами.

Например, в любых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (IV) или (V) Z имеет одну из следующих структур:

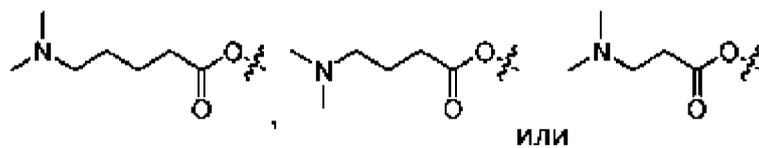


В других вариантах осуществления формулы (IV) или (V) Z-L имеет одну из следующих структур:

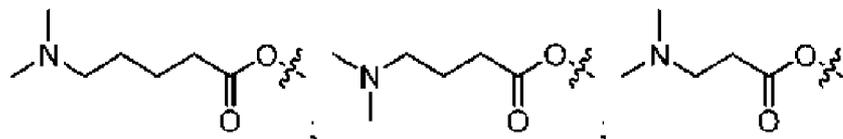




В других вариантах осуществления Z-L имеет одну из следующих структур:



В других вариантах осуществления X представляет СН и Z-L имеет одну из следующих структур:

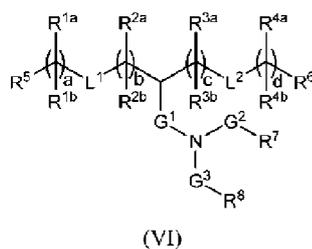


В разных других вариантах осуществления катионный липид по любому из вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 имеет одну из структур, приведенных в таблице 4 ниже.

Таблица 4: Типовые Соединения формулы (IV) или (V)

No.	Structure
IV-1	
IV-2	
IV-3	

В одном варианте осуществления катионный липид представляет соединение, имеющее следующую структуру (VI):



или ее фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

L¹ и L² каждый независимо представляет --O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)X-, -S-S-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -NRaC(=O)-, -C(=O)NRa-, -NRaC(=O)NRa-, 5 -OC(=O)NRa-, -NRaC(=O)O- или прямую связь;

G¹ представляет C1-C2 алкилен, -(C=O)-, -O(C=O)-, -SC(=O)-, -NR³C(=O)- или прямую связь;

G2 представляет $-C(=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)S-$, $-C(=O)NR^a-$ или прямую связь;

G3 представляет C_1-C_6 алкилен;

R^a представляет H или C_1-C_{12} алкил;

R^{1a} и R^{1b} в каждом случае независимо представляют либо: (a) H или C_1-C_{12} алкил; либо (b) R^{1a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{2a} и R^{2b} в каждом случае независимо представляют либо: (a) H или C_1-C_{12} алкил; либо (b) R^{2a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{3a} и R^{3b} в каждом случае независимо представляют либо (a): H или C_1-C_{12} алкил; либо (b) R^{3a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют либо: (a) H или C_1-C_{12} алкил; либо (b) R^{4a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь;

R5 и R6 каждый независимо представляет H или метил;

R7 представляет H или C_1-C_{20} алкил;

R^8 представляет OH, $-N(R^9)(C=O)R^{10}$, $-(C=O)NR^9R^{10}$, $-NR^9R^{10}$, $-(C=O)OR^n$ или $-O(C=O)R^{11}$, при условии, что G3 представляет C_4-C_6 алкилен, когда R^8 представляет $-NR^9R^{10}$,

R^9 и R^{10} каждый независимо представляет H или C_1-C_{12} алкил;

R^{11} представляет аралкил;

a, b, c и d каждый независимо составляет целое число от 1 до 24; и

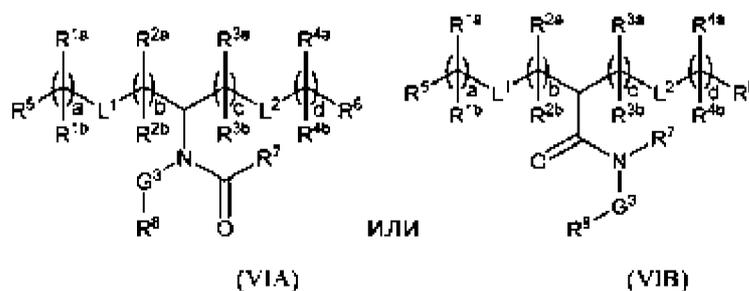
x составляет 0, 1 или 2,

где каждый алкил, алкилен и аралкил необязательно замещены.

В некоторых вариантах осуществления структур (VI) L^1 и L^2 каждый независимо представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ или прямую связь. В других вариантах осуществления G1 и G2 каждый независимо представляет $-(C=O)-$ или прямую связь. В некоторых различных вариантах осуществления L^1 и L^2 каждый независимо представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ или прямую связь; и G1 и G2 каждый независимо представляет $-(C=O)-$ или прямую связь.

В некоторых различных вариантах осуществления структур (VI) L^1 и L^2 каждый независимо представляет $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^a-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^1$, $-NR^aC(=O)O-$, $-NR^aS(O)_xNR^a-$, $-NR^aS(O)_x-$ или $-S(O)_xNR^a-$.

В других вышеуказанных вариантах осуществления структур (VI) соединение имеет одну из следующих структур (VIA) или (VIB):



В некоторых вариантах осуществления соединения имеет структуру (VIA). В других вариантах осуществления соединения имеет структуру (VIB).

В любых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VI) один из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет $-O(C=O)-$.

В некоторых различных вышеуказанных вариантах осуществления один из L^1 или L^2 представляет $-(C=O)O-$. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет $-(C=O)O-$.

В различных вариантах осуществления структур (VI) один из L^1 или L^2 представляет прямую связь. В рамках настоящего изобретения «прямая связь» означает, что группа (например L^1 или L^2) отсутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет прямую связь.

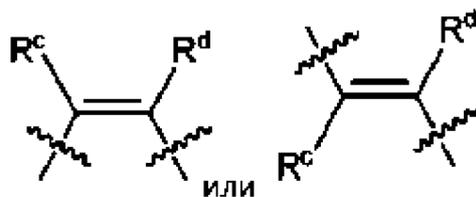
В других различных вышеуказанных вариантах осуществления по меньшей мере для одного случая из R^{1a} и R^{1b} , R^{1a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

В других различных вариантах осуществления структур (VI) по меньшей мере для одного случая из R^{4a} и R^{4b} , R^{4a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

В других вариантах осуществления структур (VI) по меньшей мере для одного случая из R^{2a} и R^{2b} , R^{2a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

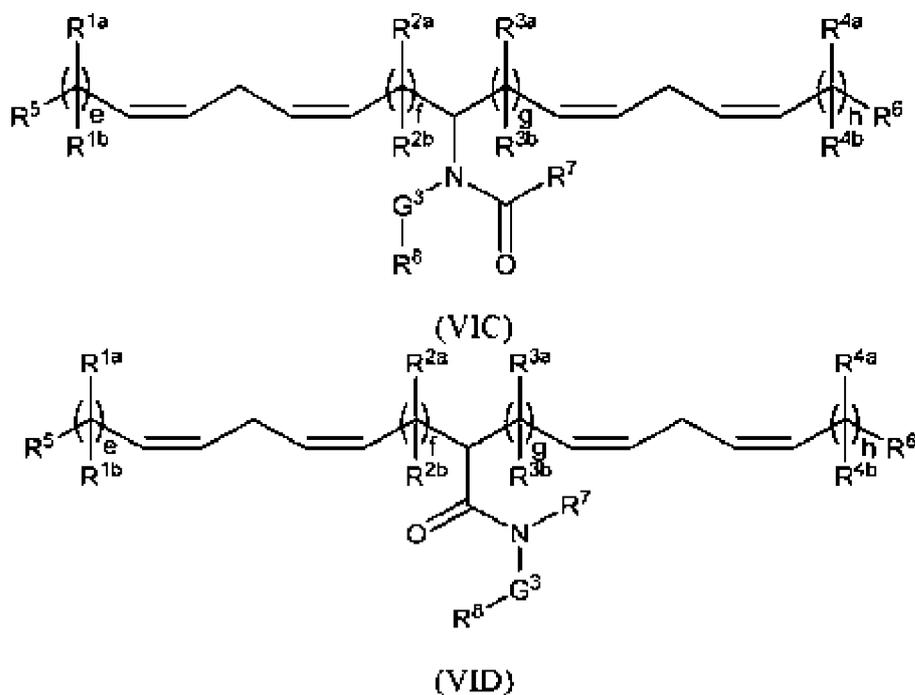
В других различных вышеуказанных вариантах осуществления по меньшей мере для одного случая из R^{3a} и R^{3b} , R^{3a} представляет H или C_1-C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

Понятно, что «углерод-углеродная» двойная связь относится к одной из следующих структур:



где R^c и R^d в каждом случае независимо представляют H или заместитель. Например, в некоторых вариантах осуществления R^c и R^d в каждом случае независимо представляют H, C_1 - C_{12} алкил или циклоалкил, например H или C_1 - C_{12} алкил.

В других различных вариантах осуществления соединение имеет одну из следующих структур (VIC) или (VID):

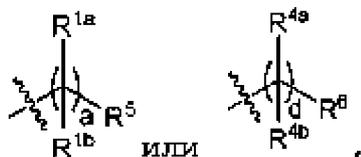


где e, f, g и h каждый независимо составляет целое число от 1 до 12.

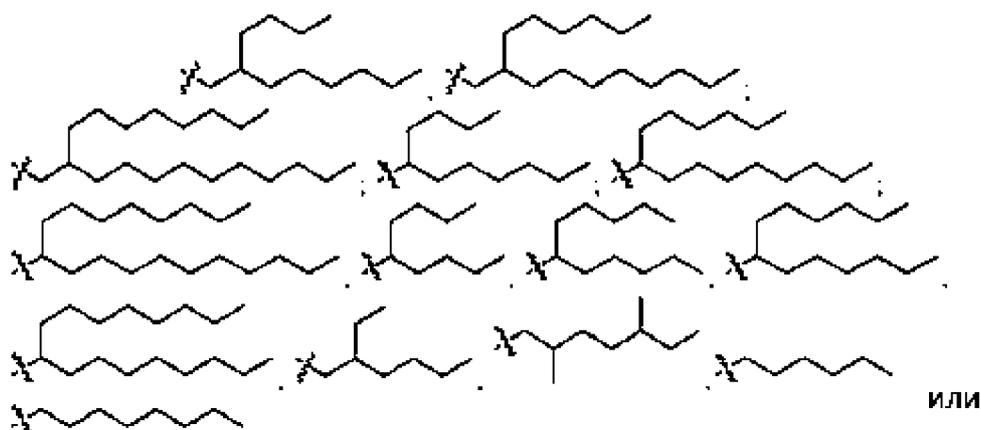
В некоторых вариантах осуществления соединение имеет структуру (VIC). В других вариантах осуществления соединение имеет структуру (VID).

В различных вариантах осуществления of соединения структур (VIC) или (VID), e, f, g и h каждый независимо составляет целое число от 4 до 10.

В других различных вариантах осуществления



или оба независимо имеет одну из следующих структур:



В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления a, b, c и d каждый независимо составляет целое число от 2 до 12 или целое число от 4 до 12. В других вариантах осуществления a, b, c и d каждый независимо составляет целое число от 8 до 12 или от 5 до 9. В некоторых определенных вариантах осуществления a составляет 0. В некоторых вариантах осуществления a составляет 1. В других вариантах осуществления a составляет 2. В других вариантах осуществления a составляет 3. В других вариантах осуществления a составляет 4. В некоторых вариантах осуществления a составляет 5. В других вариантах осуществления a составляет 6. В других вариантах осуществления a составляет 7. В других вариантах осуществления a составляет 8. В некоторых вариантах осуществления a составляет 9. В других вариантах осуществления a составляет 10. В других вариантах осуществления a составляет 11. В других вариантах осуществления a составляет 12. В некоторых вариантах осуществления a составляет 13. В других вариантах осуществления a составляет 14. В других вариантах осуществления a составляет 15. В других вариантах осуществления a составляет 16.

В некоторых вариантах осуществления структур (VI) b составляет 1. В других вариантах осуществления b составляет 2. В других вариантах осуществления b составляет 3. В других вариантах осуществления b составляет 4. В некоторых вариантах осуществления b составляет 5. В других вариантах осуществления b составляет 6. В других вариантах осуществления b составляет 7. В других вариантах осуществления b составляет 8. В некоторых вариантах осуществления b составляет 9. В других вариантах осуществления b составляет 10. В других вариантах осуществления b составляет 11. В других вариантах осуществления b составляет 12. В некоторых вариантах осуществления b составляет 13. В других вариантах осуществления b составляет 14. В других вариантах осуществления b составляет 15. В других вариантах осуществления b составляет 16.

В некоторых вариантах осуществления структур (VI) c составляет 1. В других вариантах осуществления c составляет 2. В других вариантах осуществления c составляет 3. В других вариантах осуществления c составляет 4. В некоторых вариантах

осуществления g составляет 10. В других вариантах осуществления g составляет 11. В других вариантах осуществления g составляет 12.

В некоторых вариантах осуществления структур (VI) h составляет 1. В других вариантах осуществления e составляет 2. В других вариантах осуществления h составляет 3. В других вариантах осуществления h составляет 4. В некоторых вариантах осуществления e составляет 5. В других вариантах осуществления h составляет 6. В других вариантах осуществления h составляет 7. В других вариантах осуществления h составляет 8. В некоторых вариантах осуществления h составляет 9. В других вариантах осуществления h составляет 10. В других вариантах осуществления h составляет 11. В других вариантах осуществления h составляет 12.

В некоторых других вариантах осуществления структур (VI) a и d одинаковые. В некоторых других вариантах осуществления b и c одинаковые. В некоторых других конкретных вариантах осуществления i и d одинаковые, и b и c одинаковые.

Сумма a и b и сумма c и d являются факторами, которые можно варьировать для получения липида, обладающего нужными свойствами. В одном варианте осуществления i и b выбирают так, чтобы их сумма составляла целое число в диапазоне от 14 до 24. В других вариантах осуществления c и d выбирают так, чтобы их сумма составляла целое число в диапазоне от 14 до 24. В дополнительном варианте осуществления сумма a и b и сумма c и d одинаковые. Например, в некоторых вариантах осуществления сумма a и b и сумма c и d обе составляют одинаковое целое число, которое может колебаться от 14 до 24. В других вариантах осуществления a, b, c и d выбирают так, чтобы сумма a и b и сумма c и d составляла 12 или более.

Заместители в R^{1a} , R^{2a} , R^3a и R^{4a} конкретно не ограничены. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет H. В некоторых вариантах осуществления R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} в каждом случае представляют H. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_{12} алкил. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_8 алкил. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет C_1 - C_6 алкил. В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил представляет метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, трет-бутил, n-гексил или n-октил.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления R^{1a} , R^{1b} , R^{4a} и R^{4b} в каждом случае представляют C_1 - C_{12} алкил.

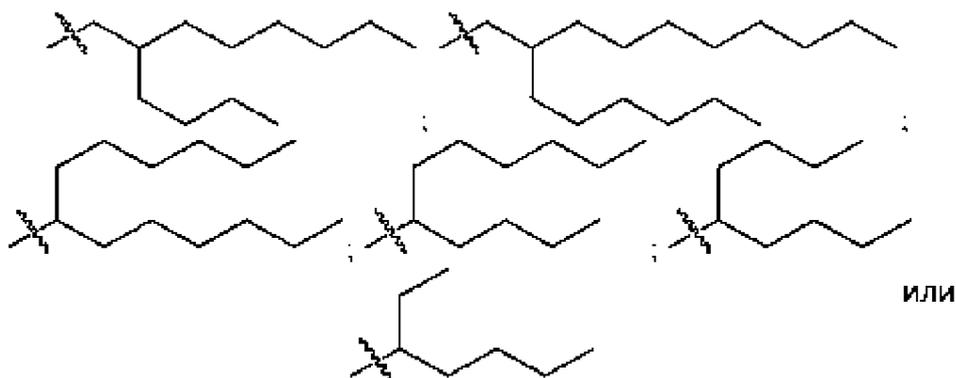
В дополнительных вышеуказанных вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} представляет H или R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} в каждом случае представляют H.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь. В других вариантах осуществления вышеуказанный R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, и вместе с соседним R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образуют двойную углерод-углеродную связь.

Заместители в R5 и R6 в вышеуказанных вариантах осуществления конкретно не ограничены. В некоторых вариантах осуществления один из R5 или R6 представляет метил. В других вариантах осуществления каждый из R5 или R6 представляет метил.

Заместители в R7 в вышеуказанных вариантах осуществления конкретно не ограничены. В некоторых вариантах осуществления R7 представляет C6-C16 алкил. В некоторых других вариантах осуществления R7 представляет C6-C9 алкил. В некоторых этих вариантах осуществления R7 замещен $-(C=O)ORb$, $-O(C=O)Rb$, $-C(=O)Rb$, $-ORb$, $-S(O)_xRb$, $-S-SRb$, $-C(=O)SRb$, $-SC(=O)Rb$, $-NRaRb$, $-NRaC(=O)Rb$, $-C(=O)NRaRb$, $-NRaC(=O)NRaRb$, $-OC(=O)NRaRb$, $-NRaC(=O)ORb$, $-NRaS(O)_xNRaRb$, $-NRaS(O)_xRb$ или $-S(O)_xNRaRb$, где: Ra представляет H или C₁-C₁₂ алкил; Rb представляет C₁-C₁₅ алкил; а x составляет 0, 1 или 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R7 замещен на $-(C=O)ORb$ или $-O(C=O)Rb$.

В различных вышеуказанных вариантах осуществления структур (VI) Rb представляет разветвленный C₃-C₁₅ алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления Rb имеет одну из следующих структур:

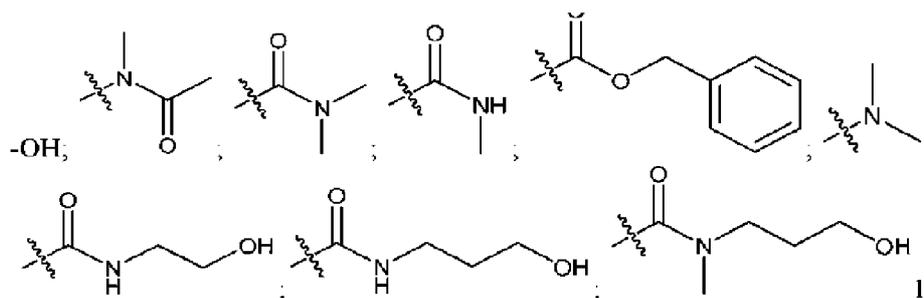


В некоторых вариантах осуществления R⁸ представляет OH.

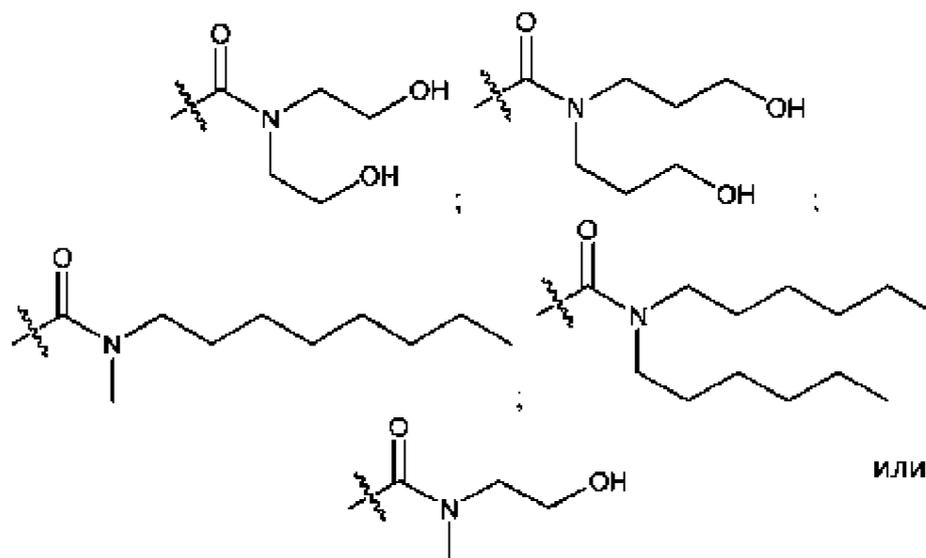
В других вариантах осуществления структур (VI) R⁸ представляет $-N(R^9)(C=O)R^{10}$. В некоторых других вариантах осуществления R⁸ представляет $-(C=O)NR^9R^{10}$. В других вариантах осуществления R⁸ представляет $-NR^9R^{10}$. В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления R⁹ и R¹⁰ каждый независимо представляет H или C₁-C₈ алкил, например H или C₁-C₃ алкил. В других конкретных этих вариантах осуществления C₁-C₈ алкил или C₁-C₃ алкил незамещенный или замещенный с гидроксил. В других этих вариантах осуществления R⁹ и R¹⁰ каждый представляет метил.

В других вариантах осуществления структур (VI) R⁸ представляет $-(C=O)OR^{11}$. В некоторых этих вариантах осуществления R¹¹ представляет бензил.

В еще более конкретных вариантах осуществления структур (VI) R⁸ имеет одну из следующих структур:



В других вышеуказанных вариантах осуществления соединения, G3 представляет

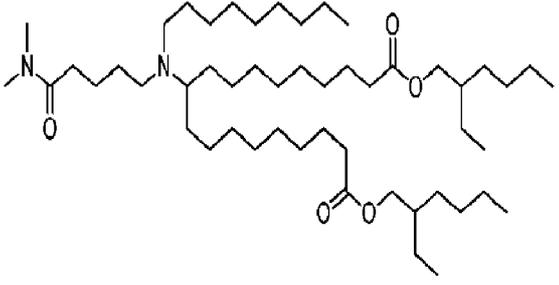
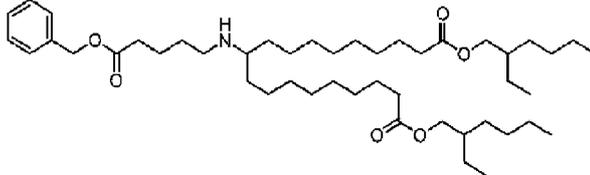
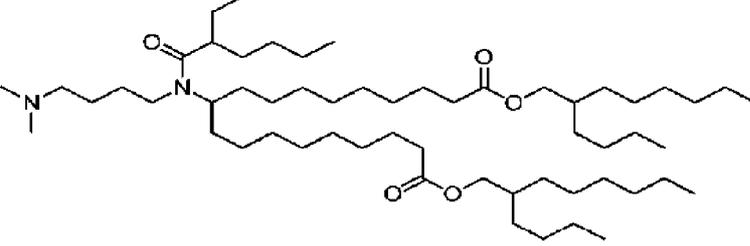
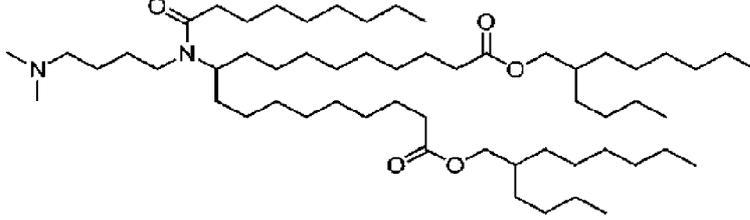
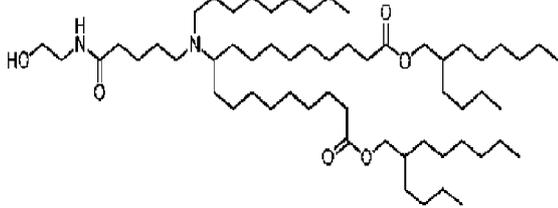
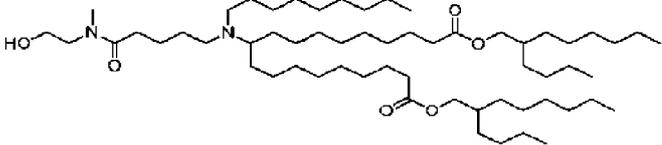
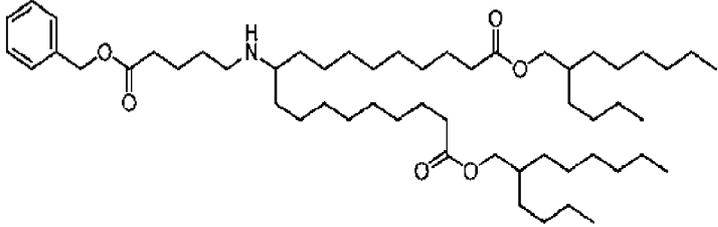


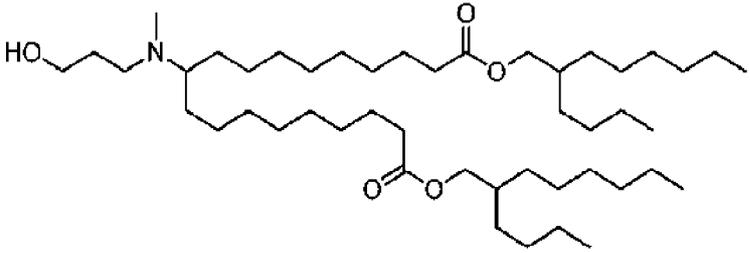
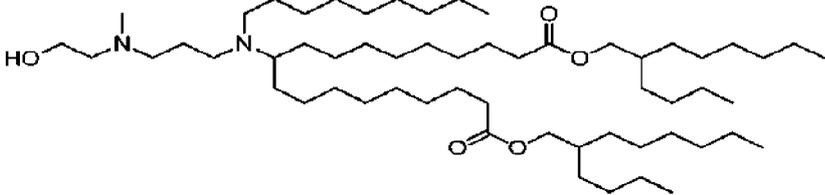
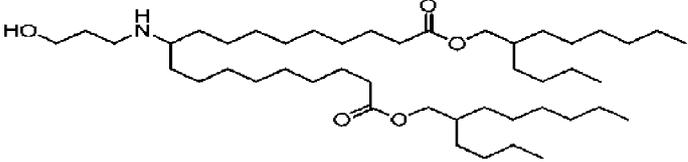
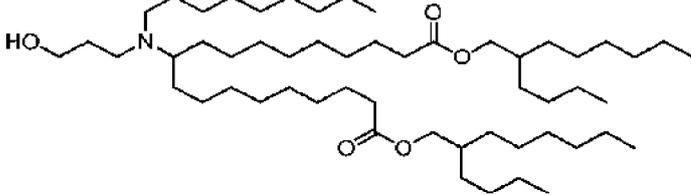
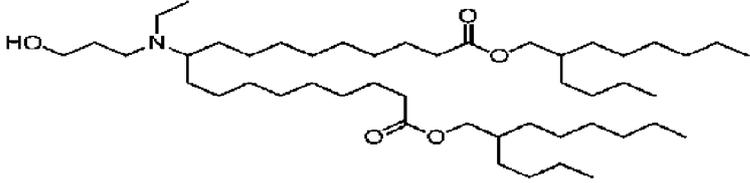
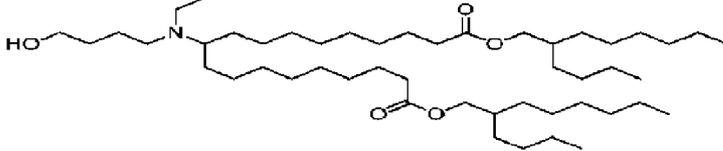
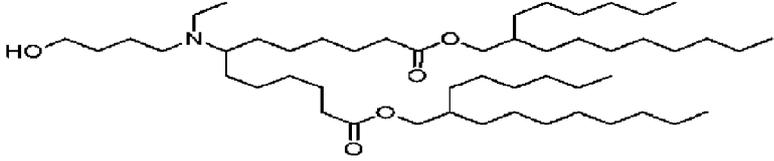
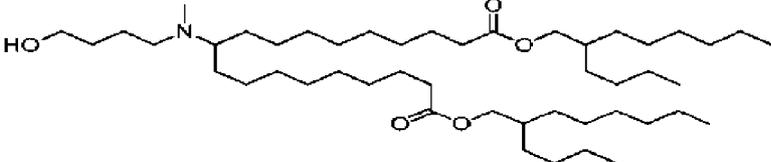
C2-C5 алкилен, например C2-C4 алкилен, C3 алкилен или C4 алкилен. В некоторых этих вариантах осуществления R^8 представляет OH. В других вариантах осуществления G2 отсутствует и R7 представляет C₁-C2 алкилен, например метил.

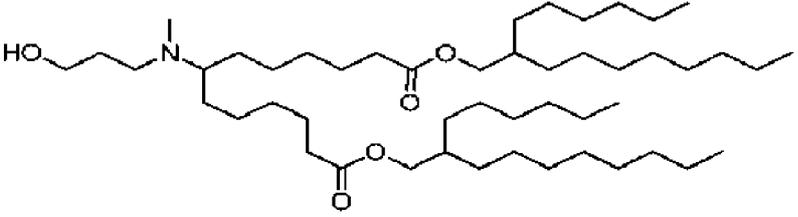
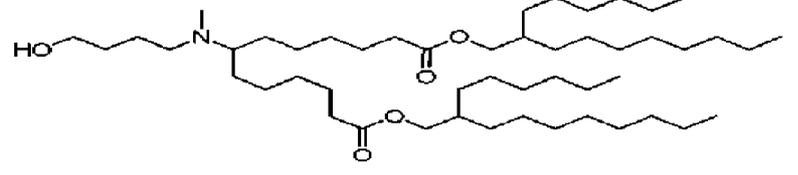
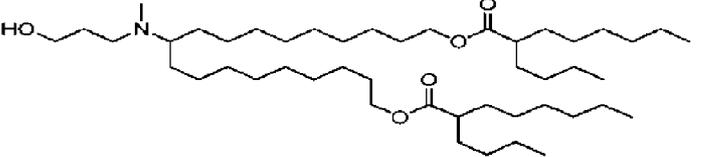
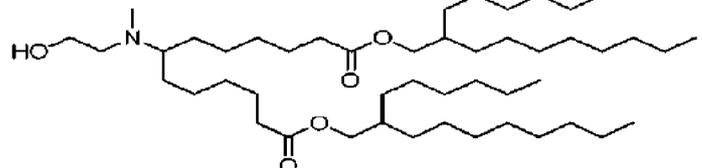
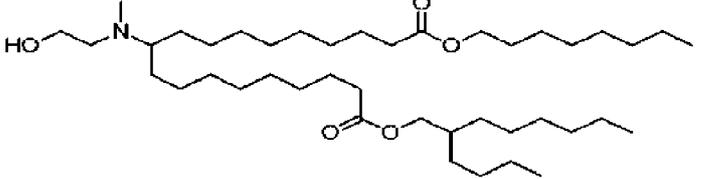
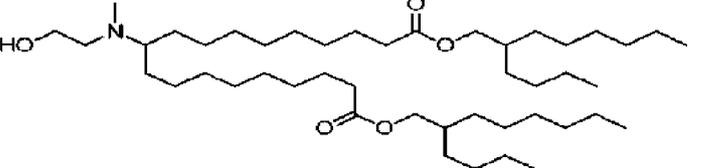
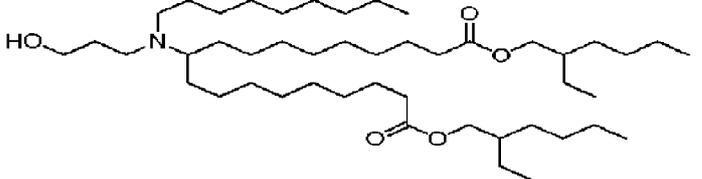
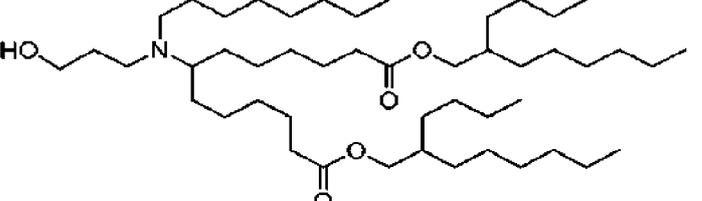
В разных других вариантах осуществления соединения имеет одну из структур, приведенных в таблице 5 ниже.

Таблица 5. Типовые катионные липиды структур (VI)

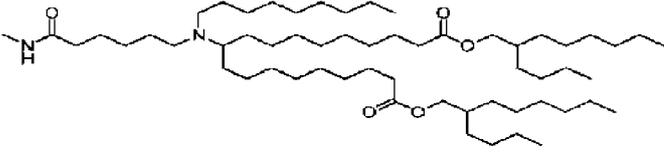
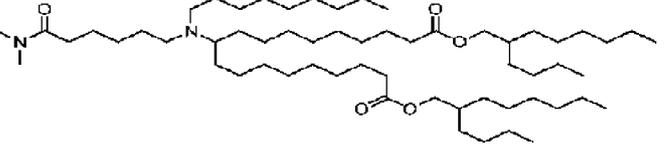
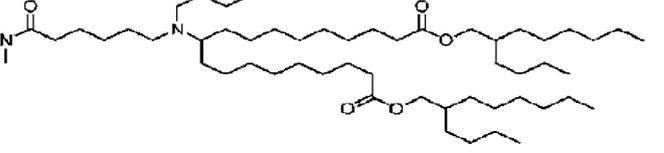
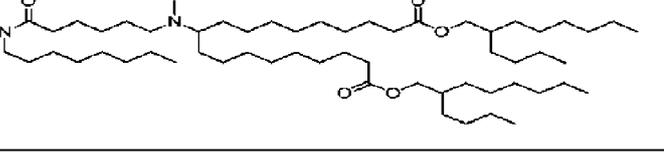
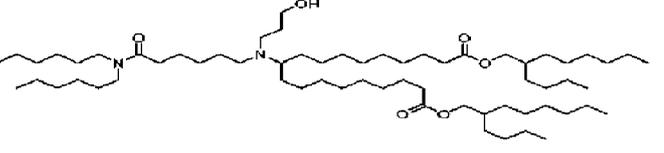
№	Структура
VI-1	

№	Структура
VI-2	
VI-3	
VI-4	
VI-5	
VI-6	
VI-7	
VI-8	

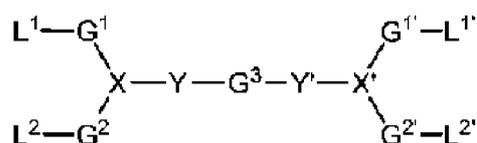
№	Структура
VI-9	
VI-10	
VI-11	
VI-12	
VI-13	
VI-14	
VI-15	
VI-16	

№	Структура
I-17	
VI-18	
VI-19	
VI-20	
VI-21	
VI-22	
VI-23	
I-24	

№	Структура
VI-25	
VI-26	
VI-27	
VI-28	
VI-29	
VI-30	
VI-31	
I-32	

№	Структура
VI-33	
VI-34	
VI-35	
VI-36	
VI-37	

В одном варианте осуществления катионный липид представляет соединение, имеющее следующую структуру (VII):



(VII)

или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или стереоизомер, где:

X и X' каждый независимо представляет N или CR;

Y и Y' каждый независимо отсутствует, представляет -O(C=O)-, -(C=O)O- или NR,

при условии, что:

a) Y отсутствует, когда X представляет N;

b) Y' отсутствует, когда X' представляет N;

c) Y представляет -O(C=O)-, -(C=O)O- или NR, когда X представляет CR; и

d) Y' представляет -O(C=O)-, -(C=O)O- или NR, когда X' представляет CR,

L1 и L1 каждый независимо представляет O(C=O)R1, -(C=O)OR1, -C(=O)R1, -OR1, -S(O)ZR1, -S-SR1, -C(=O)SR1 -SC(=O)R1, -NRaC(=O)R1 -C(=O)NRbRc, -NRaC(=O)NRbRc, -OC(=O)NRbRc or -NRaC(=O)OR1;

L2 and L2 каждый независимо представляет -O(C=O)R2, -(C=O)OR2, -C(=O)R2, 5 -

OR₂, -S(O)ZR₂, -S-SR₂, -C(=O)SR₂, -SC(=O)R₂, -NRdC(=O)R₂, -C(=O)NReRf, -NRdC(=O)NReRf, -OC(=O)NReRf; -NRdC(=O)OR₂ или прямую связь с R₂;

G₁, G₁', G₂ и G₂' каждый независимо представляет C₂-C₁₂ алкилен или C₂-C₁₂ алкенилен;

G₃ представляет C₂-C₂₄ гетероалкилен или C₂-C₂₄ гетероалкенилен;

R_a, R_b, R_d и R_e в каждом случае независимо представляют H, C₁-C₁₂ алкил или C₂-C₁₂ алкенил;

R_c и R_f в каждом случае независимо представляют C₁-C₁₂ алкил или C₂-C₁₂ алкенил;

R в каждом случае независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил;

R₁ и R₂ в каждом случае независимо представляют разветвленный C₆-C₂₄ алкил или разветвленный C₆-C₂₄ алкенил;

z составляет 0, 1 или 2, и

где каждый алкил, алкенил, алкилен, алкенилен, гетероалкилен и гетероалкенилен независимо замещен или незамещен, если не указано иное.

В других различных вариантах осуществления структур (VII):

X и X' каждый независимо представляет N или CR;

Y и Y' каждый независимо отсутствует или представляет NR, при условии, что:

a) Y отсутствует, когда X представляет N;

b) Y' отсутствует, когда X' представляет N;

c) Y представляет NR, когда X представляет CR; и

d) Y' представляет NR, когда X' представляет CR,

L₁ и L₁' каждый независимо представляет -O(C=O)R₁, -(C=O)OR₁, -C(=O)R₁, -OR₁, -S(O)ZR\ -S-SR₁, -C(=O)SR₁, -SC(=O)R₁, -NRaC(=O)R\ -C(=O)NRbRc, -NRaC(=O)NRbRc, -OC(=O)NRbRc or -NRaC(=O)OR₁;

L₂ и L₂' каждый независимо представляет -O(C=O)R₂, -(C=O)OR₂, -C(=O)R₂, -OR₂, -S(O)ZR₂, -S-SR₂, -C(=O)SR₂, -SC(=O)R₂, -NRdC(=O)R₂, -C(=O)NReRf, -NRdC(=O)NReRf, -OC(=O)NReRf; -NRdC(=O)OR₂ или прямую связь с R₂;

G₁, G₁', G₂ и G₂' каждый независимо представляет C₂-C₁₂ алкилен или C₂-C₁₂ алкенилен;

G₃ представляет C₂-C₂₄ алкиленоксид или C₂-C₂₄ алкениленоксид;

R_a, R_b, R_d и R_e в каждом случае независимо представляют H, C₁-C₁₂ алкил или C₂-C₁₂ алкенил;

R_c и R_f в каждом случае независимо представляют C₁-C₁₂ алкил или C₂-C₁₂ алкенил;

R в каждом случае независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил;

R₁ и R₂ в каждом случае независимо представляют разветвленный C₆-C₂₄ алкил или разветвленный C₆-C₂₄ алкенил;

z составляет 0, 1 или 2, и

где каждый алкил, алкенил, алкилен, алкенилен, алкиленоксид и алкениленоксид независимо замещен или незамещен, если не указано иное.

В некоторых вариантах осуществления структур (VII) G₃ представляет C₂-C₂₄

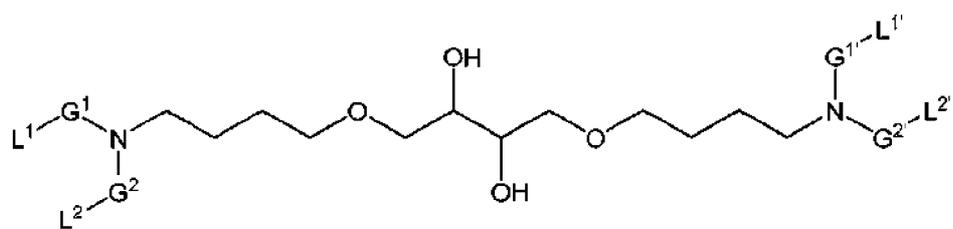
алкиленоксид или C₂-C₂₄ алкениленоксид. В некоторых вариантах осуществления G³ не замещен. В других вариантах осуществления G³ замещен, например замещен гидроксилом. В других конкретных вариантах осуществления G³ представляет C₂-C₁₂ алкиленоксид, например, в некоторых вариантах осуществления G³ представляет C₃-C₇ алкиленоксид, или в других вариантах осуществления G³ представляет C₃-C₁₂ алкиленоксид.

В других вариантах осуществления структур (VII) G³ представляет C₂-C₂₄ алкиленаминил или C₂-C₂₄ алкениленаминил, например C₆-C₁₂ алкиленаминил. В некоторых этих вариантах осуществления G³ не замещен. В других этих вариантах осуществления G³ представляет замещенный C₁-C₆ алкил.

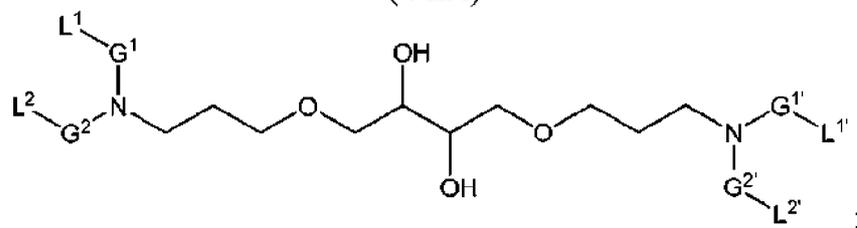
В некоторых вариантах осуществления структур (VII) X и X' каждый представляет N, а Y и Y' каждый отсутствует. В других вариантах осуществления X и X' каждый представляет CR, и Y и Y' каждый представляет NR. В некоторых этих вариантах осуществления R представляет H.

В некоторых вариантах осуществления структур (VII) X и X' каждый представляет CR, и Y и Y' каждый независимо представляет -O(C=O)- или -(C=O)O-.

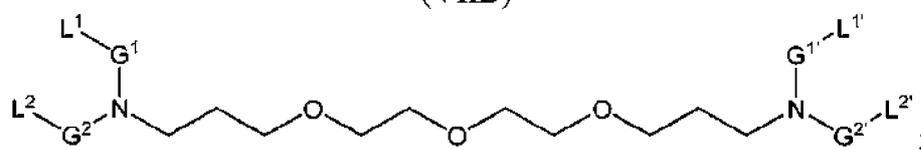
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VII) соединение имеет одну из следующих структур (VIIA), (VIIB), (VIIC), (VIID), (VIIE), (VIIF), (VIIG) или (VIH):



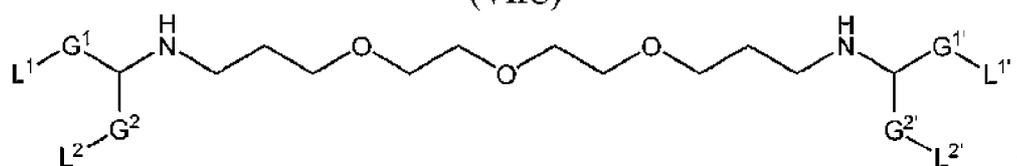
(VIA)



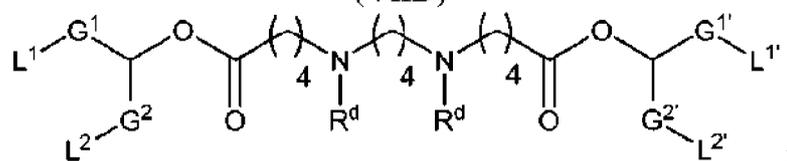
(VIIB)



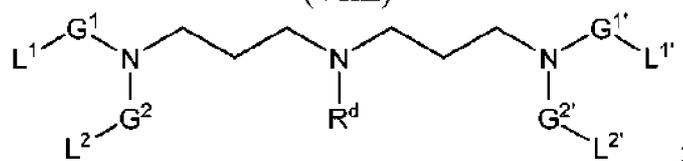
(VIIC)



(VIID)



(VIIE)

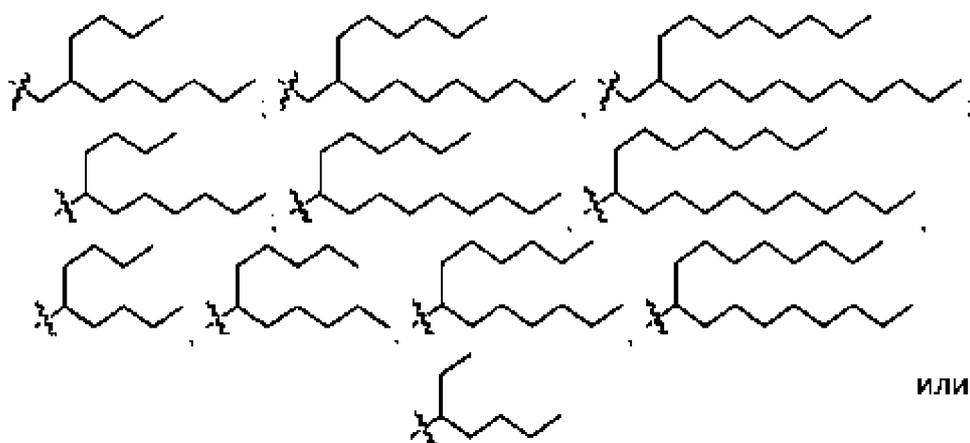


(VIIF)

содержит от 6 до 20 атомов углерода. Например, в некоторых вариантах осуществления а составляет целое число в диапазоне от 5 до 9 или от 8 до 12.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VII) по меньшей мере в одном случае R^{7a} представляет H. Например, в некоторых вариантах осуществления R^{7a} в каждом случае представляет H. В других различных вышеуказанных вариантах осуществления по меньшей мере в одном случае R^{7b} представляет C1-C8 алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления C1-C8 алкил представляет метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, трет-бутил, n-гексил или n-октил.

В различных вариантах осуществления структур (VII) R1 или R2, или оба, в каждом случае независимо имеет одну из следующих структур:

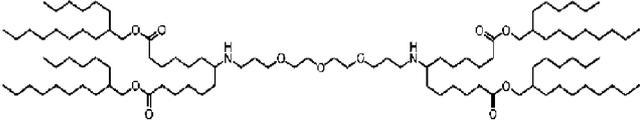
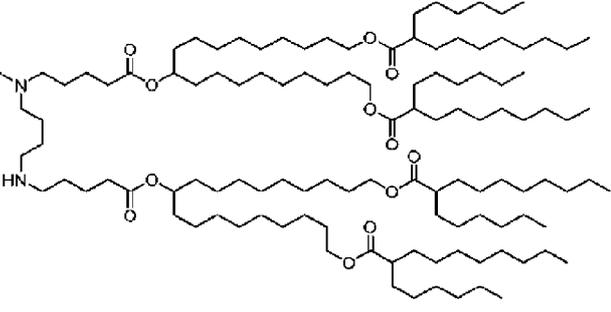
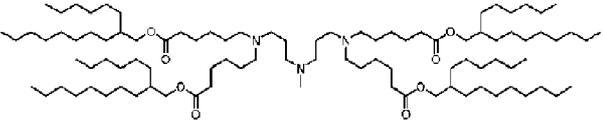
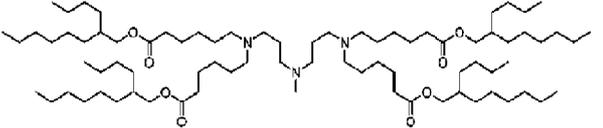
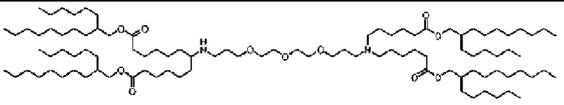
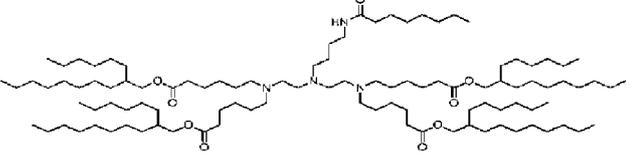
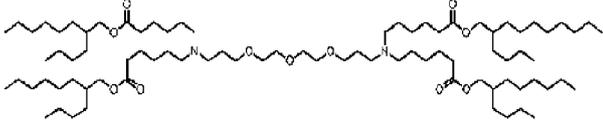
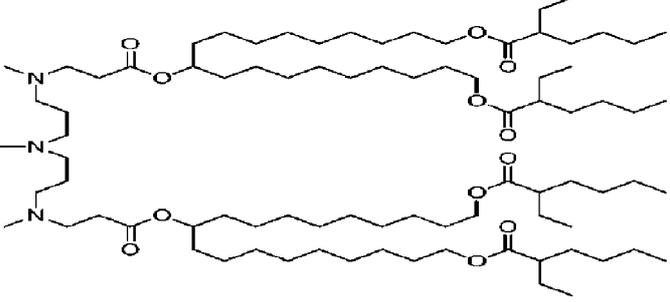


В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VII) Rb, Rc, Re и Ra, при наличии, каждый независимо представляет C3-C12 алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления Rb, Rc, Re и Rf, при наличии, представляют n-гексил, а в других вариантах осуществления Rb, Rc, Re и Rf, при наличии, представляют n-октил.

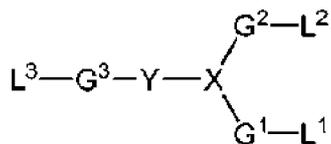
В разных других вариантах осуществления структур (VII) катионный липид имеет одну из структур, приведенных в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Типовые катионные липиды структур (VII)

№	Структура
VII-1	
VII-2	
VII-3	

№	Структура
VII-4	
VII-5	
VII-6	
VII-7	
VII-8	
VII-9	
VII-10	
VII-11	

В одном варианте осуществления катионный липид представляет соединение, имеющее следующую структуру (VIII):



(VIII)

или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или стереоизомер, где:

X представляет N, а Y отсутствует; или X представляет CR, а Y представляет NR;

L1 представляет -O(C=O)R1, -(C=O)OR1, -C(=O)R1, -OR1, -S(O)XR\ -S-SR1, -C(=O)SR1, -SC(=O)R1, -NRaC(=O)R1, -C(=O)NRbRc, -NRaC(=O)NRbRc, -OC(=O)NRbRc or -NRaC(=O)OR1;

L2 представляет -O(C=O)R2, -(C=O)OR2, -C(=O)R2, -OR2, -S(O)XR2, -S-SR2, -C(=O)SR2, -SC(=O)R2, -NRdC(=O)R2, -C(=O)NReRf, -NRdC(=O)NReRf, -OC(=O)NReRf; -NRdC(=O)OR2 или прямую связь с R2;

L3 представляет -O(C=O)R3 или -(C=O)OR3;

G1 и G2 каждый независимо представляет C2-C12 алкилен или C2-C12 алкенилен;

G3 представляет C1-C₂₄ алкилен, C2-C₂₄ алкенилен, C1-C₂₄ гетероалкилен или C2-C₂₄ гетероалкенилен;

Ra, Rb, Rd и Re каждый независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил или C₁-C₁₂ алкенил;

Rc и Rf каждый независимо представляет C₁-C₁₂ алкил или C2-C12 алкенил;

каждый R независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил;

R1, R2 и R3 каждый независимо представляет C₁-C₂₄ алкил или C2-C₂₄ алкенил; а x составляет 0, 1 или 2, и

где каждый алкил, алкенил, алкилен, алкенилен, гетероалкилен и гетероалкенилен независимо замещен или незамещен, если не указано иное.

В других вариантах осуществления структур (1):

X представляет N, а Y отсутствует; или X представляет CR, а Y представляет NR;

L1 представляет -O(C=O)R1, -(C=O)OR1, -C(=O)R1 -OR1, -S(O)xR1, -S-SR1, -C(=O)SR1, -SC(=O)R1, -NR^aC(=O)R¹, -C(=O)NRbRc, -NR^aC(=O)NRbRc, -OC(=O)NRbRc или -NR^aC(=O)OR1;

L2 представляет -O(C=O)R2, -(C=O)OR2, -C(=O)R2, -OR2, -S(O)xR2, -S-SR2, -C(=O)SR2, -SC(=O)R2, -NRdC(=O)R2, -C(=O)NReRf, -NRdC(=O)NReRf, -OC(=O)NReRf; -NRdC(=O)OR2 или прямую связь с R2;

L3 представляет -O(C=O)R3 или -(C=O)OR3;

G1 и G2 каждый независимо представляет C2-C12 алкилен или C2-C12 алкенилен;

G3 представляет C₁-C₂₄ алкилен, C2-C₂₄ алкенилен, C₁-C₂₄ гетероалкилен или C2-C₂₄ гетероалкенилен, когда X представляет CR, а Y представляет NR; и G3 представляет C₁-C₂₄ гетероалкилен или C2-C₂₄ гетероалкенилен, когда X представляет N, а Y отсутствует;

Ra, Rb, Rd и Re каждый независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил или C₁-C₁₂

алкенил;

Rc и Rf каждый независимо представляет C₁-C₁₂ алкил или C₂-C₁₂ алкенил;

каждый R независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил;

R1, R2 и R3 каждый независимо представляет C₁-C₂₄ алкил или C₂-C₂₄ алкенил; и

x составляет 0, 1 или 2, и

где каждый алкил, алкенил, алкилен, алкенилен, гетероалкилен и гетероалкенилен независимо замещен или незамещен, если не указано иное.

В других вариантах осуществления структур (I):

X представляет N, а Y отсутствует, или X представляет CR, а Y представляет NR;

L1 представляет -O(C=O)R1, -(C=O)OR1, -C(=O)R1, -OR1, -SCO^xR1, -S-SR1, -C(=O)SR1, -SC(=O)R1 -NR^aC(=O)R1 -C(=O)NRbRc, -NR^aC(=O)NRbRc, -OC(=O)NRbRc или -NR^aC(=O)OR1;

L2 представляет -O(C=O)R2, -(C=O)OR2, -C(=O)R2, -OR2, -S(O)_xR2, -S-SR2, -C(=O)SR2, -SC(=O)R2, -NRdC(=O)R2, -C(=O)NReRf, -NRdC(=O)NReRf, -OC(=O)NReRr; -NRdC(=O)OR2 или прямую связь с R2;

L3 представляет -O(C=O)R3 или -(C=O)OR3;

G1 и G2 каждый независимо представляет C₂-C₁₂ алкилен или C₂-Q₂ алкенилен;

G3 представляет C₁-C₂₄ алкилен, C₂-C₂₄ алкенилен, C₁-C₂₄ гетероалкилен или C₂-C₂₄ гетероалкенилен;

Ra, Rb, Rd и Re каждый независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил или C₁-C₁₂ алкенил;

Rc и Rf каждый независимо представляет C₁-C₁₂ алкил или C₂-C₁₂ алкенил;

каждый R независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил;

R1, R2 и R3 каждый независимо представляет разветвленный C₆-C₂₄ алкил или разветвленный C₆-C₂₄ алкенил; а

x составляет 0, 1 или 2, и

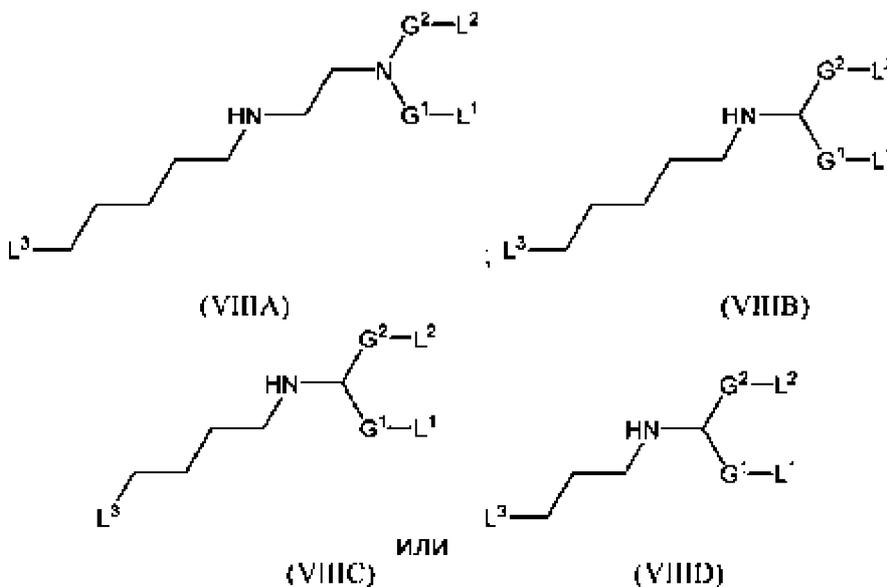
где каждый алкил, алкенил, алкилен, алкенилен, гетероалкилен и гетероалкенилен независимо замещен или незамещен, если не указано иное.

В некоторых вариантах осуществления структур (VIII) G³ не замещен. В других конкретных вариантах осуществления G3 представляет C₂-C₁₂ алкилен, например, в некоторых вариантах осуществления G3 представляет C₃-C₇ алкилен, или в других вариантах осуществления G3 представляет C₃-C₁₂ алкилен. В некоторых вариантах осуществления G3 представляет C₂ или C₃ алкилен.

В других вариантах осуществления структур (VIII) G3 представляет C₁-C₁₂ гетероалкилен, например C₁-C₁₂ аминилалкилен.

В некоторых вариантах осуществления структур (VIII) X представляет N, а Y отсутствует. В других вариантах осуществления X представляет CR, а Y представляет NR, например, в некоторых этих вариантах осуществления R представляет H.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VIII) соединение имеет одну из следующих структур (VIIIА), (VIIIВ), (VIIIС) или (VIIIД):

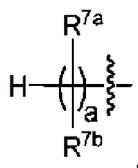


В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VIII) L1 представляет O(C=O)R1, -(C=O)OR1 или

-C(=O)NRbRc, а L2 представляет -O(C=O)R2, -(C=O)OR2 или -C(=O)NReRf. В других конкретных вариантах осуществления L1 представляет -(C=O)ORL, а L2 представляет -(C=O)OR2. В любых вышеуказанных вариантах осуществления L3 представляет -(C=O)OR3.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VIII) G1 и G2 каждый независимо представляет C2-C12 алкилен, например C4-C10 алкилен.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VIII) R1, R2 и R3 каждый независимо представляет разветвленный C₆-C₂₄ алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления R1, R2 и R3 каждый независимо имеет следующую структуру:



где:

R7a и R7b в каждом случае независимо представляют H или C₁-C₁₂ алкил; и a составляет целое число от 2 до 12,

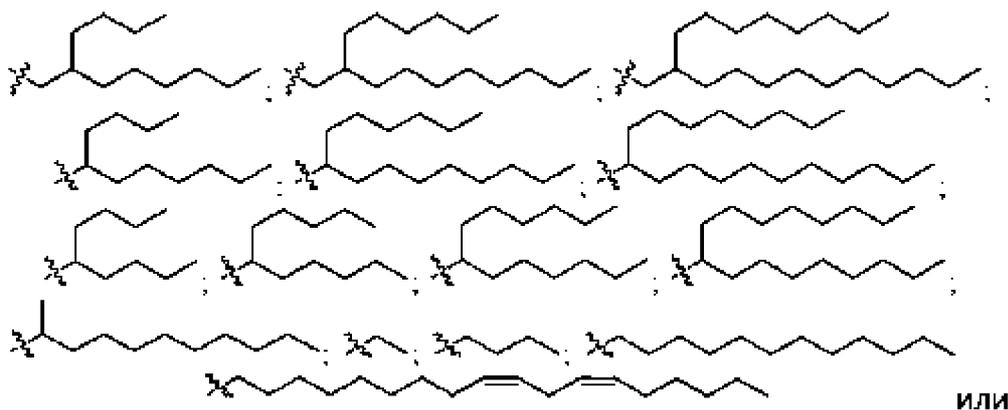
где R7a, R7b и a каждый выбирают таким образом, что R1 и R2 каждый независимо содержит от 6 до 20 атомов углерода. Например, в некоторых вариантах осуществления a составляет целое число в диапазоне от 5 до 9 или от 8 до 12.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VIII) по меньшей мере в одном случае R^{7a} представляет H. Например, в некоторых вариантах осуществления R^{7a} в каждом случае представляет H. В других различных вышеуказанных вариантах осуществления по меньшей мере в одном случае R^{7b} представляет C₁-C₈ алкил. Например,

в некоторых вариантах осуществления C1-C8 алкил представляет метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, трет-бутил, n-гексил или n-октил.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VIII) X представляет CR, Y представляет NR, а R3 представляет C₁-C₁₂ алкил, например этил, пропил или бутил. В некоторых этих вариантах осуществления R1 и R2 каждый независимо представляет разветвленный C₆-C₂₄ алкил.

В различных вариантах осуществления структур (VIII) R1, R2 и R3 каждый независимо имеет одну из следующих структур:



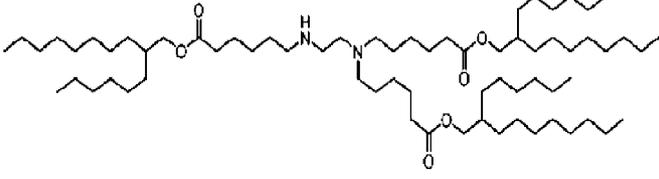
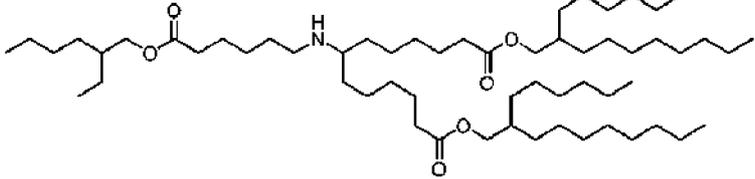
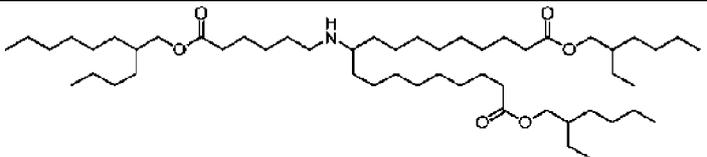
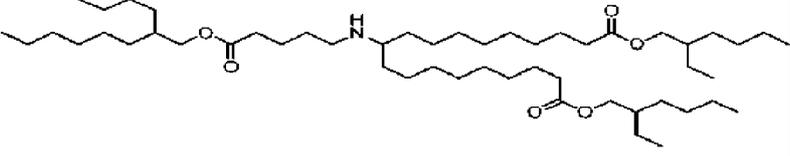
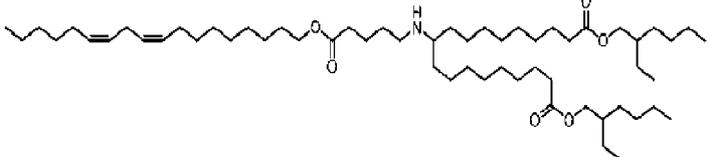
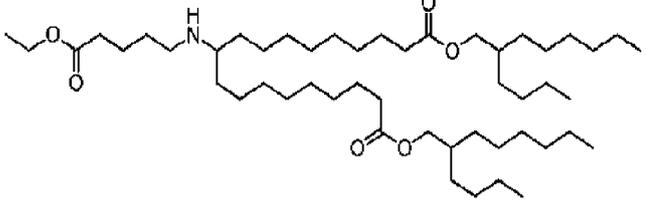
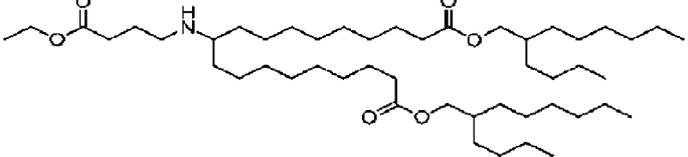
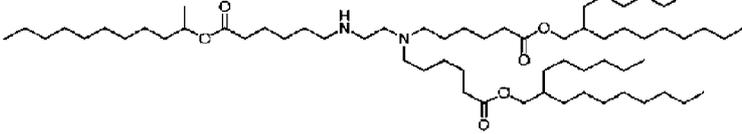
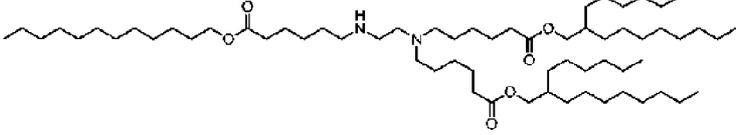
В некоторых вариантах осуществления структур (VIII) R1 и R2 и R3 каждый независимо представляет, разветвленный C₆-C₂₄ алкил, а R3 представляет C₁-C₂₄ алкил или C₂-C₂₄ алкенил.

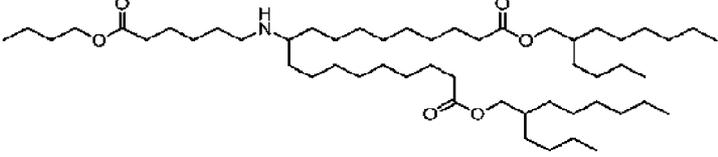
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (VIII) Rb, Rc, Re и Rf каждый независимо представляет C₃-C₁₂ алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления Rb, Rc, Re и Rf представляют n-гексил, а в других вариантах осуществления Rb, Rc, Re и Rf представляют n-октил.

В разных других вариантах осуществления структур (VIII) соединение имеет одну из структур, приведенных в таблице 7 ниже.

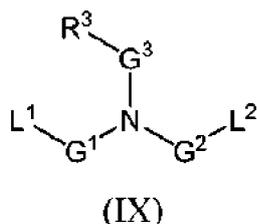
Таблица 7. Типовые катионные липиды структур (VIII)

№	Структура
VIII-1	
VIII-2	

№	Структура
VIII-3	
VIII-4	
VIII-5	
VIII-6	
VIII-7	
VIII-8	
VIII-9	
VIII-10	
VIII-11	

№	Структура
VIII- 12	

В одном варианте осуществления катионный липид представляет соединение, имеющее следующую структуру (IX):



или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или стереоизомер, где:

L1 представляет -O(C=O)R1, -(C=O)OR1, -C(=O)R1, -OR1, -S(O)XR1, -S-SR1, -C(=O)SR1, -SC(=O)R1, -NRaC(=O)R1, -C(=O)NRbRc, -NRaC(=O)NRbRc, -OC(=O)NRbRc или -NRaC(=O)OR1;

L2 представляет -O(C=O)R2, -(C=O)OR2, -C(=O)R2, -OR2, -S(O)XR2, -S-SR2, -C(=O)SR2, -SC(=O)R2, -NRdC(=O)R2, -C(=O)NReRf, -NRdC(=O)NReRf, OC(=O)NReRf, -NRdC(=O)OR2 или прямую связь с R2;

G1 и G2 каждый независимо представляет C2-C12 алкилен или C2-C12 алкенилен;

G3 представляет C₁-C₂₄ алкилен, C₂-C₂₄ алкенилен, C₂-C_x циклоалкилен или C₂-C_x циклоалкенилен;

Ra, Rb, Rd и Re каждый независимо представляет H или C₁-C₁₂ алкил или C₁-C₁₂ алкенил;

Rc и Rf каждый независимо представляет C₁-C₁₂ алкил или C₂-C₁₂ алкенил;

R1 и R2 каждый независимо представляет разветвленный C₆-C₂₄ алкил или разветвленный C₆-C₂₄ алкенил;

R3 представляет -N(R4)R5;

R4 представляет C₁-C₁₂ алкил;

R5 замещенный C₁-C₁₂ алкил; а

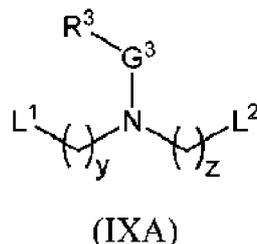
x составляет 0, 1 или 2, и

где каждый алкил, алкенил, алкилен, алкенилен, циклоалкилен, циклоалкенилен, арил и аралкил независимо замещен или незамещен, если не указано иное.

В некоторых вариантах осуществления структур (XI) G³ не замещен. В других конкретных вариантах осуществления G³ представляет C₂-C₁₂ алкилен, например, в некоторых вариантах осуществления G³ представляет C₃-C₇ алкилен или в других вариантах осуществления G¹ представляет C₃-C₁₂ алкилен. В некоторых вариантах

осуществления G³ представляет C₂ или C₃ алкилен.

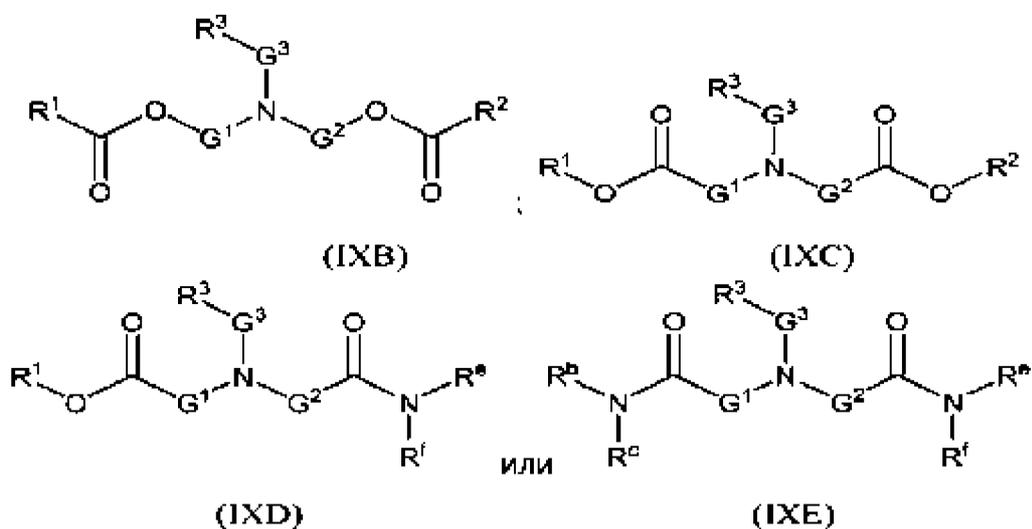
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (IX), соединение имеет следующую структуру (IX A):



где y и z каждый независимо составляет целое число в диапазоне от 2 до 12, например целое число от 2 до 6, от 4 до 10, или например 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления y и z одинаковые, и их выбирают из 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

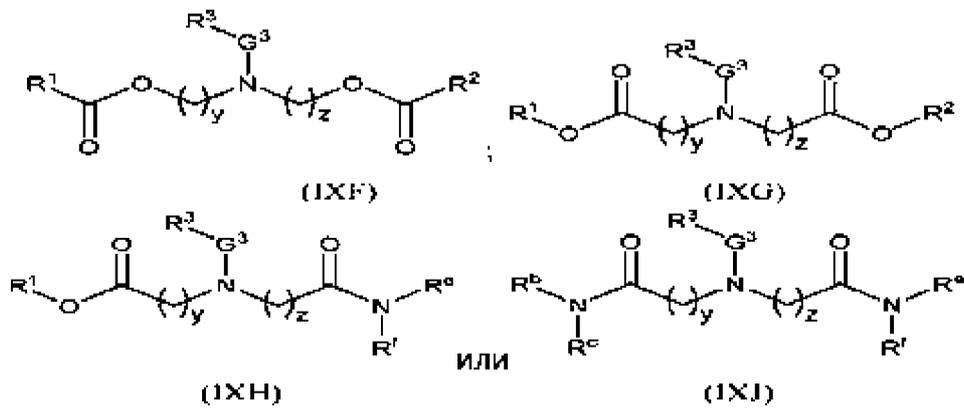
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (IX) L¹ представляет -O(C=O)R₁, -(C=O)OR₁ или -C(=O)NR_bR_c, а L² представляет -O(C=O)R₂, -(C=O)OR₂ или -C(=O)NR_eR_f. Например, в некоторых вариантах осуществления L¹ и L² представляют -(C=O)OR₁ и -(C=O)OR₂, соответственно. В других вариантах осуществления L¹ представляет -(C=O)OR₁, а L² представляет -C(=O)NR_eR_f. В других вариантах осуществления L¹ представляет -C(=O)NR_bR_c, а L² представляет -C(=O)NR_eR_f.

В других вышеуказанных вариантах осуществления соединения имеет одну из следующих структур (IXB), (IXC), (IXD) или (IXE):



В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления соединения имеет структуру (IXB), в других вариантах осуществления соединения имеет структуру (IXC), и в других вариантах осуществления соединения имеет структуру (IXD). В других вариантах осуществления соединения имеет структуру (IXE).

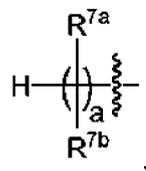
В некоторых различных вышеуказанных вариантах осуществления соединения имеет одну из следующих структур (IXE), (IXG), (IXH) или (IXJ):



где y и z каждый независимо составляет целое число в диапазоне от 2 до 12, например целое число от 2 до 6, например 4.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (IX) y и z каждый независимо составляет целое число в диапазоне от 2 до 10, от 2 до 8, от 4 до 10 или от 4 до 7. Например, в некоторых вариантах осуществления y составляет 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления z составляет 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления y и z одинаковые, тогда как в других вариантах осуществления y и z разные.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (IX) R_1 или R_2 , или оба, представляет разветвленный C_6 - C_{24} алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления R_1 и R_2 каждый независимо имеет следующую структуру:



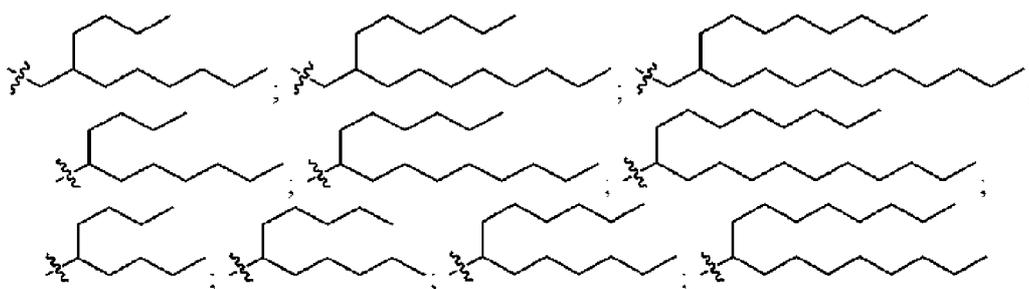
где:

R^{7a} и R^{7b} в каждом случае независимо представляют H или C_1 - C_{12} алкил; и a составляет целое число от 2 до 12,

где R^{7a} , R^{7b} и a каждый выбирают таким образом, что R_1 и R_2 каждый независимо содержит от 6 до 20 атомов углерода. Например, в некоторых вариантах осуществления a составляет целое число в диапазоне от 5 до 9 или от 8 до 12.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (IX) по меньшей мере в одном случае R^{7a} представляет H. Например, в некоторых вариантах осуществления R^{7a} в каждом случае представляет H. В других различных вышеуказанных вариантах осуществления по меньшей мере в одном случае R^{7b} представляет C_1 - C_8 алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил представляет метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, трет-бутил, n-гексил или n-октил.

В различных вариантах осуществления структур (IX) R_1 или R_2 , или тот и другой, имеет одну из следующих структур:



В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (IX) Rb, Rc, Re и Rf каждый независимо представляет C3-C12 алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления Rb, Rc, Re и Rf представляют n-гексил и в других вариантах осуществления Rb, Rc, Re и Rf представляют n-октил.

В любых вышеуказанных вариантах осуществления структур (IX) R4 представляет замещенный или незамещенный: метил, этил, пропил, n-бутил, n-гексил, n-октил или n-нонил. Например, в некоторых вариантах осуществления R4 не замещен. В других R4 замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из -OR^g, -NR^gC(=O)R^h, -C(=O)NR^gR^h, -C(=O)R^h, -OC(=O)R^h, -C(=O)OR^h и -ORⁱOH, где:

R^g в каждом случае независимо представляет H или C1-C6 алкил;

R^h в каждом случае независимо представляет C1-C6 алкил; а

Rⁱ в каждом случае независимо представляет C1-C6 алкилен.

В других вышеуказанных вариантах осуществления структур (IX) R5 представляет замещенный: метил, этил, пропил, n-бутил, n-гексил, n-октил или n-нонил. В некоторых вариантах осуществления R5 представляет замещенный этил или замещенный пропил. В других различных вариантах осуществления R5 представляет замещенный гидроксил. В других вариантах осуществления R5 замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из -OR^g, -NR^gC(=O)R^h, -C(=O)NR^gR^h, -C(=O)R^h, -OC(=O)R^h, -C(=O)OR^h и -ORⁱOH, где:

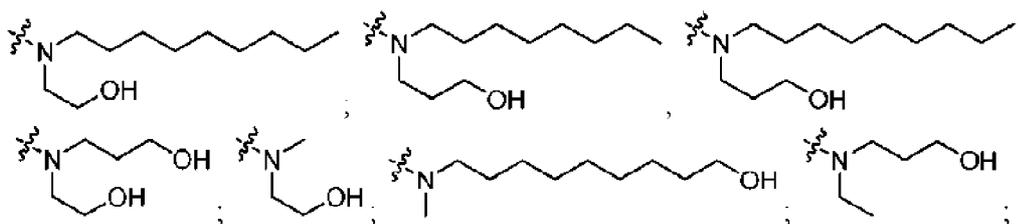
R^g в каждом случае независимо представляет H или C1-C6 алкил;

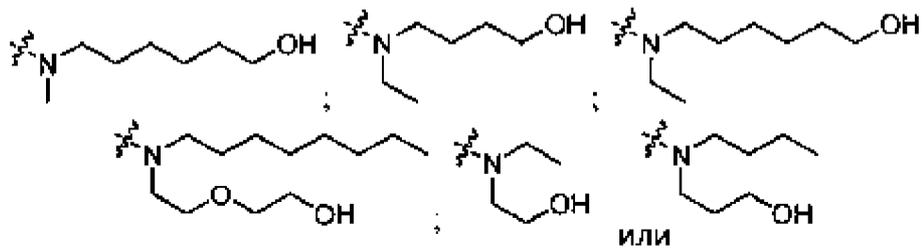
R^h в каждом случае независимо представляет C1-C6 алкил; а

Rⁱ в каждом случае независимо представляет C1-C6 алкилен.

В других вариантах осуществления структур (IX) R4 представляет незамещенный метил, и R5 представляет замещенный: метил, этил, пропил, n-бутил, n-гексил, n-октил или n-нонил. В некоторых этих вариантах осуществления R⁵ замещен на гидроксил.

В некоторых других конкретных вариантах осуществления структур (IX) R3 имеет одну из следующих структур:



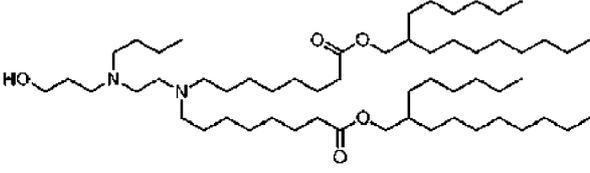


В разных других вариантах осуществления структур (IX) катионный липид имеет одну из структур, приведенных в таблице 8 ниже.

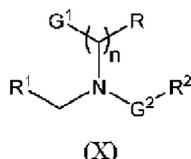
Таблица 8. Типовые катионные липиды структур (IX)

№	Структура
IX-1	
IX-2	
IX-3	
IX-4	
IX-5	
IX-6	

№	Структура
IX-7	
IX-8	
IX-9	
IX-10	
IX-11	
IX-12	
IX-13	
IX-14	
IX-15	
IX-16	
IX-17	

№	Структура
IX-18	

В одном варианте осуществления катионный липид представляет соединение, имеющее следующую структуру (X):



или ее фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

G¹ представляет -OH, -NR³R⁴, -(C=O)NR⁵ или -NR³(C=O)R⁵;

G² представляет -CH₂- или -(C=O)-;

R в каждом случае независимо представляет H или OH;

R¹ и R² каждый независимо представляет разветвленный, насыщенный или ненасыщенный C₁₂-C₃₆ алкил;

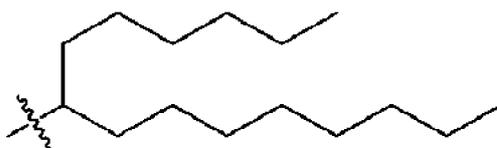
R³ и R⁴ каждый независимо представляет H или прямой или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный C₁-C₆ алкил;

R⁵ представляет прямой или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный C₁-C₆ алкил; и

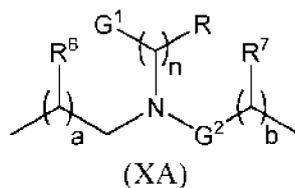
n составляет целое число от 2 до 6.

В некоторых вариантах осуществления R¹ и R² каждый независимо представляет разветвленный, насыщенный или ненасыщенный C₁₂-C₃₀ алкил, C₁₂-C₂₀ алкил, или C₁₅-C₂₀ алкил. В некоторых конкретных вариантах осуществления R¹ и R² каждый насыщенный. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из R¹ и R² ненасыщенный.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (X), R¹ и R² имеют следующую структуру:



В некоторых вышеуказанных вариантах структур (X) соединение имеет следующую структуру (XA):



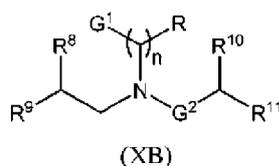
где:

R⁶ и R⁷ в каждом случае независимо представляют Н или прямой или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный С1-С14 алкил;

а и b каждый независимо составляет целое число в диапазоне от 1 до 15,

при условии, что R⁶ и а, и R⁷ и b, каждый независимо выбирают так, что R¹ и R², соответственно, каждый независимо представляет разветвленный, насыщенный или ненасыщенный С12-С36 алкил.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления соединения имеет следующую структуру (XB):



где:

R⁸, R⁹, R¹⁰ и R¹¹ каждый независимо представляет прямой или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный С₄-С₁₂ алкил, при условии, что R⁸ и R⁹, и R¹⁰ и R¹¹, каждый независимо выбирают так, что R¹ и R², соответственно, каждый независимо представляет разветвленный, насыщенный или ненасыщенный С12-С36 алкил. В некоторых вариантах осуществления (XB) R⁸, R⁹, R¹⁰ и R¹¹ каждый независимо представляет прямой или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный С₆-С₁₀ алкил. В некоторых вариантах осуществления (XB) по меньшей мере один из R⁸, R⁹, R¹⁰ и R¹¹ ненасыщенный. В некоторых других конкретных вариантах осуществления (XB) каждый из R⁸, R⁹, R¹⁰ и R¹¹ насыщенный.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления соединения имеет структуру (XA), и в других вариантах осуществления соединения имеет структуру (XB).

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления G¹ представляет -ОН, и в некоторых вариантах осуществления G¹ представляет -NR₃R₄. Например, в некоторых вариантах осуществления G¹ представляет -NH₂, -NHCH₃ или -N(CH₃)₂. В некоторых вариантах осуществления G¹ представляет -(C=O)NR₅. В некоторых других вариантах осуществления G¹ представляет -NR₃(C=O)R₅. Например, в некоторых вариантах осуществления G¹ представляет -NH(C=O)CH₃ или -NH(C=O)CH₂CH₂CH₃.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (X) G²

представляет $-CH_2-$ В некоторых различных вариантах осуществления G2 представляет $-(C=O)-$.

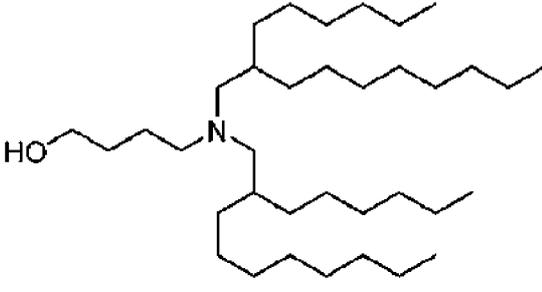
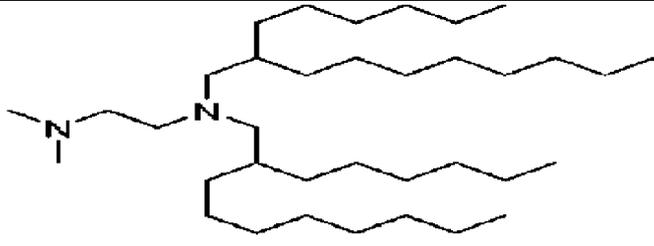
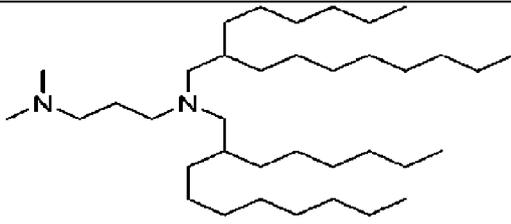
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (X) n составляет целое число в диапазоне от 2 до 6, например, в некоторых вариантах осуществления n составляет 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления n составляет 2. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3. В некоторых вариантах осуществления n составляет 4.

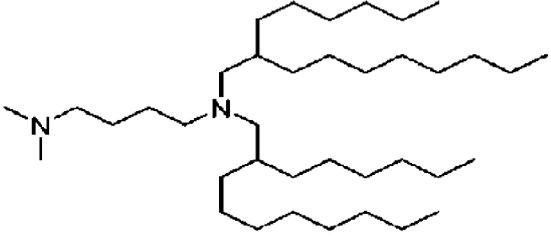
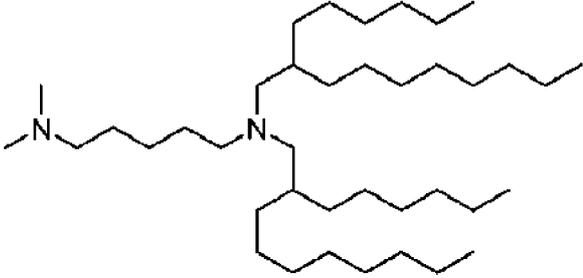
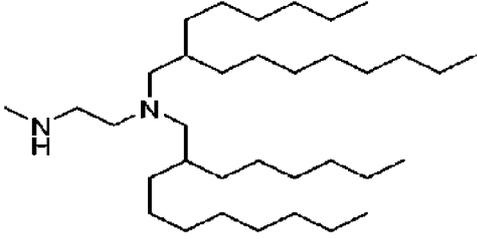
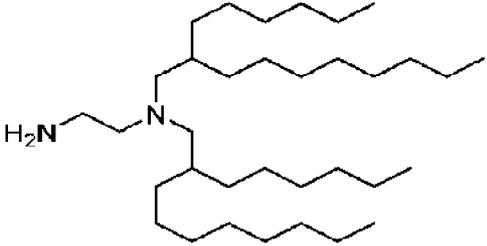
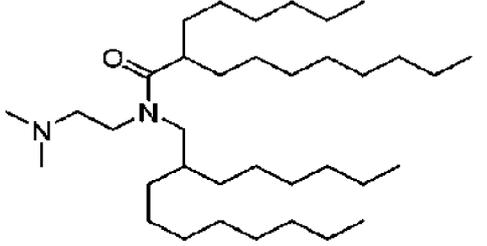
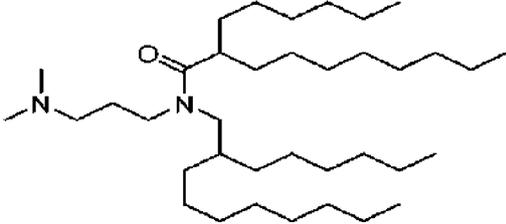
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (X) по меньшей мере один из R1, R2, R3, R4 и R⁵ не замещен. Например, в некоторых вариантах осуществления R1, R2, R3, R4 и R5 каждый не замещен. В некоторых вариантах осуществления R3 замещен. В других вариантах осуществления R4 замещен. В других вариантах осуществления R⁵ замещен. В некоторых конкретных вариантах осуществления каждый из R3 и R4 замещен. В некоторых вариантах осуществления заместитель на R3, R4 или R⁵ представляет гидроксил. В некоторых вариантах осуществления R3 и R4 каждый замещен гидроксилом.

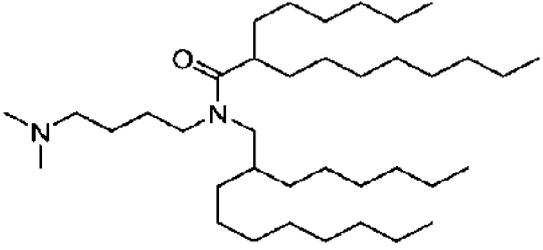
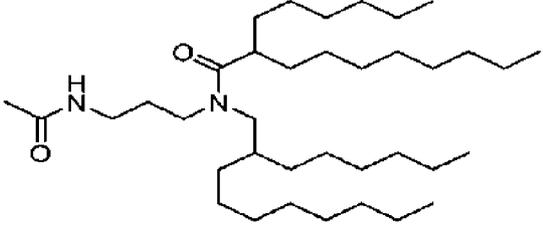
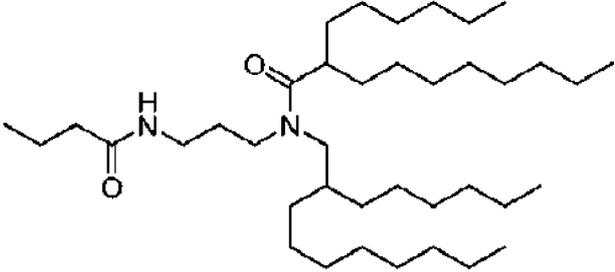
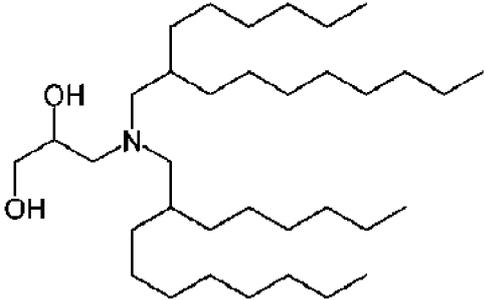
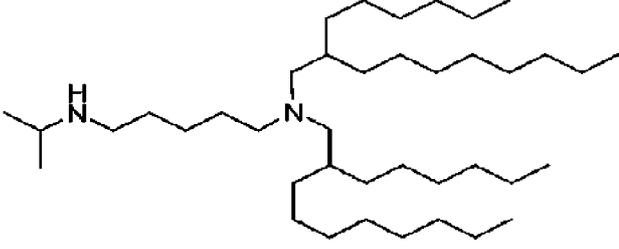
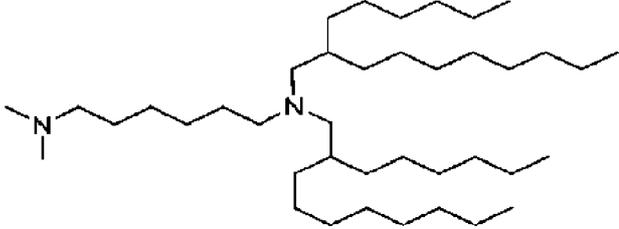
В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления структур (X) по меньшей мере один R представляет OH. В других вариантах осуществления каждый R представляет H.

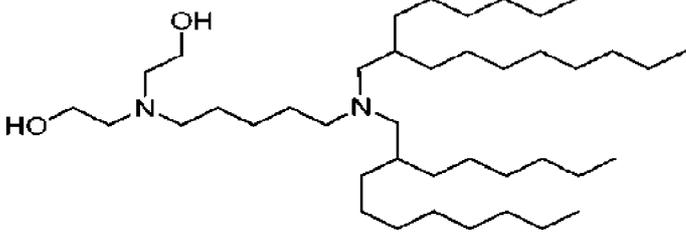
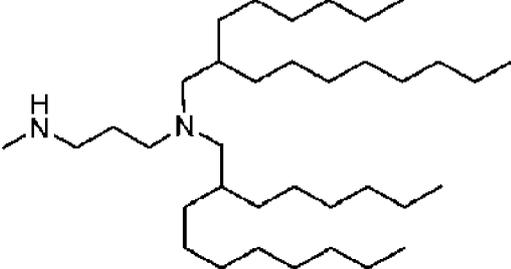
В разных других вариантах осуществления структур (X) соединение имеет одну из структур, приведенных в таблице 9 ниже.

Таблица 9. Типовые катионные липиды структур (X)

№	Структура
X-1	
X-2	
X-3	

№	Структура
X-4	 <chem>CN(C)CCCN(C)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
X-5	 <chem>CN(C)CCCCCN(C)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
X-6	 <chem>CN(C)CCCN(C)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
X-7	 <chem>NCCCN(C)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
X-8	 <chem>CN(C)CCCN(C)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
X-9	 <chem>CN(C)CCCCCN(C)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>

№	Структура
X-10	
X-11	
X-12	
X-13	
X-14	
X-15	

№	Структура
X-16	 <p>The structure shows a central nitrogen atom bonded to a 2-hydroxyethyl group and a long alkyl chain. This nitrogen is also bonded to another nitrogen atom, which is bonded to another long alkyl chain and a 2-hydroxyethyl group.</p>
X-17	 <p>The structure shows a central nitrogen atom bonded to a methyl group and a long alkyl chain. This nitrogen is also bonded to another nitrogen atom, which is bonded to another long alkyl chain and a methyl group.</p>

В любых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 LNP дополнительно содержат нейтральный липид. В различных вариантах осуществления молярное отношение катионного липида к нейтральному липиду колеблется от примерно 2:1 до примерно 8:1. В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид присутствует в любых вышеуказанных LNP в концентрации в диапазоне от 5 до 10 моль-процентов, от 5 до 15 моль-процентов, от 7 до 13 моль-процентов или от 9 до 11 моль-процентов. В некоторых конкретных вариантах осуществления нейтральный липид присутствует в концентрации примерно 9,5, 10 или 10,5 моль-процентов. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение катионного липида к нейтральному липиду колеблется от примерно 4,1:1,0 до примерно 4,9:1,0, от примерно 4,5:1,0 до примерно 4,8:1,0, или от примерно 4,7:1,0 до 4,8:1,0. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение общего катионного липида к нейтральному липиду колеблется от примерно 4,1:1,0 до примерно 4,9:1,0, от примерно 4,5:1,0 до примерно 4,8:1,0, или от примерно 4,7:1,0 до 4,8:1,0.

Иллюстративные нейтральные липиды для использования в любых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 включают, например, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоил-фосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоил-фосфатидилэтанолламин (POPE) и диолеоил-фосфатидилэтанолламин 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-мал), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-O-монометил PE, 16-O-диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеариоил-2-олеоилфосфатидилэтанолламин (SOPE) и 1,2-дистеариоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (трансDOPE). В одном варианте осуществления нейтральный липид представляет 1,2-дистеариоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DSPC). В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид выбирают из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC,

POPC, DOPE и SM. В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид представляет DSPC.

В различных версиях вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 любые из раскрытых липидных наночастиц содержат стероид или аналог стероида. В некоторых вариантах осуществления стероид или аналог стероида представляет холестерин. В некоторых вариантах осуществления стероид присутствует в концентрации в диапазоне от 39 до 49 моль-процентов, от 40 до 46 моль-процентов, от 40 до 44 моль-процентов, от 40 до 42 моль-процентов, от 42 до 44 моль-процентов или от 44 до 46 моль-процентов. В некоторых конкретных вариантах осуществления стероид присутствует в концентрации 40, 41, 42, 43, 44, 45 или 46 моль-процентов.

В некоторых вариантах осуществления молярное отношение катионного липида к стероиду колеблется от 1,0:0,9 до 1,0:1,2, или от 1,0:1,0 до 1,0:1,2. В некоторых этих вариантах осуществления молярное отношение катионного липида к холестерину колеблется от примерно 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления стероид присутствует в концентрации в диапазоне 32 до 40 моль-процентов стероида.

В некоторых вариантах осуществления молярное отношение общего катионного липида к стероиду колеблется от 1,0:0,9 до 1,0:1,2, или от 1,0:1,0 до 1,0:1,2. В некоторых этих вариантах осуществления молярное отношение общего катионного липида к холестерину колеблется от примерно 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления стероид присутствует в концентрации в диапазоне от 32 до 40 моль-процентов стероида.

В некоторых версиях вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 LNP дополнительно содержат конъюгированный с полимером липид. В других различных версиях вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 конъюгированный с полимером липид представляет пегилированный липид. Например, некоторые варианты осуществления включают пегилированный диацилглицерин (PEG-DAG) например 1-(монометоксиполиэтиленглицерин)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG), пегилированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), PEG сукцинатдиацилглицерин (PEG-S-DAG), например 4-O-(2',3'-ди(тетрадеканокси)пропил-1-O-(ω -метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG), пегилированный церамид (PEG-Cer) или PEG диалкоксипропилкарбамат например ω -метокси(полиэтокси)этил-N-(2,3-ди(тетрадеканокси)пропил)карбамат или 2,3-ди(тетрадеканокси)пропил-N-(ω -метокси(полиэтокси)этил)карбамат.

В различных вариантах осуществления конъюгированный с полимером липид присутствует в концентрации в диапазоне 1,0 до 2,5 моль-процентов. В некоторых конкретных вариантах осуществления конъюгированный с полимером липид присутствует в концентрации примерно 1,7 моль-процентов.

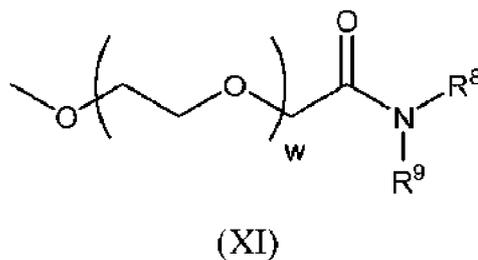
В некоторых вариантах осуществления конъюгированный с полимером липид присутствует в концентрации примерно 1,5 моль-процентов.

В некоторых вариантах осуществления молярное отношение катионного липида к конъюгированному с полимером липиду колеблется от примерно 35:1 до примерно 25:1. В

некоторых вариантах осуществления молярное отношение катионного липида к конъюгированному с полимером липиду колеблется от примерно 100:1 до примерно 20:1.

В некоторых вариантах осуществления молярное отношение общего катионного липида (например сумма первого и второго катионного липида) к конъюгированному с полимером липиду колеблется от примерно 35:1 до примерно 25:1. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение общего катионного липида к конъюгированному с полимером липиду колеблется от примерно 100:1 до примерно 20:1.

В некоторых версиях вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 пегилированный липид, при наличии, имеет следующую формулу (XI):



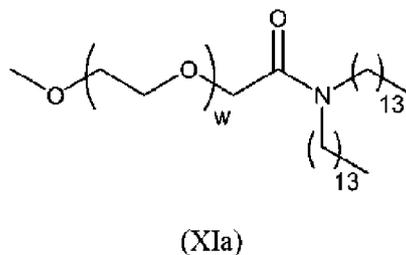
или его фармацевтически приемлемую соль, таутомер или стереоизомер, где:

R12 и R13 каждый независимо представляет прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую от 10 до 30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и

w имеет основное значение в диапазоне от 30 до 60.

В некоторых вариантах осуществления R12 и R13 каждый независимо представляет прямую, насыщенную алкильную цепь, содержащую от 12 до 16 атомов углерода. В других вариантах осуществления среднее значение w колеблется от 42 до 55, например, среднее значение w составляет 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55. В некоторых конкретных вариантах осуществления среднее значение w составляет примерно 49.

В некоторых вариантах осуществления пегилированный липид имеет следующую формулу (XIa):



где среднее значение w составляет примерно 49.

В некоторых версиях вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеиновую кислоту выбирают из антисмысловой и информационной РНК. Например, информационную РНК можно использовать, чтобы вызывать иммунную реакцию (например в качестве вакцины),

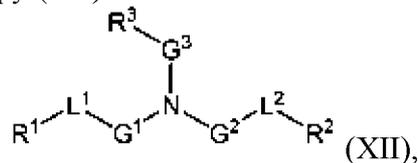
например за счет трансляции иммуногенных белков.

В других версиях вариантов осуществления 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеиновой кислотой является мРНК, и отношение мРНК к липиду в LNP (например N/P, где N представляет моли катионного липида и P представляет моли фосфата, представлено в виде части нуклеиновой кислоты).

[0414] В одном варианте осуществления переносчик содержит липид или ионизируемый липид, описанный в публикации патента США № 20190314524.

[0415] В некоторых вариантах осуществления согласно настоящему изобретению представлены композиции с нуклеиновыми кислотами и липидными наночастицами, содержащие один или несколько новых катионных липидов, описанных в данном документе, в виде структур, перечисленных в таблице 10, которые обеспечивают повышенную активность нуклеиновой кислоты и улучшенную переносимость композиций *in vivo*.

[0416] В одном варианте осуществления ионизируемый липид имеет следующую структуру (XII):



или фармацевтически приемлемую соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где:

один из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$, или $-NR^aC(=O)O-$ а другой из L^1 или L^2 представляет $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$, или $-NR^aC(=O)O-$, или прямую связь;

G^1 и G^2 каждый независимо представляет незамещенный C_1-C_{12} алкилен или C_1-C_{12} алкенилен;

G^3 представляет C_1-C_{24} алкилен, C_1-C_{24} алкенилен, C_3-C_8 циклоалкилен, C_3-C_8 циклоалкенилен;

R^a представляет H или C_1-C_{12} алкил;

R^1 и R^2 каждый независимо представляет C_6-C_{24} алкил или C_6-C_{24} алкенил;

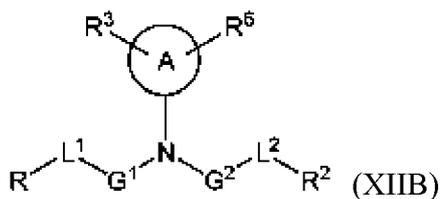
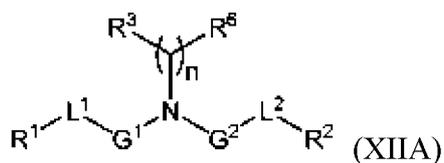
R^3 представляет H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ или $-NR^5C(=O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1-C_{12} алкил;

R^5 представляет H или C_1-C_6 алкил; и

x составляет 0, 1 или 2.

[0417] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет одну из следующих структур (XIIA) или (XII B):

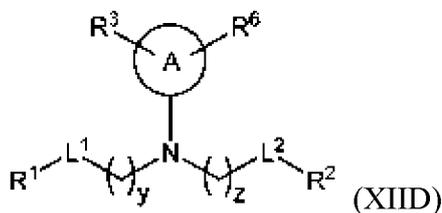
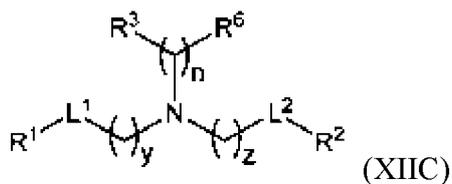


где:

A представляет собой 3-8-членный циклоалкильное или циклоалкиленовое кольцо; R⁶ в каждом случае независимо представляет H, OH или C₁-C₂₄ алкил; и n является целым числом в диапазоне от 1 до 15.

[0418] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет структуру (XIIA), а в других вариантах осуществления ионизируемый липид имеет структуру (XIIB).

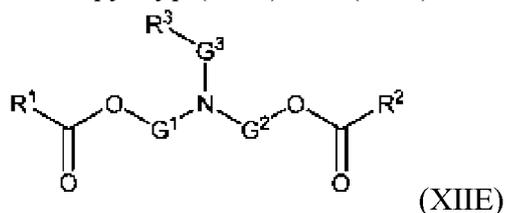
[0419] В других вариантах осуществления ионизируемый липид имеет одну из следующих структур (XIIIC) или (XIID):

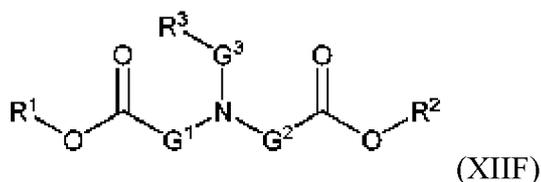


где y и z каждый независимо представляет целые числа в диапазоне от 1 до 12.

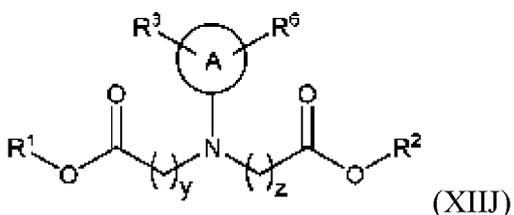
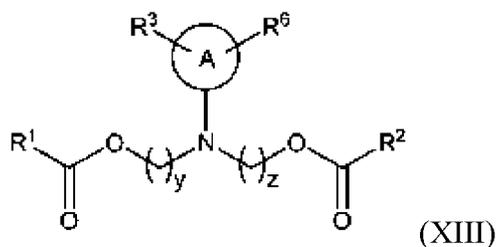
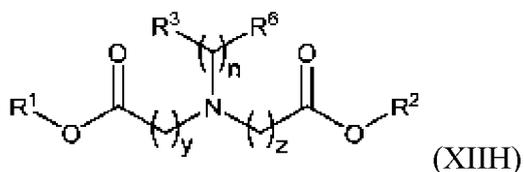
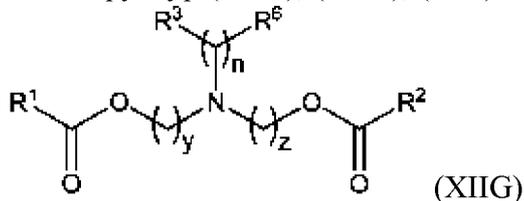
[0420] В некоторых вариантах осуществления один из L¹ или L² представляет -O(C=O)-. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L¹ или L² представляет -O(C=O)-. В некоторых разных вариантах осуществления любого из вышеперечисленного L¹ или L² каждый независимо представляет -(C=O)O-, или -O(C=O)-. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L¹ или L² представляет -(C=O)O-.

[0421] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет одну из следующих структур (XIIIE) или (XIIIF):





[0422] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет одну из следующих структур (XIIG), (XIIN), (XIII) или (XIIIJ):



[0423] В некоторых вариантах осуществления n является целым числом в диапазоне от 2 до 12, например от 2 до 8 или от 2 до 4. Например, в некоторых вариантах осуществления n составляет 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3. В некоторых вариантах осуществления n составляет 4. В некоторых вариантах осуществления n составляет 5. В некоторых вариантах осуществления n составляет 6.

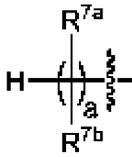
[0424] В некоторых вариантах осуществления y и z каждый независимо представляет целое число в диапазоне от 2 до 10. Например, в некоторых вариантах осуществления y и z каждый независимо представляет целое число в диапазоне от 4 до 9 или от 4 до 6.

[0425] В некоторых вариантах осуществления R^6 представляет H. В других вариантах осуществления R^6 представляет C_1 - C_{24} алкил. В других вариантах осуществления R^6 представляет OH.

[0426] В некоторых вариантах осуществления G^3 является незамещенным. В других вариантах осуществления G^3 является замещенным. Во многих разных вариантах осуществления G^3 представляет линейный C_1 - C_{24} алкилен или линейный C_1 - C_{24} алкенилен.

[0427] В некоторых вариантах осуществления R^1 или R^2 представляет C_6 - C_{24}

алкенил. Например, в некоторых вариантах осуществления R^1 или R^2 каждый независимо имеет следующую структуру:



где:

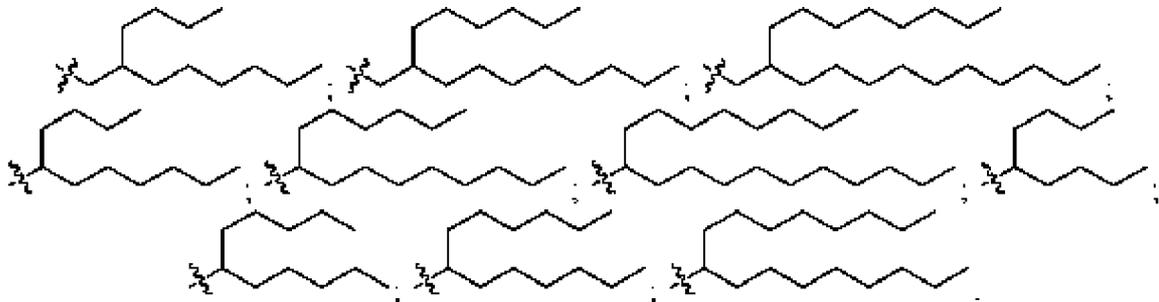
R^{7a} и R^{7b} в каждом случае независимо представляет H или C_1 - C_{12} алкил; и a является целым числом от 2 до 12,

где R^{7a} , R^{7b} и a каждый выбирают так, чтобы R_1 и R_2 каждый независимо содержал 6-20 атомов углерода.

[0428] В некоторых вариантах осуществления a является целым числом в диапазоне от 5 до 9 или от 8 до 12.

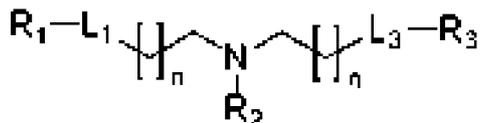
[0429] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере в одном случае R^{7a} представляет H. Например, в некоторых вариантах осуществления R^{7a} представляет H в каждом случае. В других вариантах осуществления по меньшей мере в одном случае R^{7b} представляет C_1 - C_8 алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил представляет метил, этил, n-пропил, изо-пропил, n-бутил, изо-бутил, трет-бутил, n-гексил или n-октил.

[0430] В различных вариантах осуществления R^1 или R^2 , либо и то, и другое, имеет одну из следующих структур:



[0431] В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет -OH, -CN, -C(=O)OR⁴, -OC(=O)R⁴ или -NHC(=O)R⁴. В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой метил или этил.

[0431] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (1):



Формула (1),

где:

каждая n независимо составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15; и

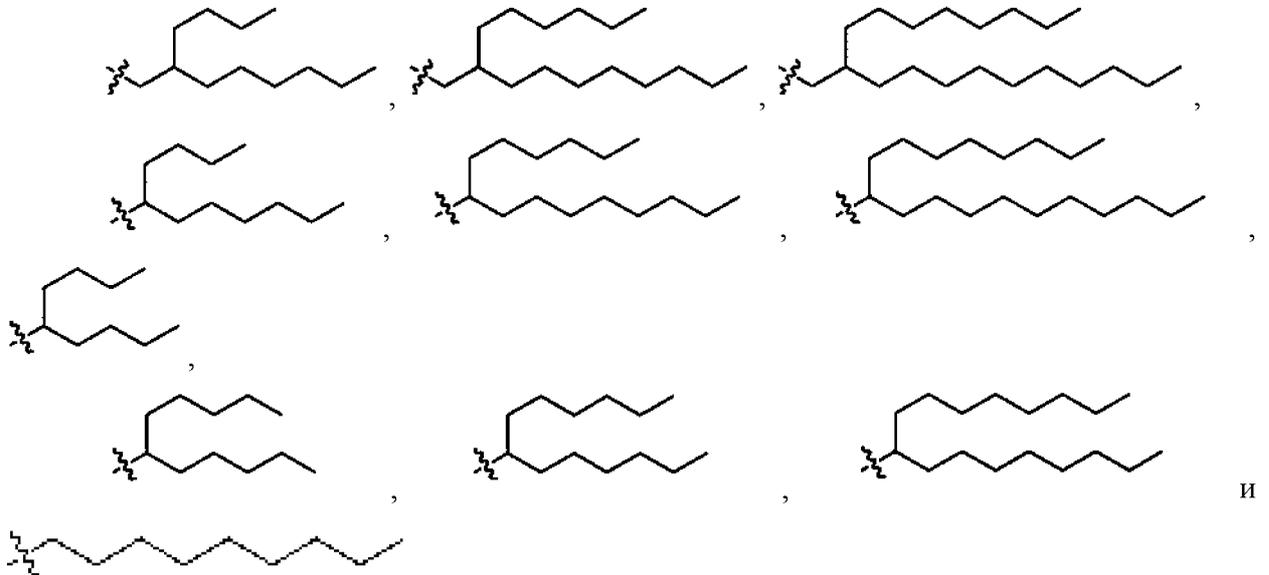
L_1 и L_3 каждый независимо представляет -OC(O)-* или -C(O)O-*, где «*» обозначает

место соединения с R_1 или R_3 ;

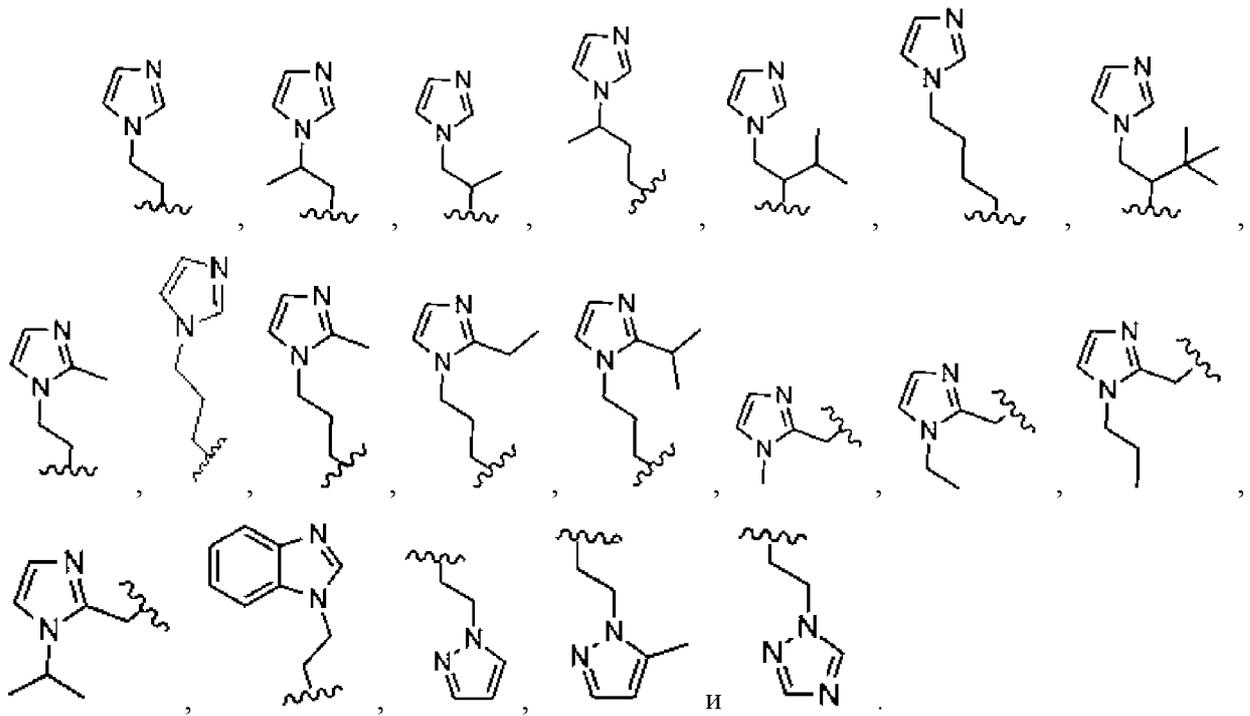
R_1 и R_3 каждый независимо представляет линейный или разветвленный C_9 - C_{20} алкил или C_9 - C_{20} алкенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из оксо, галогена, гидроксигруппы, циано, алкила, алкенила, альдегида, гетероциклического алкила, гидроксильного алкила, дигидроксильного алкила, гидроксильного алкиламиноалкила, аминоалкила, алкиламиноалкила, диалкиламиноалкила, (гетероциклического алкила)(алкила)аминоалкила, гетероциклического алкила, гетероарила, алкилгетероарила, алкинила, алкокси, амина, диалкиламина, аминоалкилкарбониламино, аминокарбонилалкиламино, (аминокарбонилалкила)(алкила)амино, алкенилкарбониламино, гидроксикарбонил, алкилоксикарбонил, аминокарбонил, аминоалкиламинокарбонил, алкиламиноалкиламинокарбонил, диалкиламиноалкиламинокарбонил, гетероциклического алкиламинокарбонил, (алкиламиноалкила)(алкила)аминокарбонил, алкиламиноалкилкарбонил, диалкиламиноалкилкарбонил, гетероциклического алкилкарбонил, алкенилкарбонил, алкинилкарбонил, алкилсульфоксида, алкилсульфоксида алкила, алкилсульфонил и алкилсульфонил алкила.

[0433] В некоторых вариантах осуществления R_1 и R_3 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления R_1 и R_3 разные.

[0434] В некоторых вариантах осуществления R_1 и R_3 каждый независимо представляет разветвленный насыщенный C_9 - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления один из R_1 и R_3 представляет разветвленный насыщенный C_9 - C_{20} алкил, а другой представляет собой неразветвленный насыщенный C_9 - C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления R_1 и R_3 каждый независимо выбирают из группы, состоящей из:

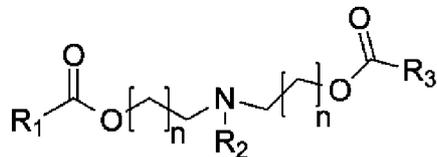


[0435] В различных вариантах осуществления R_2 выбирают из группы, состоящей из:

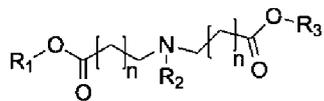


[0436] В некоторых вариантах осуществления R_2 может быть описан в международной патентной публикации № WO2019/152848 A1, которая включена полностью в данный документ посредством ссылки.

[0437] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (1-1) или формулы (1-2):



Формула (1-1)



Формула (1-2)

где n , R_1 , R_2 и R_3 соответствуют определению в формуле (1).

[0438] Способы получения приведенных выше соединений и композиций описаны в данном документе ниже и/или известны в данной области.

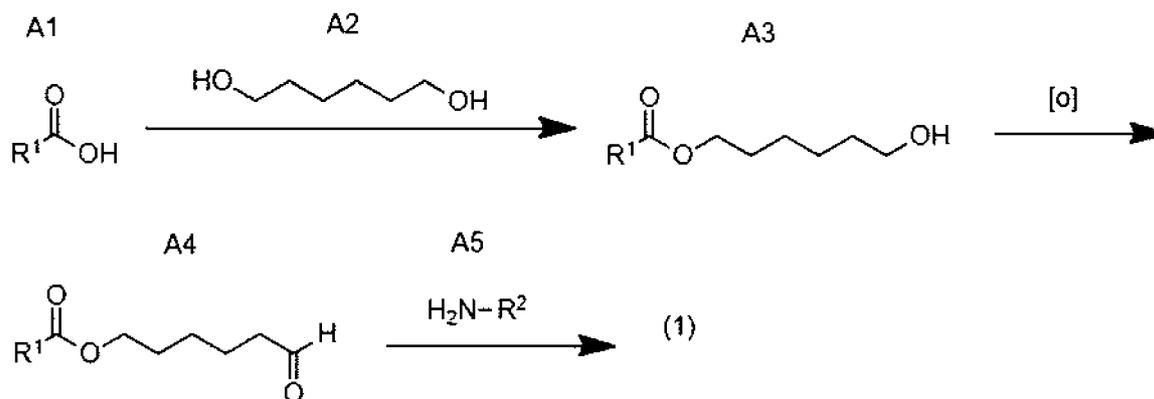
[0439] Специалистам в данной области будет понятно, что в способе, описанном в данном документе, функциональные группы промежуточных соединений может быть нужно защищать подходящими защитными группами. Такие функциональные группы включают, например, гидроксил, amino, меркапто и карбоновую кислоту. Подходящие защитные группы для гидроксила включают, например, триалкилсилил или диарилалкилсилил (например *t*-бутилдиметилсилил, *t*-бутилдифенилсилил или триметилсилил), тетрагидропиранил, бензил и тому подобное. Подходящие защитные

группы для амина, амидино и гуанидино включают, например, *t*-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил и тому подобное. Подходящие защитные группы для меркапто включают, например, $-C(O)-R''$ (где R'' представляет алкил, арил или арилалкил), *p*-метоксибензил, тритил и тому подобное. Подходящие защитные группы для карбоновой кислоты включают, например, алкильные, ариловые или арилалкиловые сложные эфиры. Защитные группы можно добавлять или удалять согласно стандартным методам, известным специалисту в данной области и описанным в данном документе. Использование защитных групп подробно описано, например, в Green, T. W. и P. G. M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3rd Ed., Wiley. Как будет понятно специалисту в данной области, защитной группой также может быть полимерная смола, такая как смола Ванга, смола Ринка или 2-хлортритил-хлоридная смола.

[0440] Специалистам в данной области также будет понятно, что, хотя такие защищенные производные соединений согласно настоящему изобретению могут не обладать фармакологической активностью как таковой, их можно вводить млекопитающему и после этого метаболизировать в организме с образованием соединений согласно изобретению, которые являются фармакологически активными. Таким образом, такие производные могут быть описаны как пролекарства. Все пролекарства соединений согласно данному изобретению включены в объем изобретения.

[0441] Кроме того, все соединения согласно изобретению, которые существуют в форме свободного основания или кислоты, могут быть превращены в их фармацевтически приемлемые соли путем обработки соответствующим неорганическим или органическим основанием или кислотой способами, известными специалистам в данной области. Соли соединений согласно изобретению также могут быть превращены в форму их свободного основания или кислоты стандартными способами.

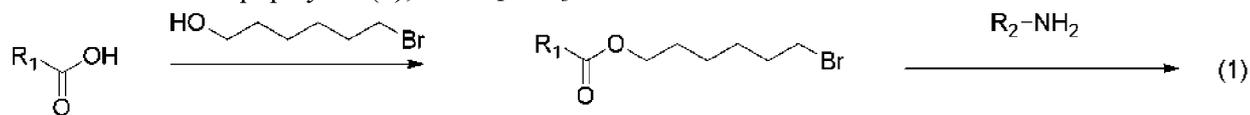
[0442] Следующая схема реакции иллюстрирует типичный способ получения соединений Формулы (1):



A1 покупают или получают согласно способам, известным в данной области. Реакция A1 с диолом A2 в соответствующих условиях конденсации (например DCC) дает сложный эфир/спирт A3, который затем может окисляться (например с PCC) до альдегида A4. Реакция A4 с амином A5 в условиях восстановительного аминирования дает

соединение формулы (1).

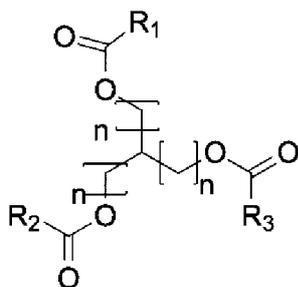
[0443] Следующая схема реакции иллюстрирует второй иллюстративный способ получения соединений формулы (1), где R_1 и R_3 являются одинаковыми:



[0444] Модификации приведенной выше схемы реакции, такие как использование защитных групп, может давать соединения, где R_1 и R_3 разные. Использование защитных групп, а также другие способы модификации, в приведенной выше схеме реакции будет очевидным для рядового специалиста в данной области.

[0445] Понятно, что специалист в данной области может быть в состоянии получать эти соединения аналогичными способами или путем комбинирования других способов, известных специалисту в данной области. также понятно, что специалист в данной области будет в состоянии получать другие соединения формулы (1), конкретно не проиллюстрированные в данном документе, с использованием соответствующих исходных материалов и модификации параметров синтеза. Обычно исходные материалы можно получать из таких источников, как Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI и Fluorochem USA, и так далее, или синтезировать согласно источникам, известным специалистам в данной области (см., например, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th edition (Wiley, December 2000)) или получать, как описано в этом изобретении.

[0446] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (2):



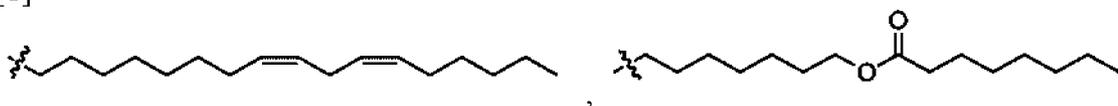
Формула (2),

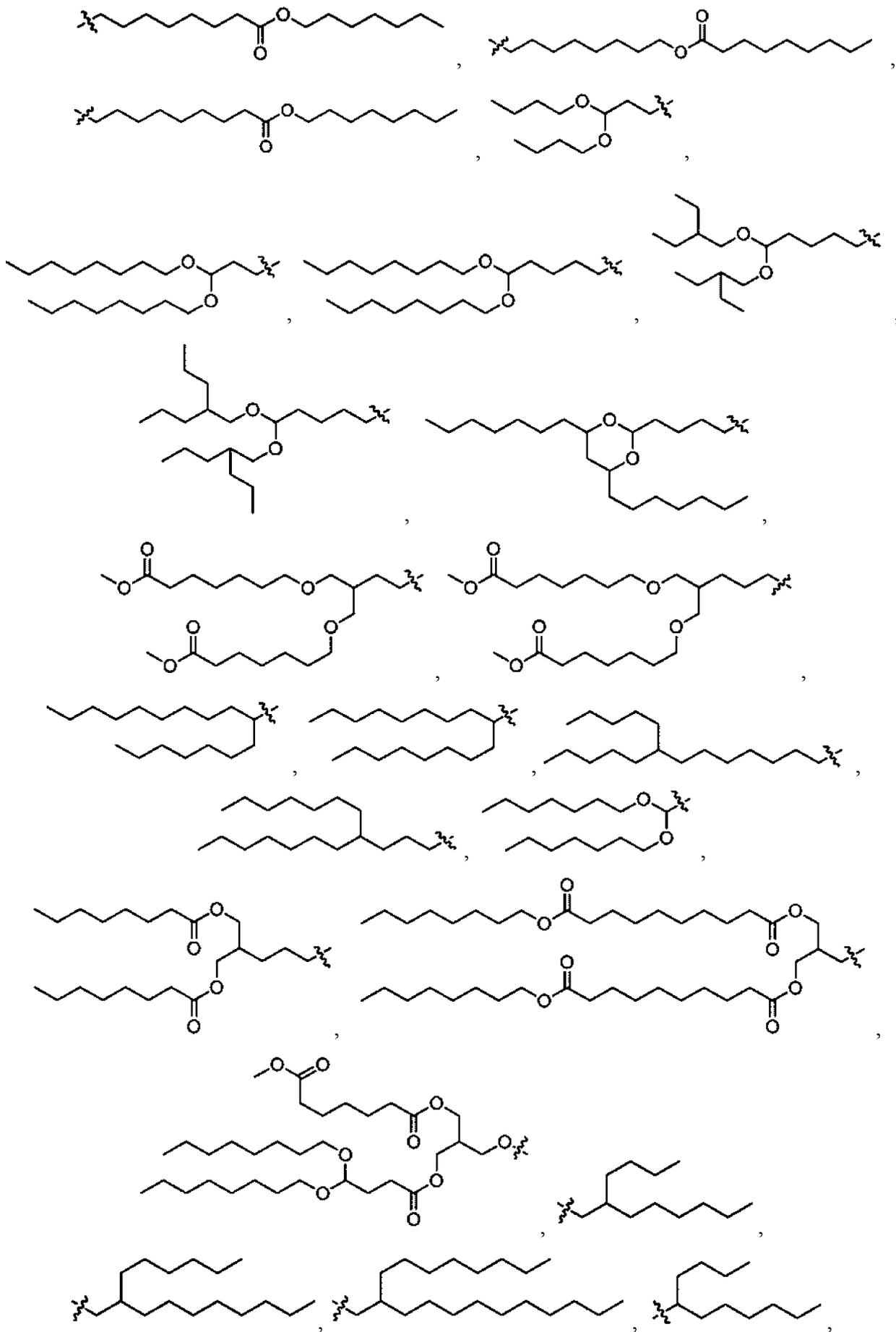
где каждый n независимо составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15.

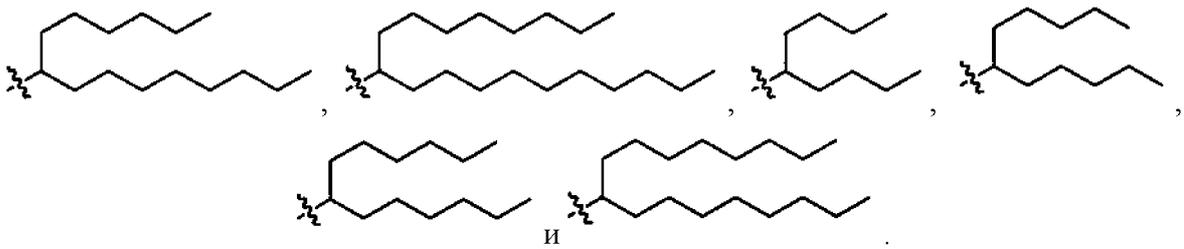
[0447] В некоторых вариантах осуществления, как использовано в формуле (2), R_1 и R_2 соответствуют определению в формуле (1).

[0448] В некоторых вариантах осуществления, как использовано в формуле (2), R_1 и R_2 каждый независимо выбирают из группы, состоящей из:

[1]

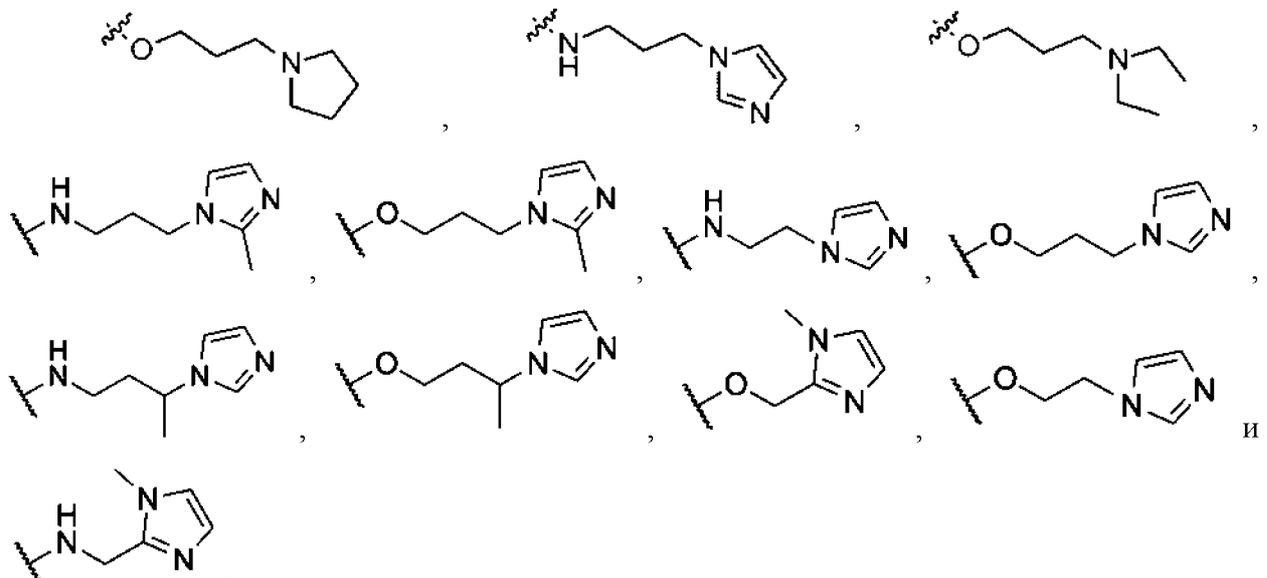




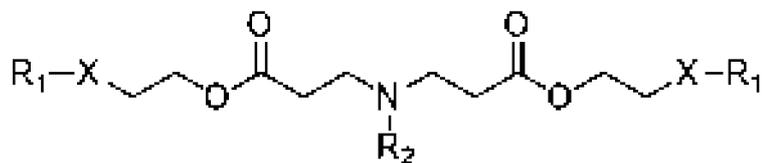


[0449] В некоторых вариантах осуществления R_1 и/или R_2 , используемые в формуле (2), могут быть описаны в международной патентной публикации № WO2015/095340 A1, которая включена полностью в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления R_1 , используемый в формуле (2), может быть описан в международной патентной публикации № WO2019/152557 A1, которая включена полностью в данный документ посредством ссылки.

[0450] В некоторых вариантах осуществления, как использовано в формуле (2), R_3 выбирают из группы, состоящей из:



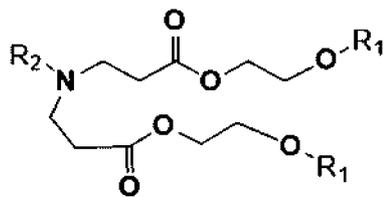
[0451] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (3)



где X выбирают из -O-, -S-

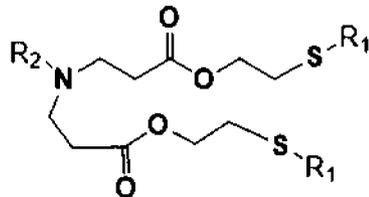
или -OC(O)-*, где * обозначает место соединения с R_1 .

[0452] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (3-1):



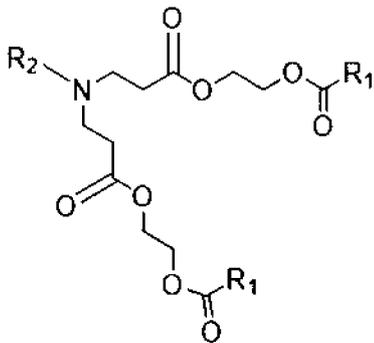
(3-1).

[0453] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (3-2):



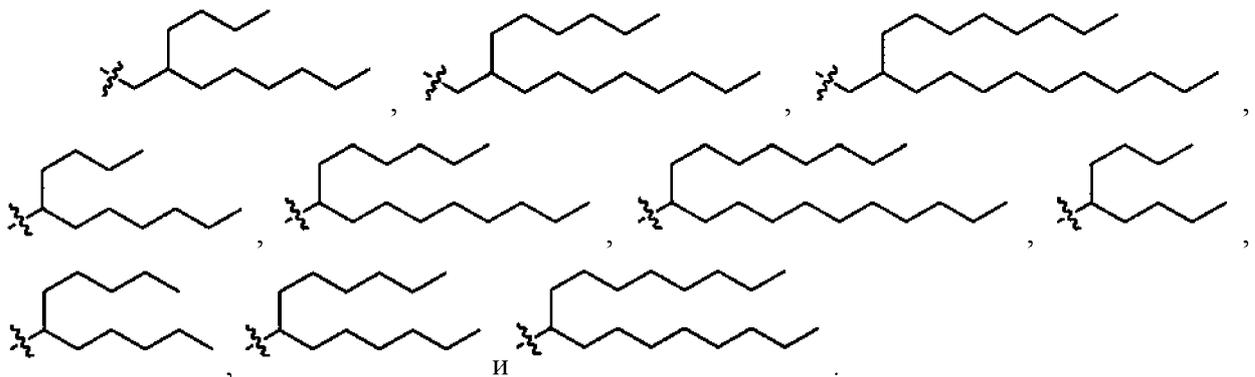
(3-2).

[0454] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (3-3):



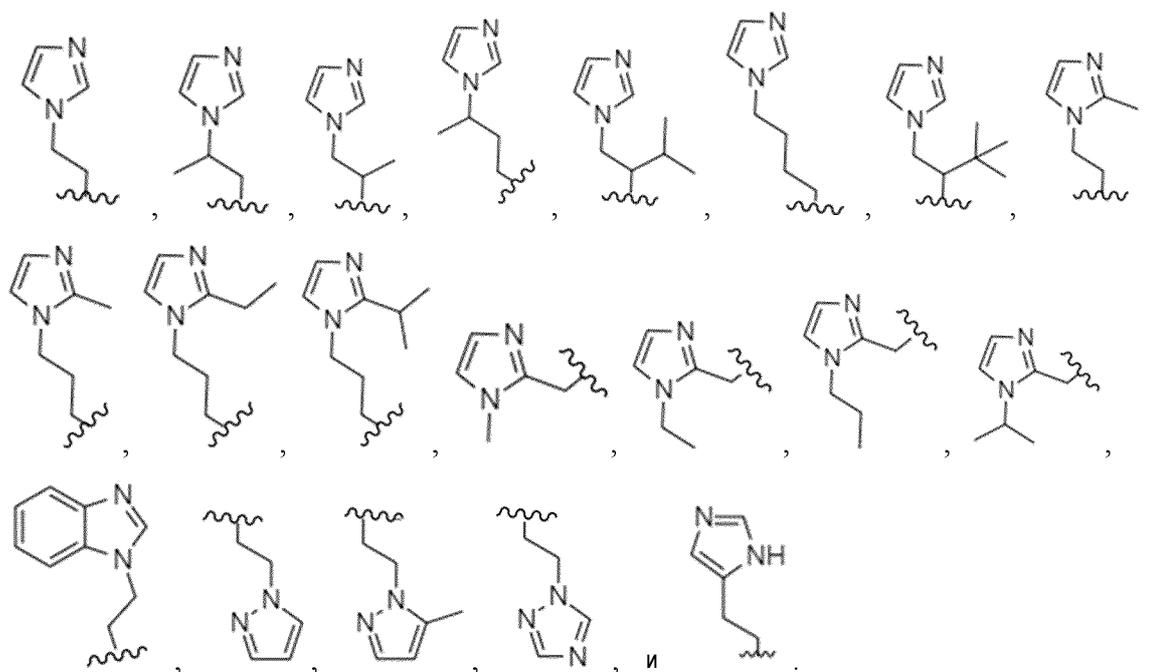
(3-3).

[0455] В некоторых вариантах осуществления, как использовано в формуле (3-1), (3-2) или (3-3), каждый R_1 независимо представляет разветвленный насыщенный C_9-C_{20} алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый R_1 независимо выбирают из группы, состоящей из:



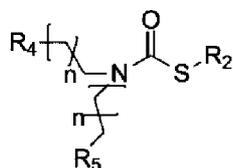
[0456] В некоторых вариантах осуществления каждый R_1 в формуле (3-1), (3-2) или (3-3) являются одинаковыми.

[0457] В некоторых вариантах осуществления, как использовано в формуле (3-1), (3-2) или (3-3), R_2 выбирают из группы, состоящей из:



[0458] В некоторых вариантах осуществления R_2 , используемый в формуле (3-1), (3-2) или (3-3), может быть описан в международной патентной публикации № WO2019/152848A1, которая включена полностью в данный документ посредством ссылки.

[0459] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (5):



(5),

где:

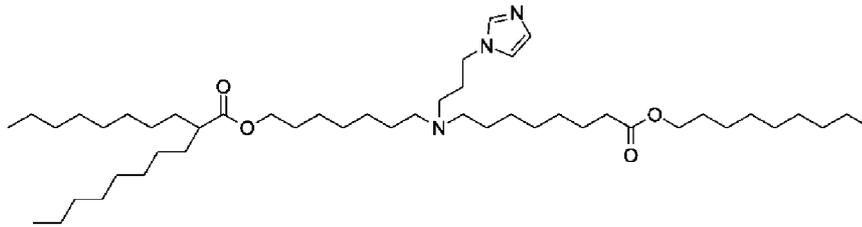
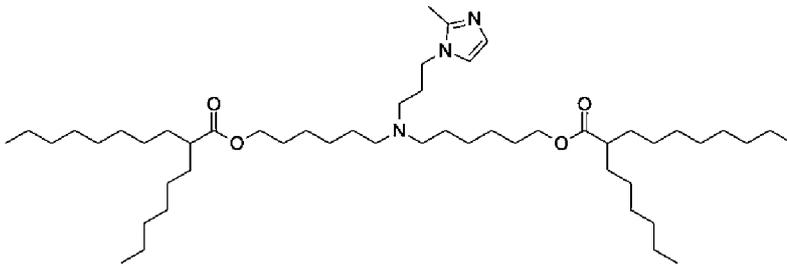
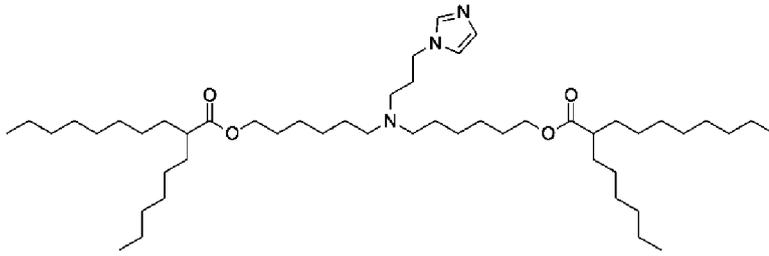
каждый n независимо составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15; и R_2 соответствует определению в формуле (1).

[0460] В некоторых вариантах осуществления, как использовано в формуле (5), R_4 и R_5 определены как R_1 и R_3 , соответственно, в формуле (1). В некоторых вариантах осуществления, как использовано в формуле (5), R_4 и R_5 могут быть описаны в международной патентной публикации № WO2019/191780 A1, которая включена полностью в данный документ посредством ссылки.

[0461] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид согласно раскрытию выбирают из таблицы 10а. В некоторых вариантах осуществления ионизируемым липидом является липид 26 в таблице 10а. В некоторых вариантах осуществления ионизируемым липидом является липид 27 в таблице 10а. В некоторых вариантах осуществления ионизируемым липидом является липид 53 в таблице 10а. В некоторых вариантах осуществления ионизируемым липидом является липид 54 в таблице

10a.

[0462] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид согласно раскрытию выбирают из группы, состоящей из:



И

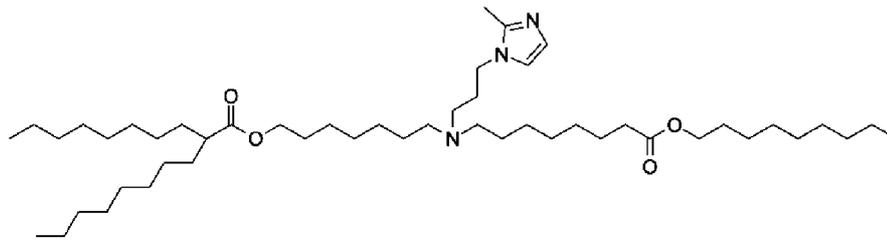
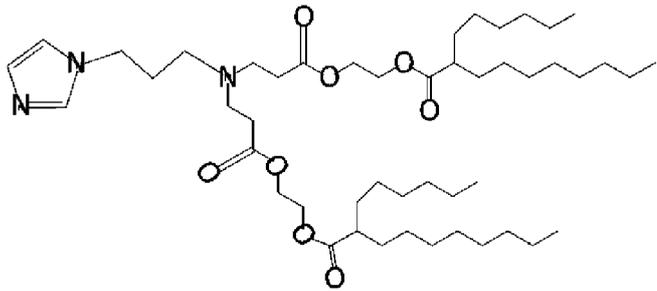
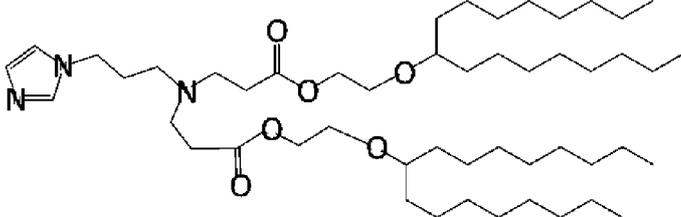
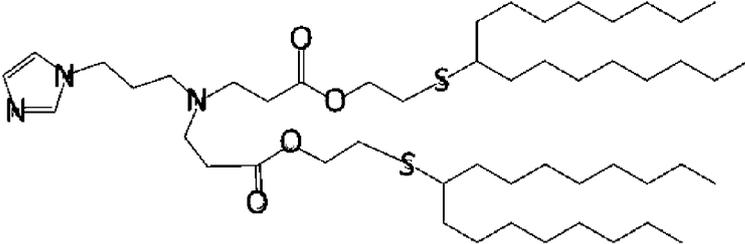
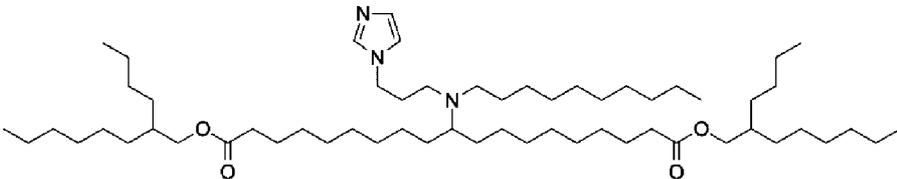
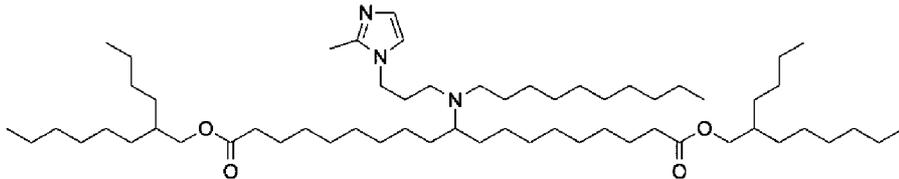
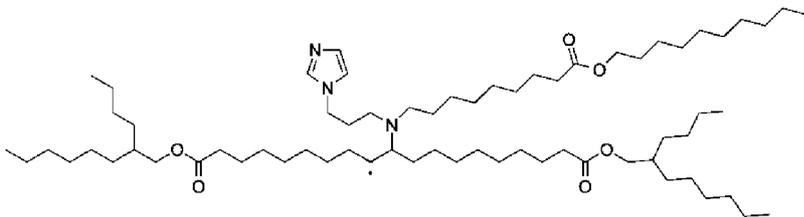
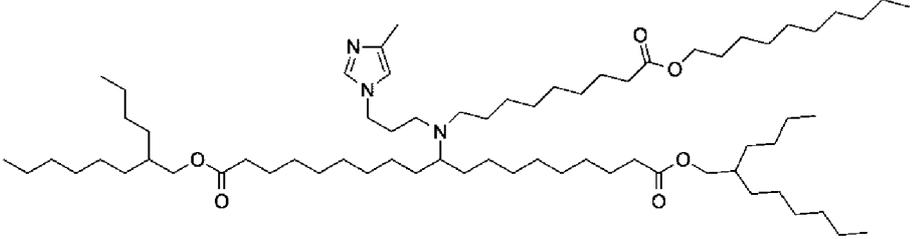
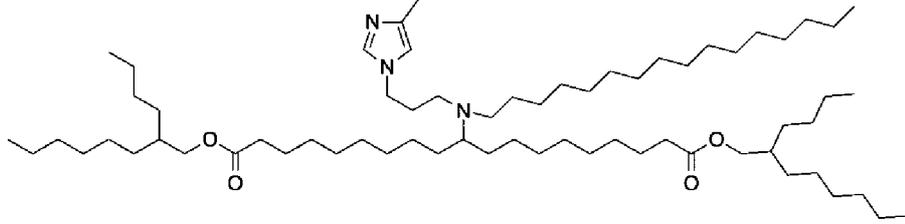
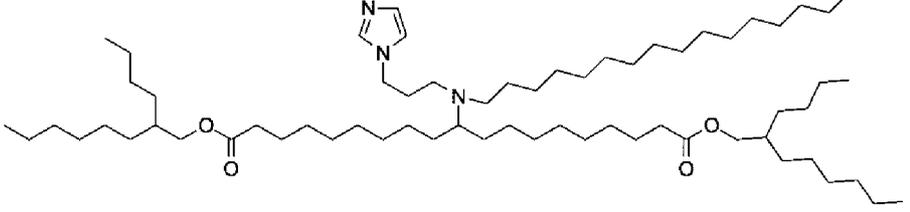
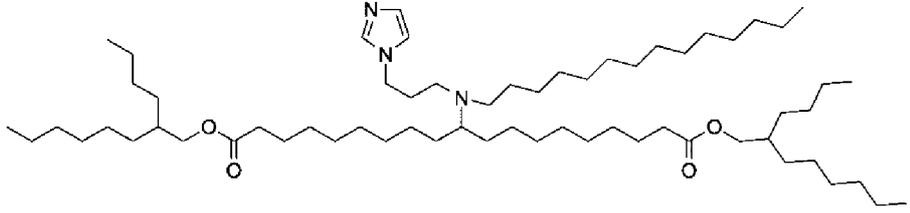
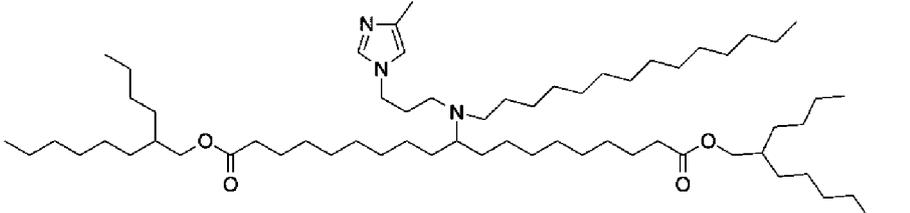
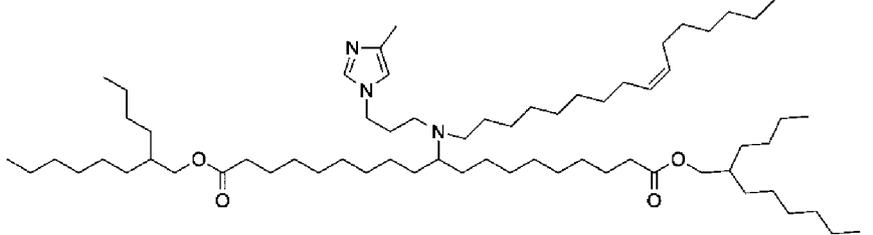
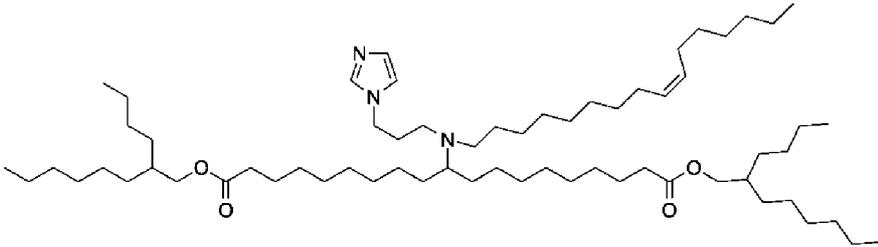
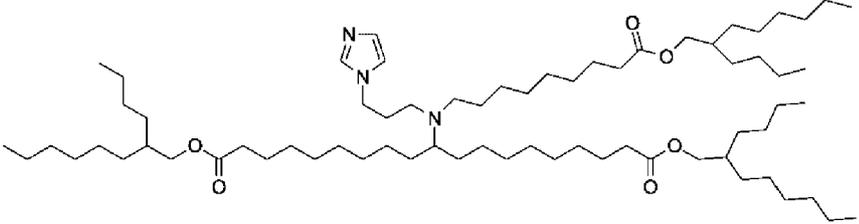
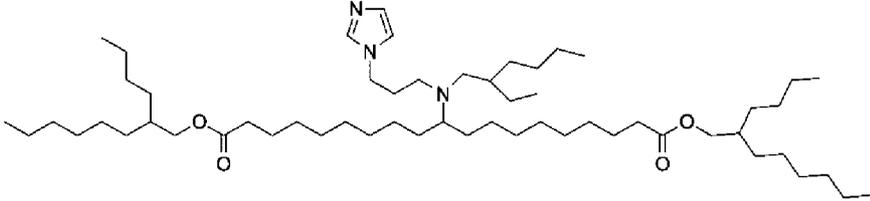
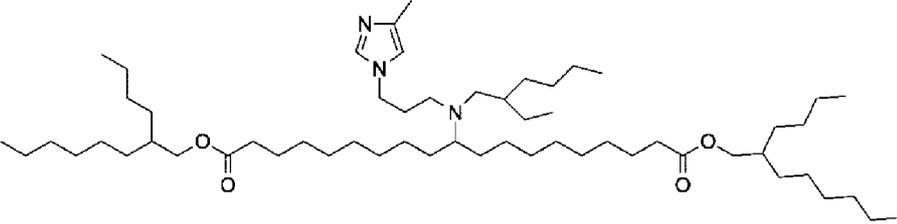
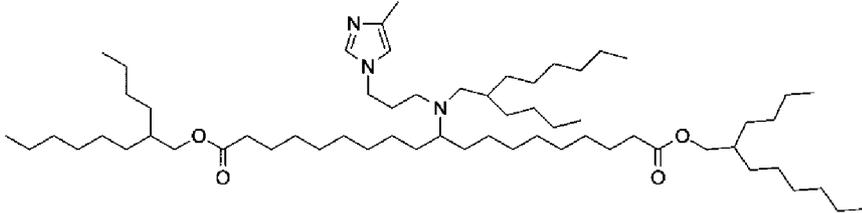
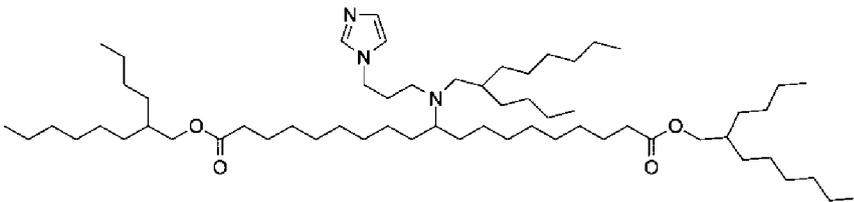


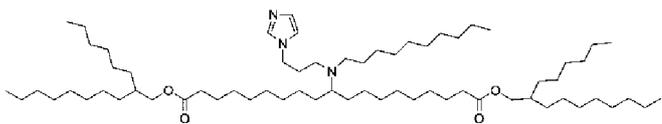
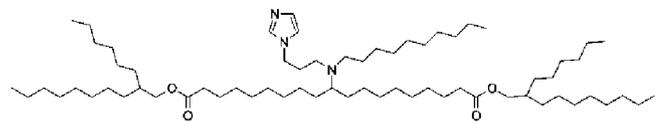
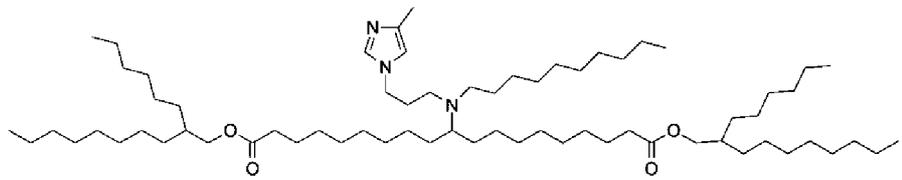
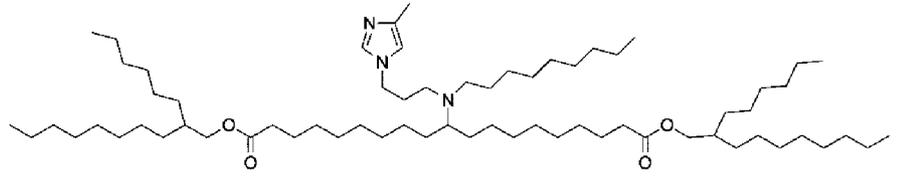
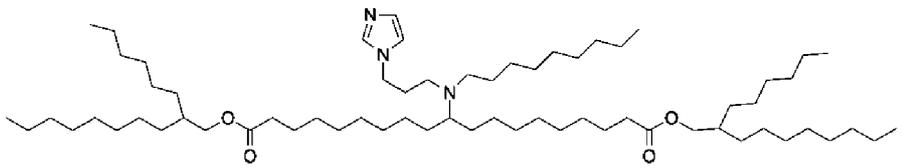
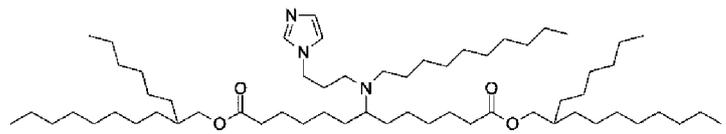
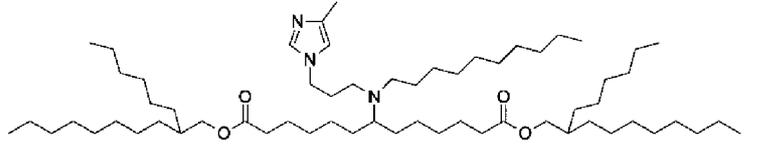
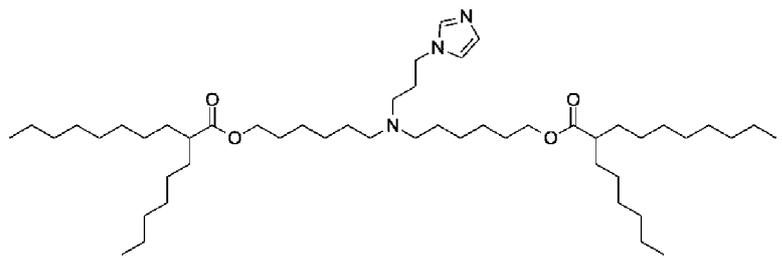
Таблица 10a

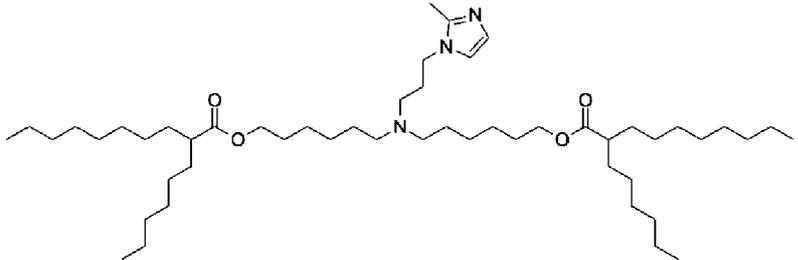
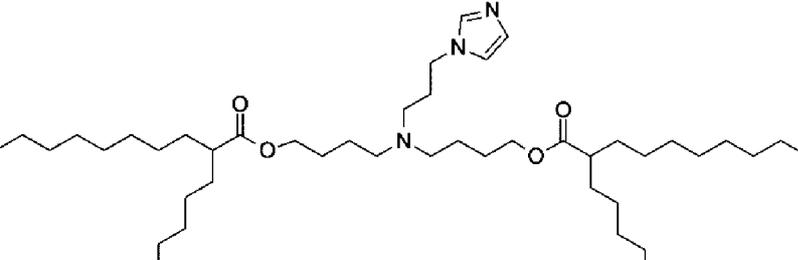
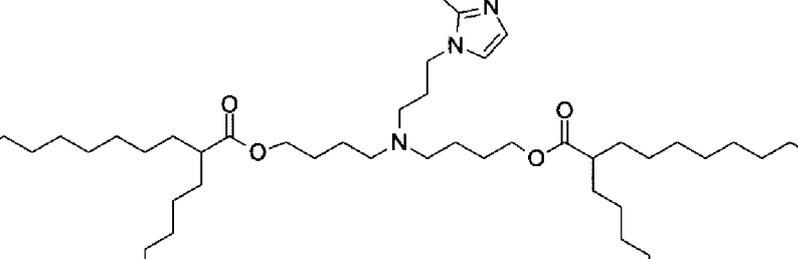
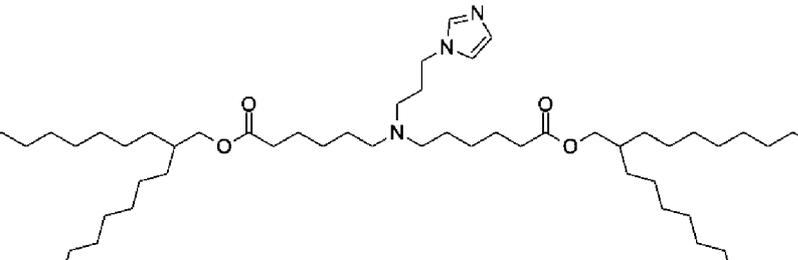
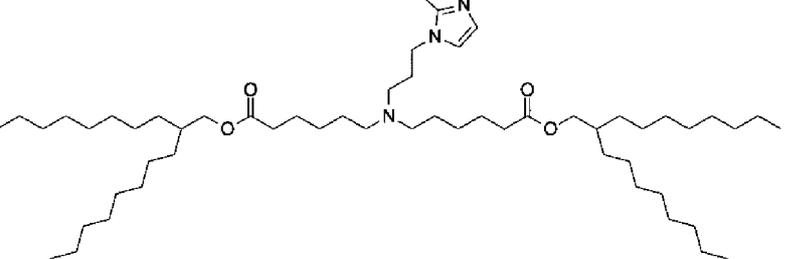
Номер ионизируемого липида	Структура
----------------------------	-----------

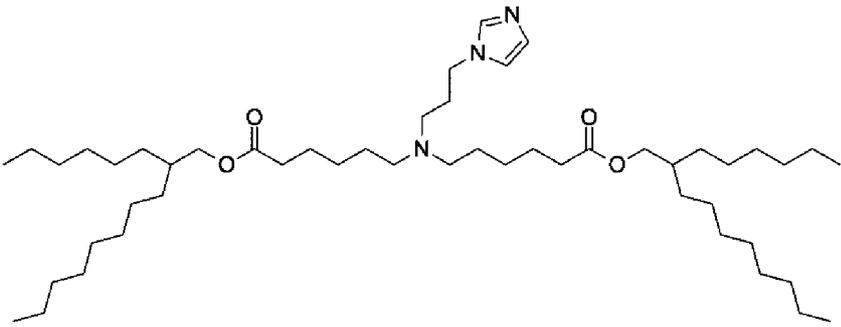
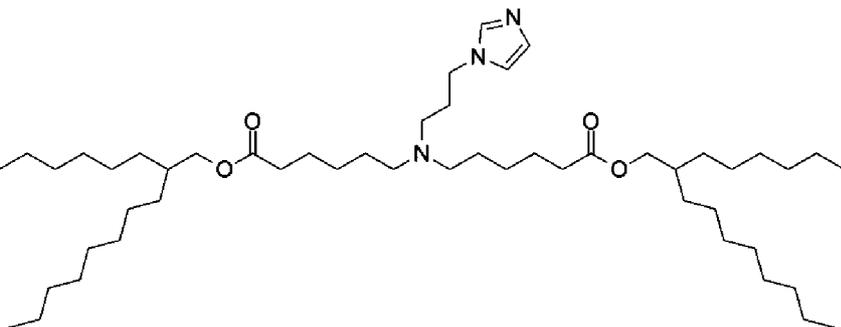
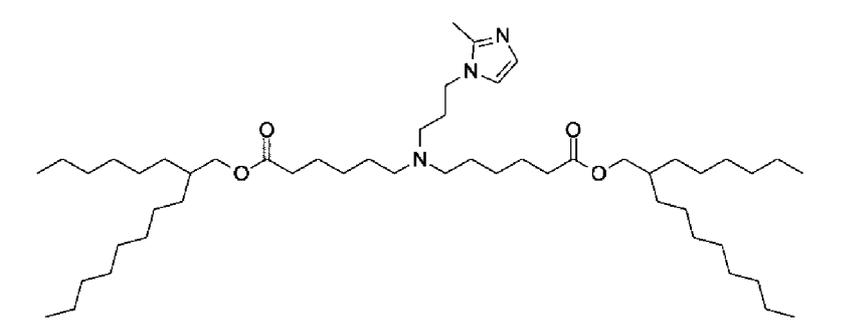
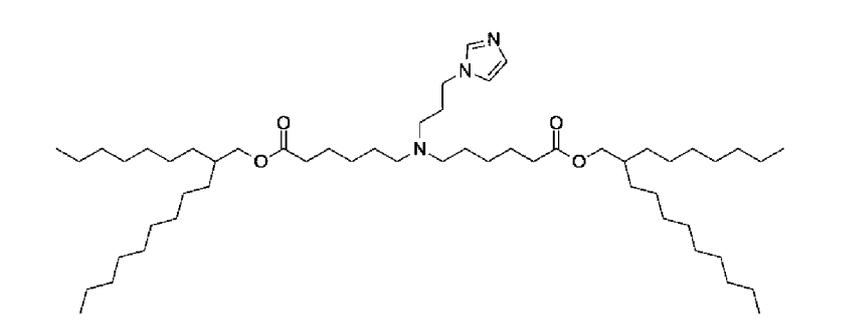
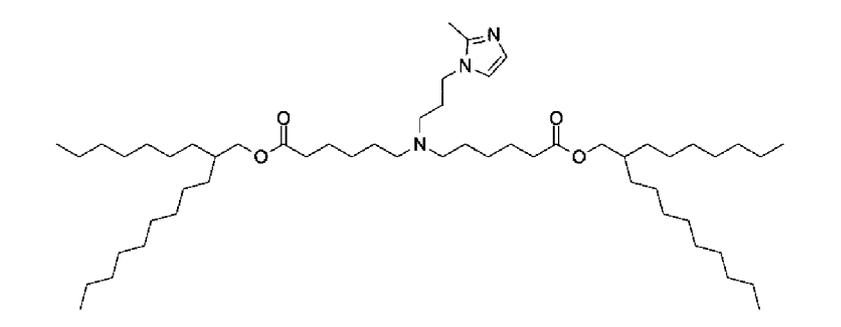
1	
2	
3	
4	
5	
6	

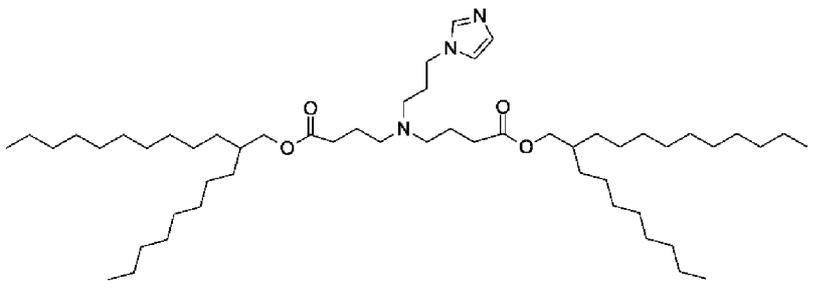
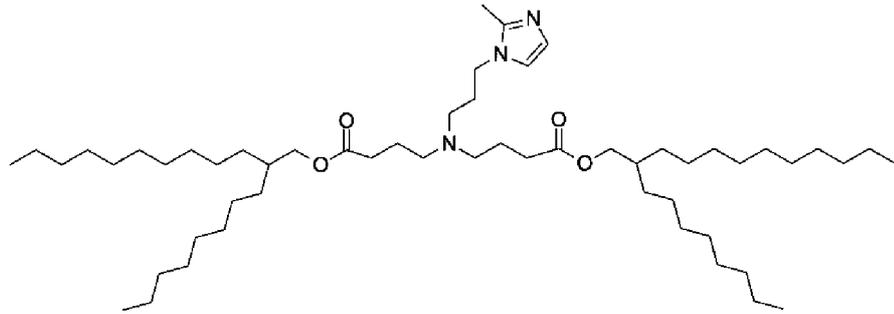
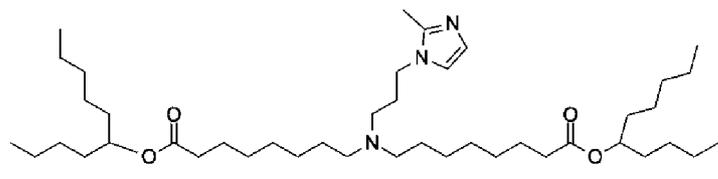
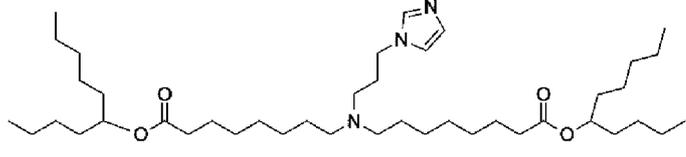
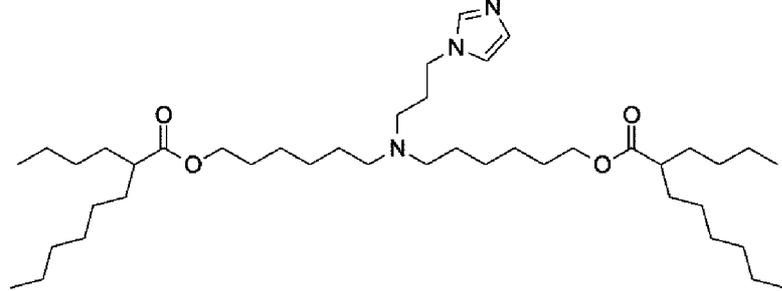
7	
8	
9	
10	
11	
12	

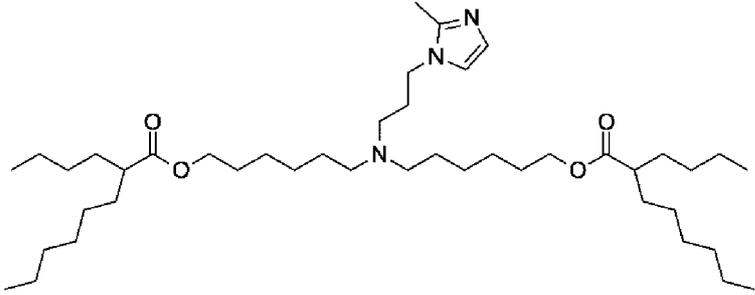
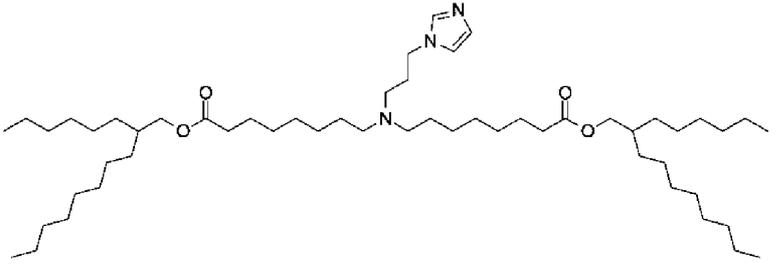
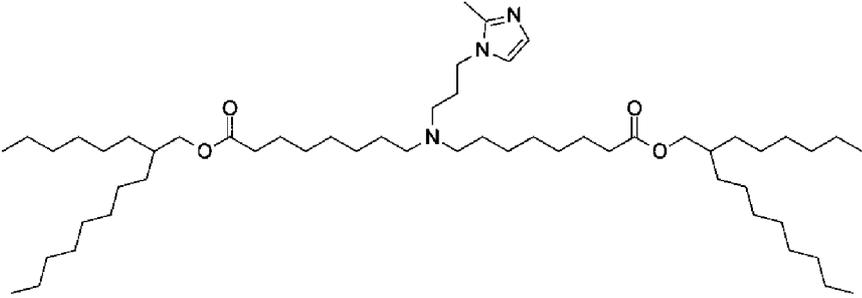
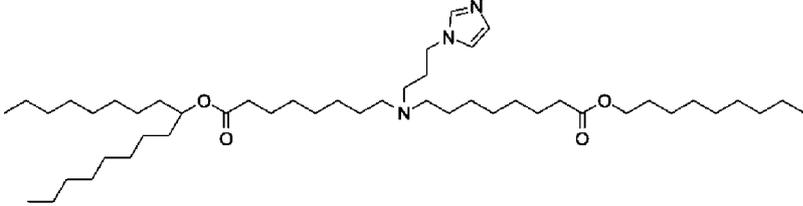
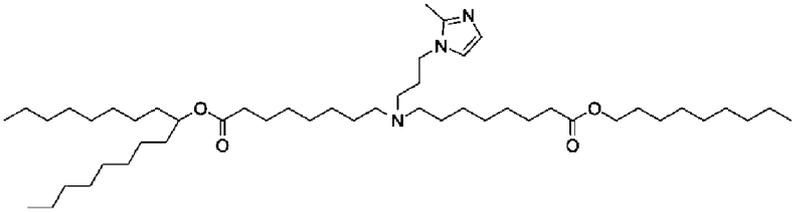
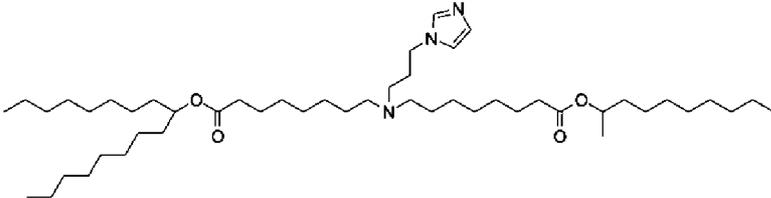
13	
14	
15	
16	
17	
18	

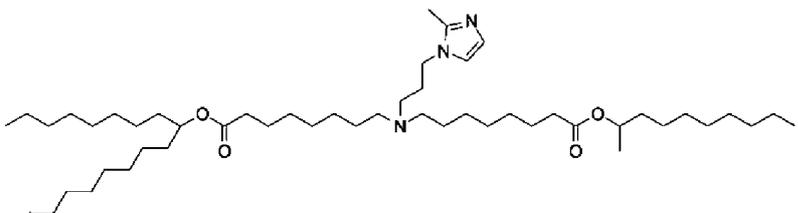
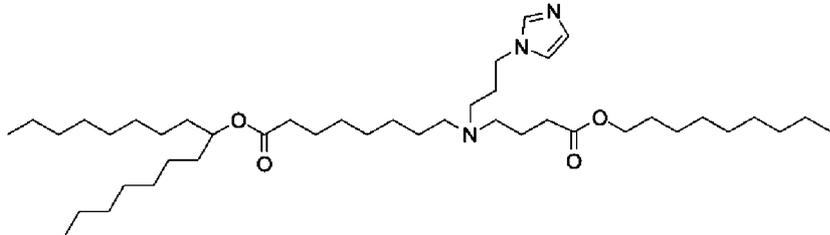
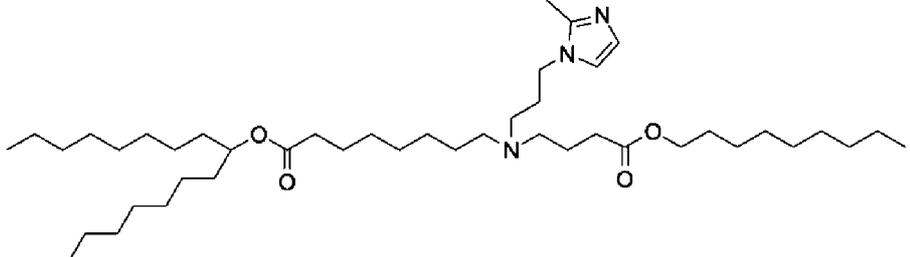
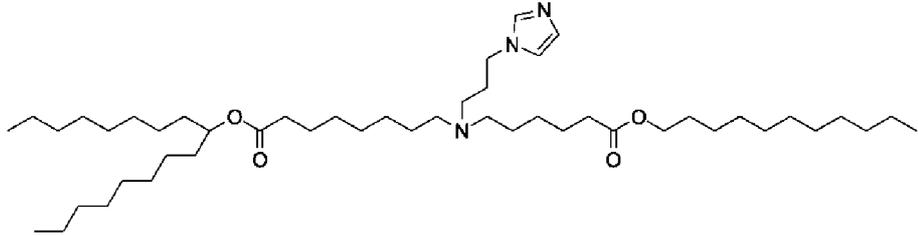
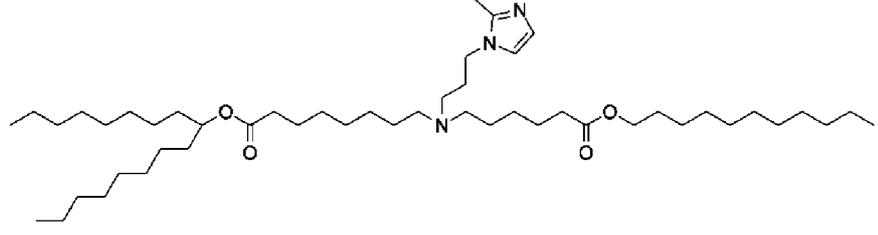
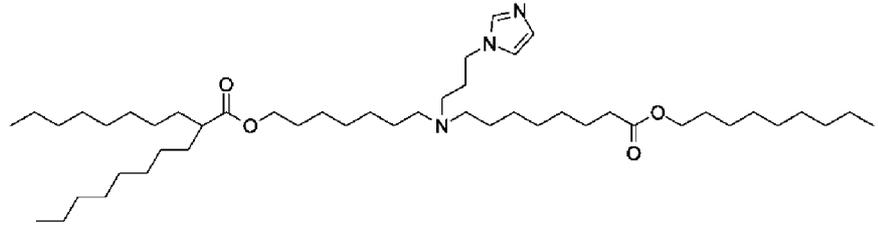
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	

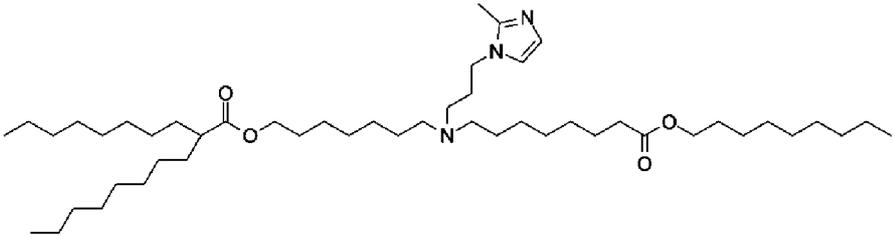
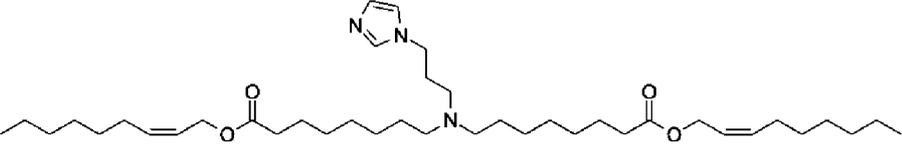
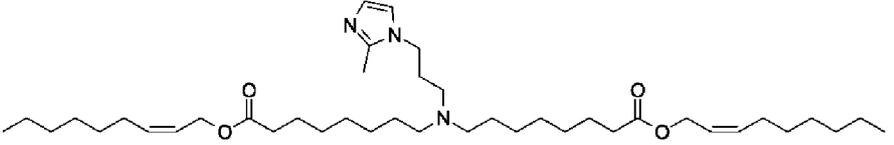
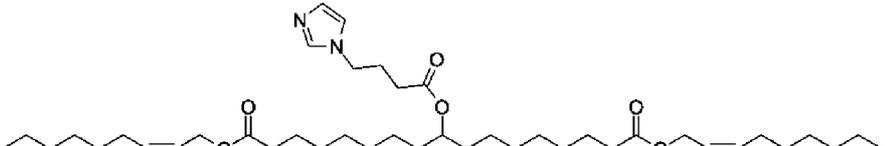
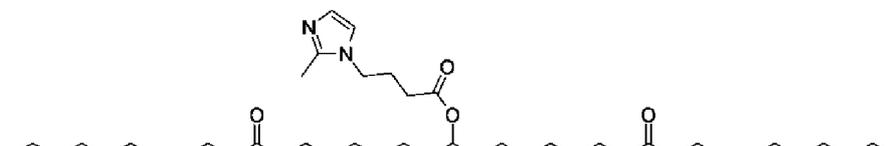
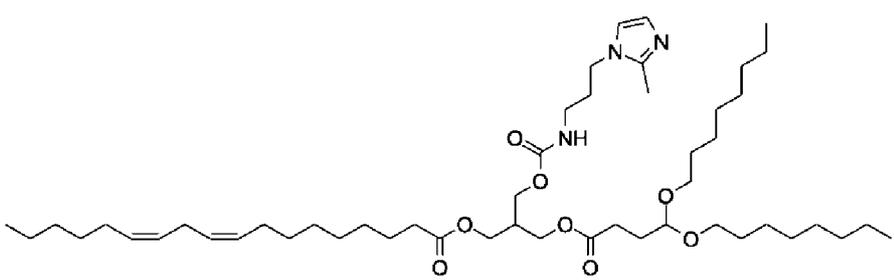
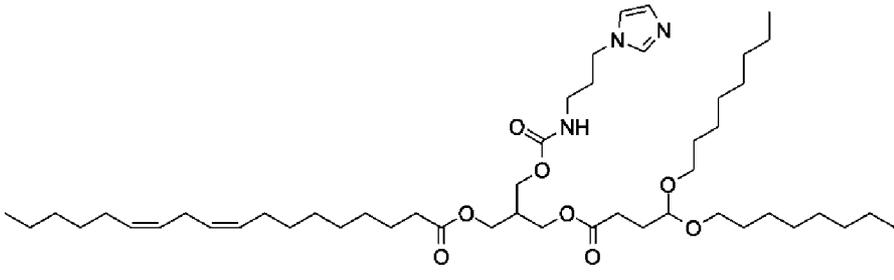
27	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN(C)C=C1)CCOC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
28	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN(C)C=C1)CCOC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
29	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN(C)C=C1)CCOC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
30	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN(C)C=C1)CCOC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
31	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN(C)C=C1)CCOC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>

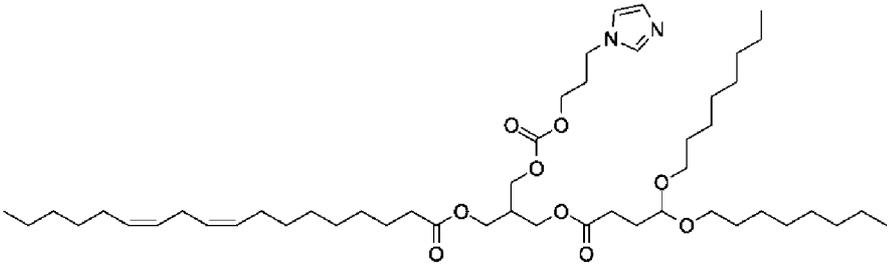
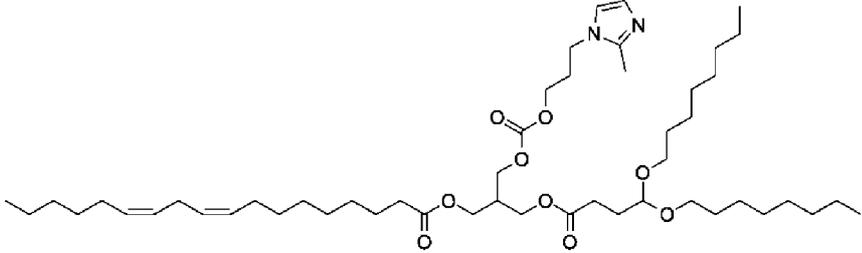
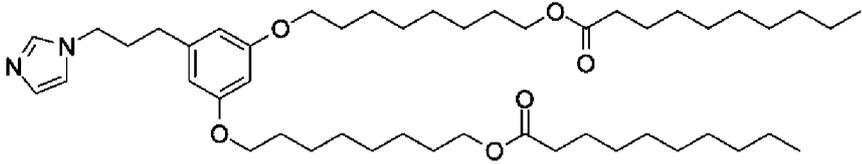
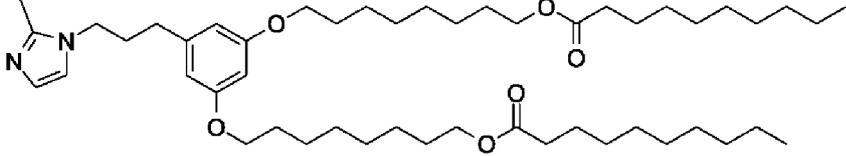
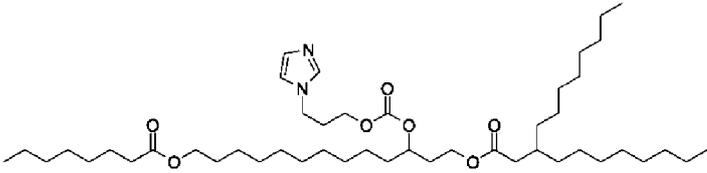
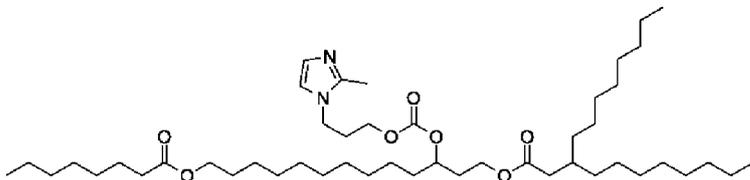
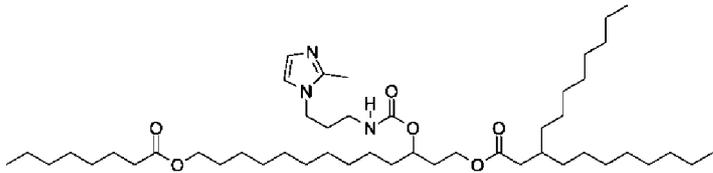
32	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN=CN1)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
33	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN=CN1)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
34	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN=CN1)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
35	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN=CN1)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
36	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCC1=CN=CN1)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>

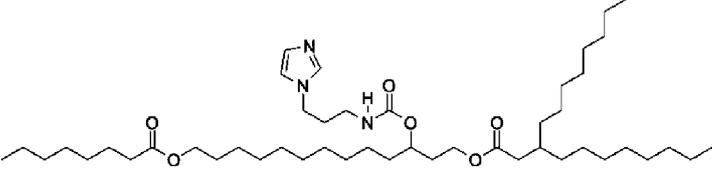
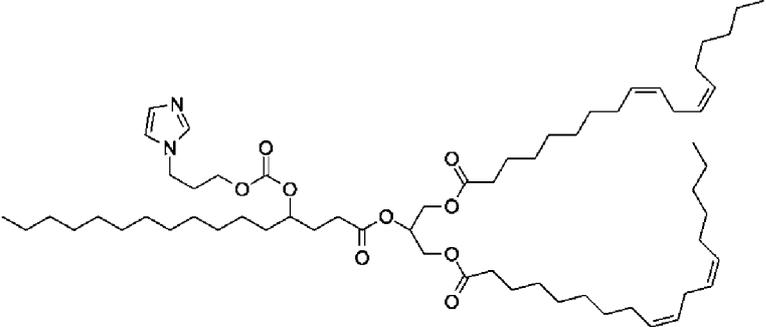
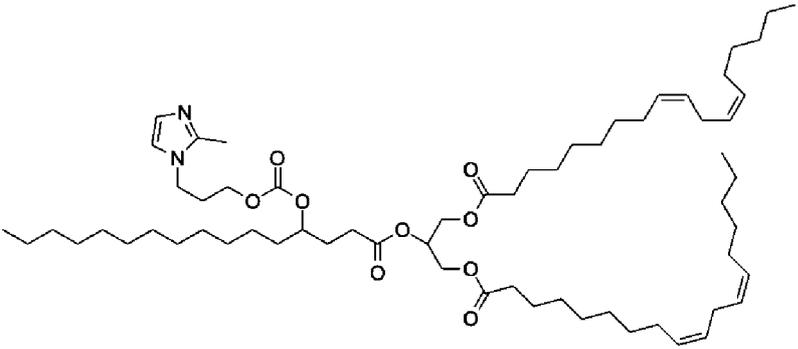
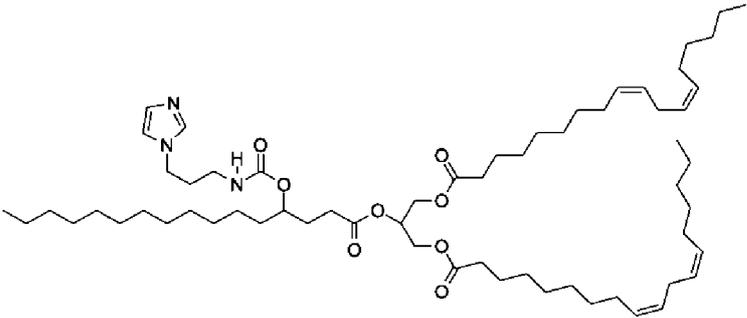
37	
38	
39	
40	
41	

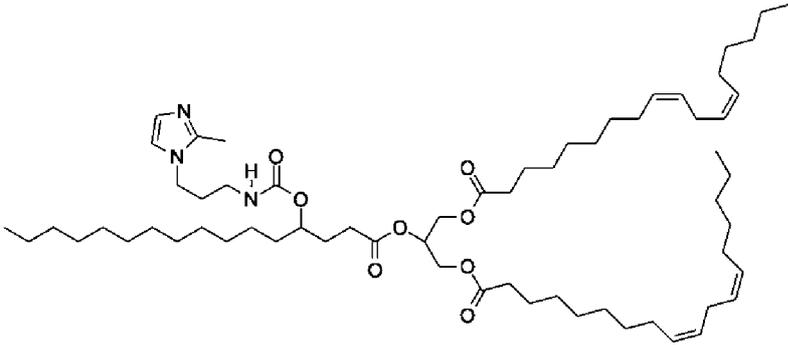
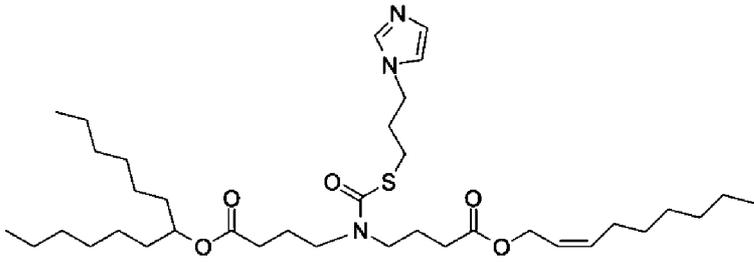
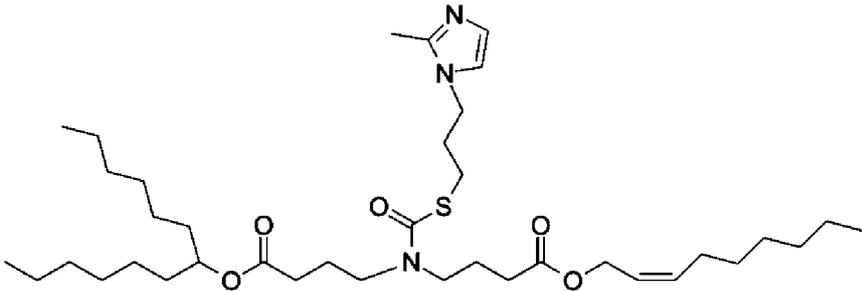
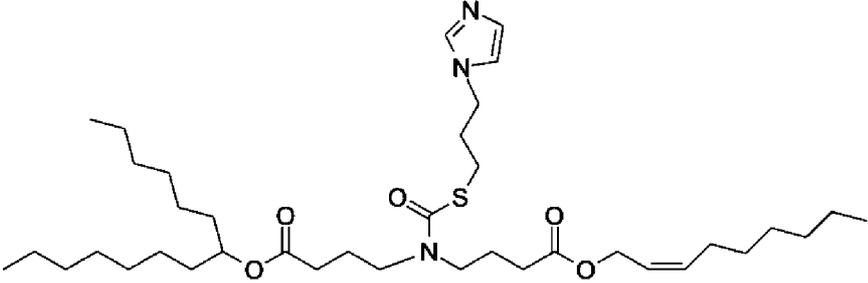
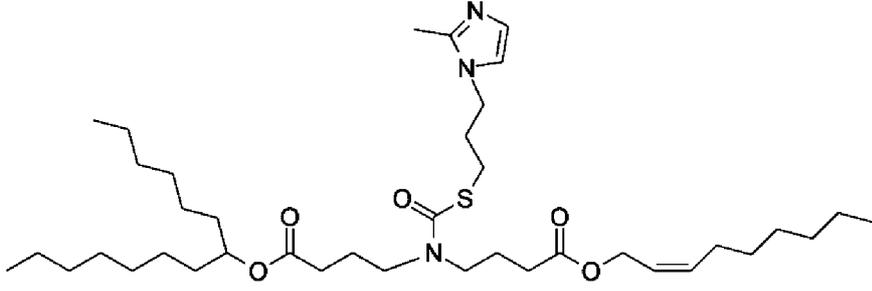
42	
43	
44	
45	
46	
47	

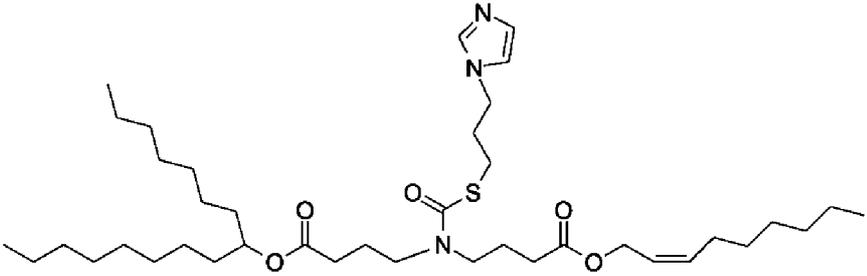
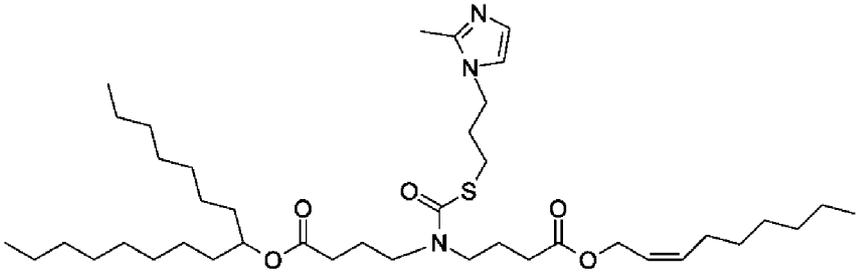
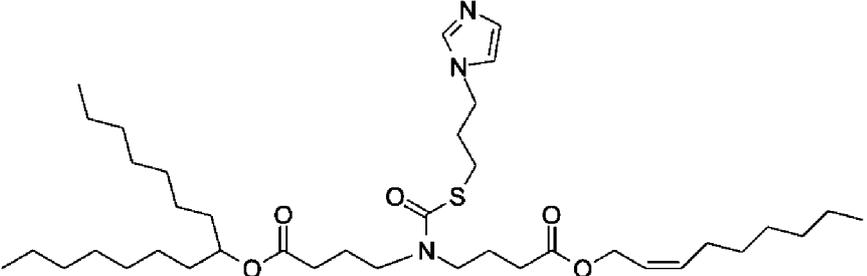
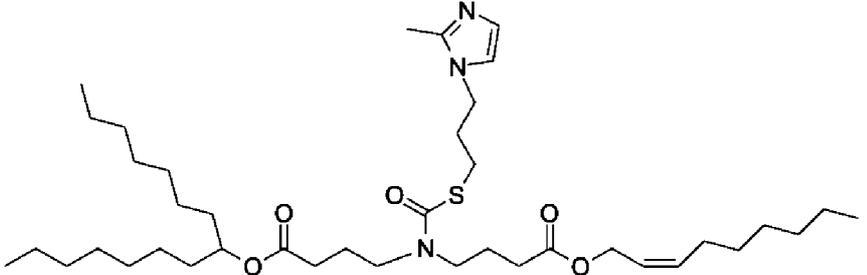
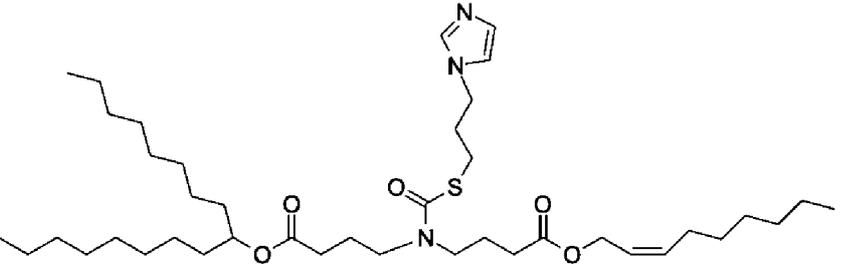
48	
49	
50	
51	
52	
53	

54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	

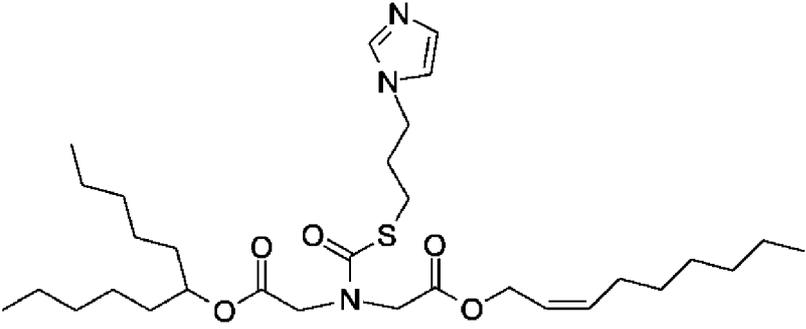
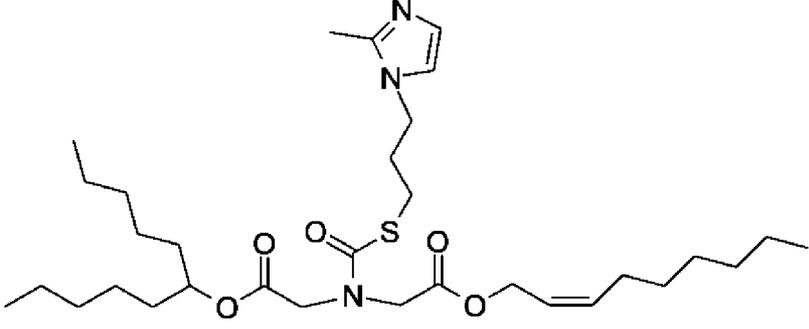
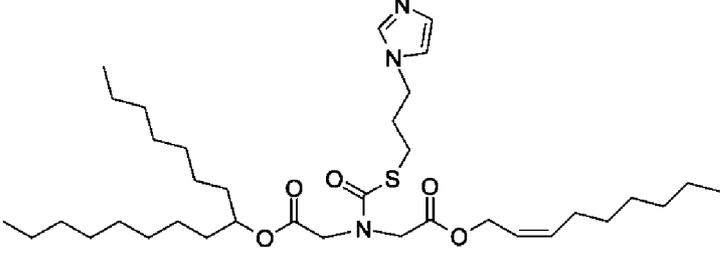
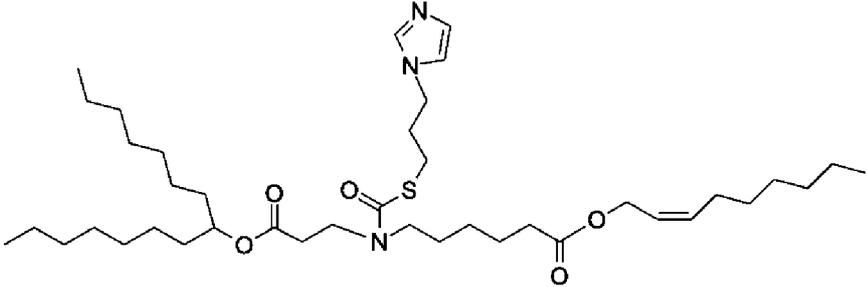
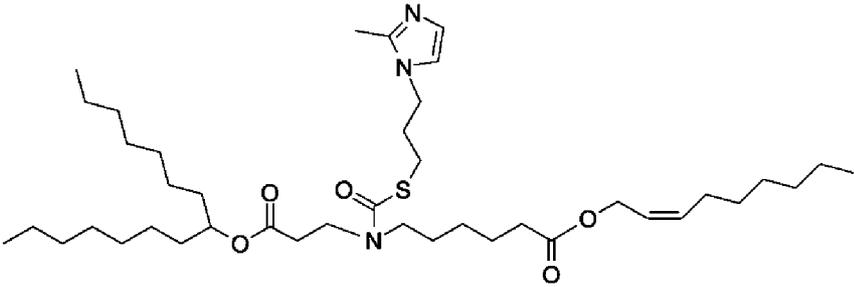
61	 <p>Chemical structure 61: A long-chain diene (1,9-diene) with two decyl chains and a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring is connected to the chain via a propyl linker.</p>
62	 <p>Chemical structure 62: A long-chain diene (1,9-diene) with two decyl chains and a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring is connected to the chain via a propyl linker.</p>
63	 <p>Chemical structure 63: A benzene ring with a 1,2,4-triazole ring and two decyl chains. The triazole ring is connected to the benzene ring via a propyl linker.</p>
64	 <p>Chemical structure 64: A benzene ring with a 1,2,4-triazole ring and two decyl chains. The triazole ring is connected to the benzene ring via a propyl linker.</p>
65	 <p>Chemical structure 65: A long-chain diene (1,9-diene) with two decyl chains and a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring is connected to the chain via a propyl linker.</p>
66	 <p>Chemical structure 66: A long-chain diene (1,9-diene) with two decyl chains and a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring is connected to the chain via a propyl linker.</p>
67	 <p>Chemical structure 67: A long-chain diene (1,9-diene) with two decyl chains and a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring is connected to the chain via a propyl linker.</p>

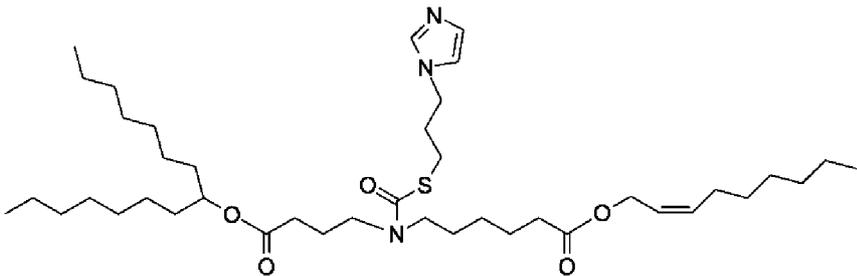
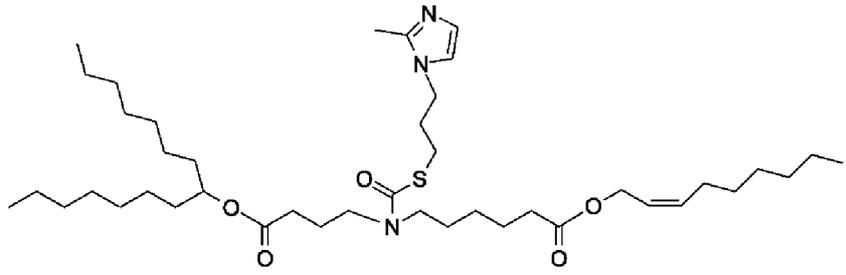
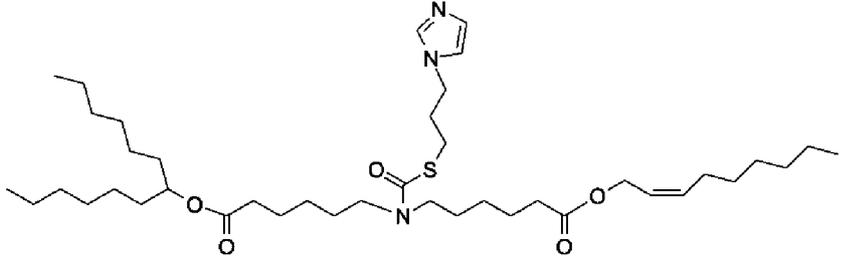
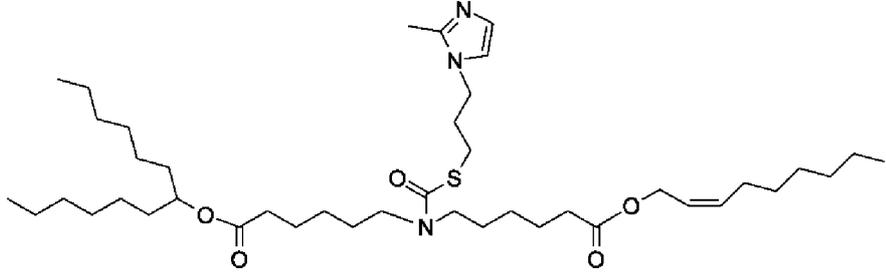
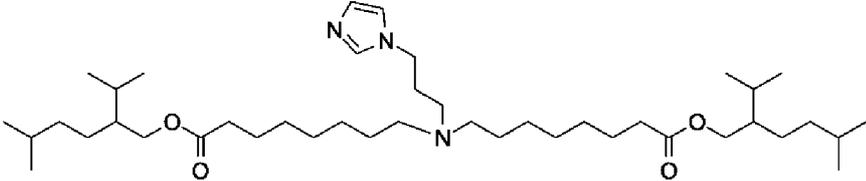
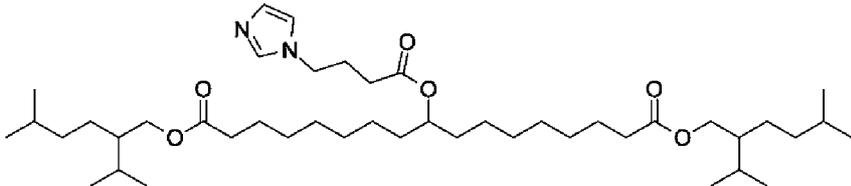
68	 <p>Chemical structure 68: A long-chain alkyl ester with a central amide linkage and a terminal branched alkyl group.</p>
69	 <p>Chemical structure 69: A long-chain alkyl ester with a terminal branched alkyl group and a terminal long-chain alkyl group.</p>
70	 <p>Chemical structure 70: A long-chain alkyl ester with a terminal branched alkyl group and a terminal long-chain alkyl group.</p>
71	 <p>Chemical structure 71: A long-chain alkyl ester with a terminal branched alkyl group and a terminal long-chain alkyl group.</p>

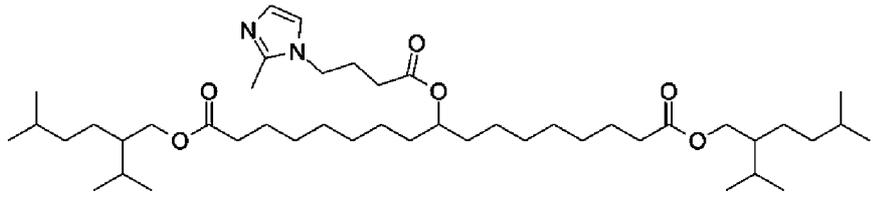
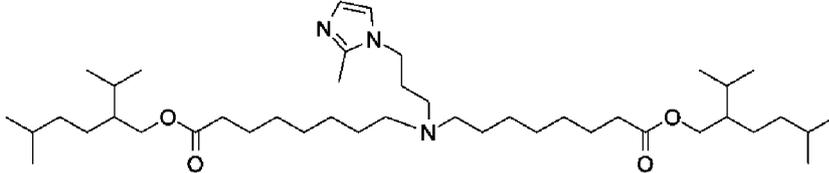
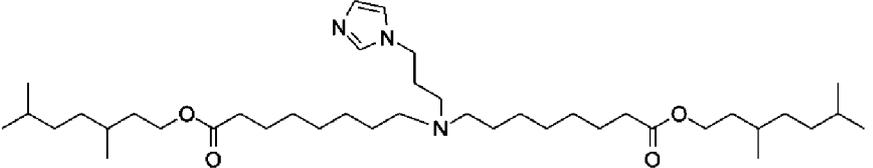
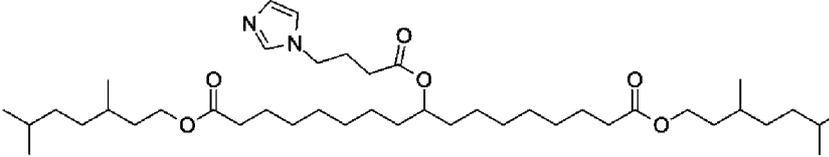
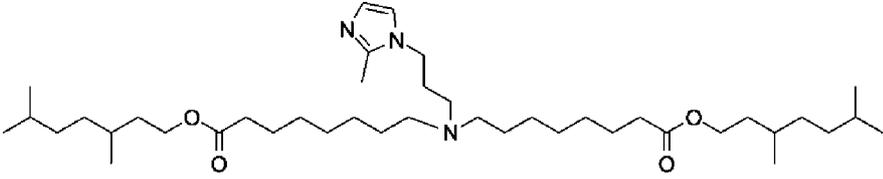
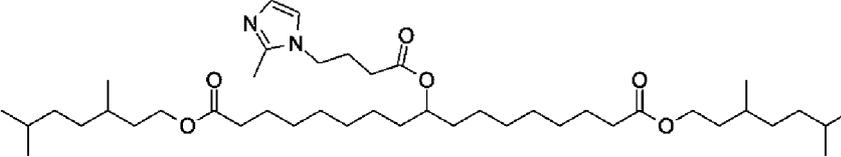
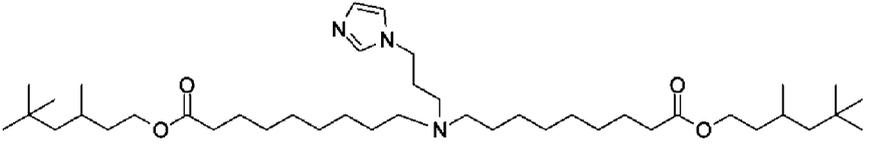
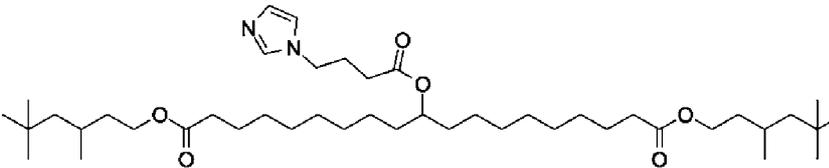
72	
73	
74	
75	
76	

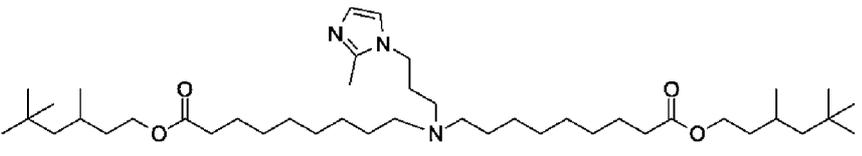
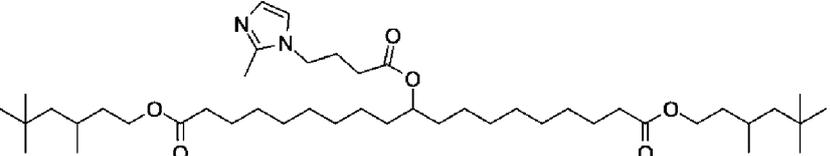
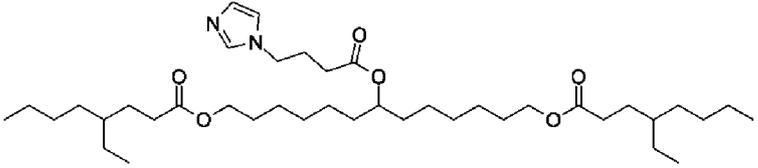
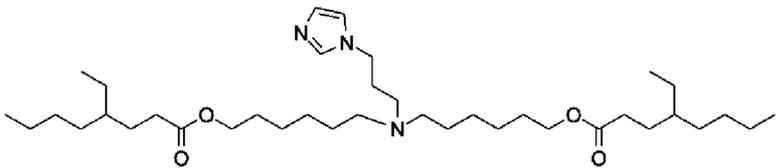
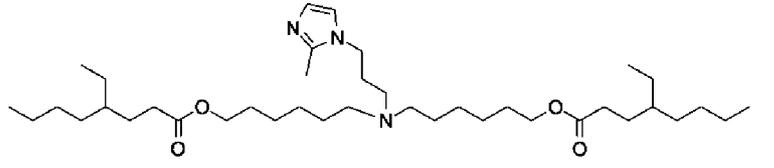
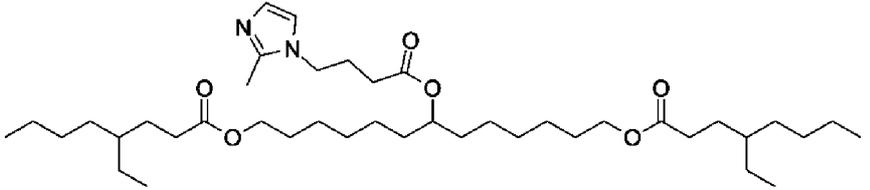
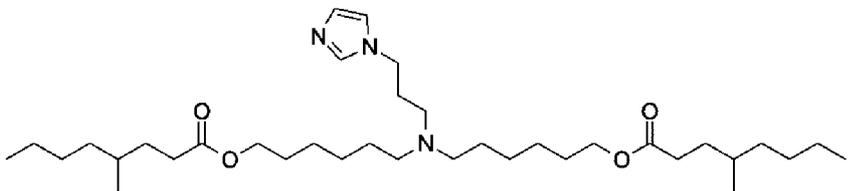
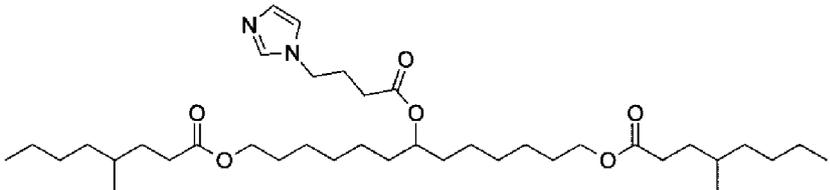
77	 <chem>CCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCSC1=CN=CN=C1)CCCC(=O)OCC=CCCCCCCC</chem>
78	 <chem>CCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCSC1=CN(C)=CN=C1)CCCC(=O)OCC=CCCCCCCC</chem>
79	 <chem>CCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCSC1=CN=CN=C1)CCCC(=O)OCC=CCCCCCCC</chem>
80	 <chem>CCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCSC1=CN=CN=C1)CCCC(=O)OCC=CCCCCCCC</chem>
81	 <chem>CCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCSC1=CN=CN=C1)CCCC(=O)OCC=CCCCCCCC</chem>

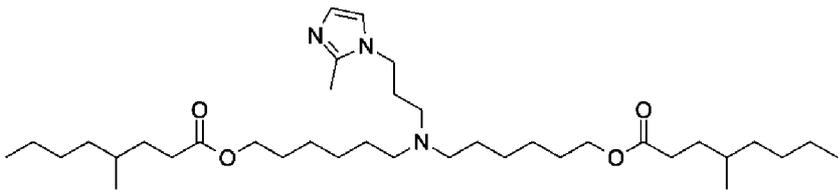
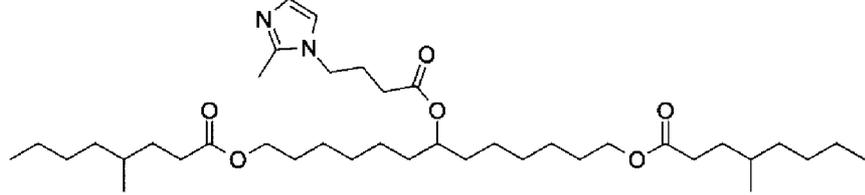
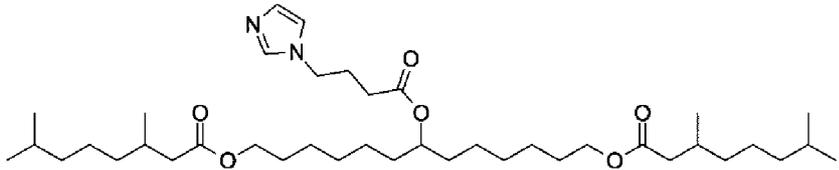
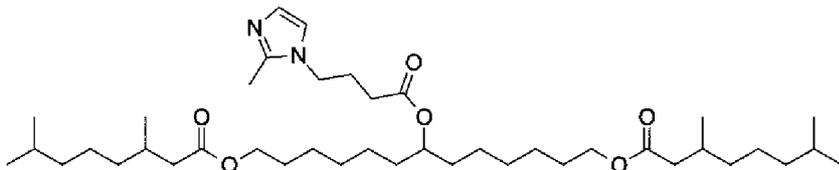
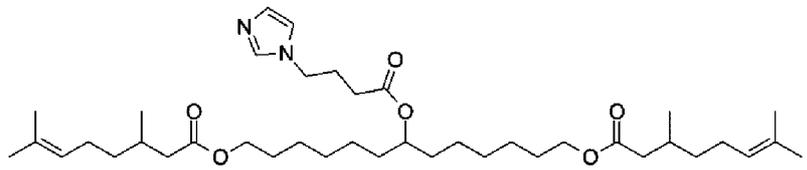
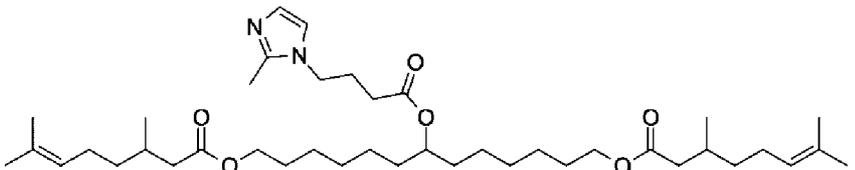
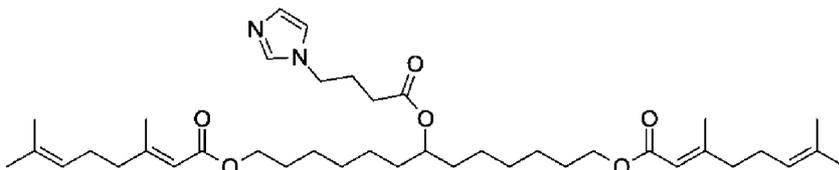
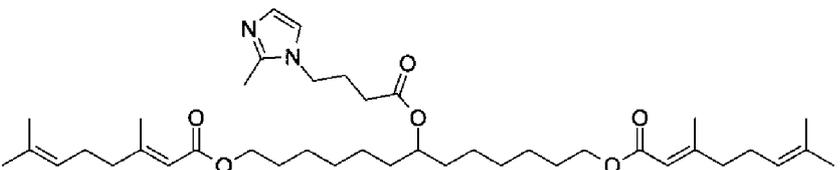
82	
83	
84	
85	
86	

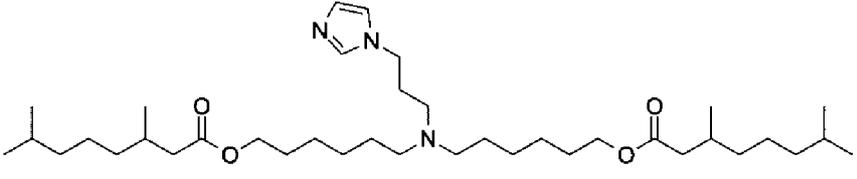
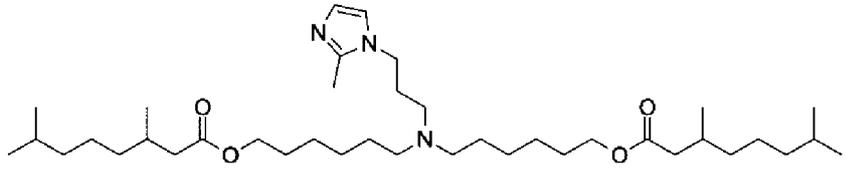
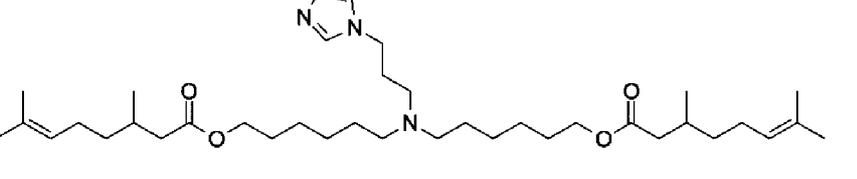
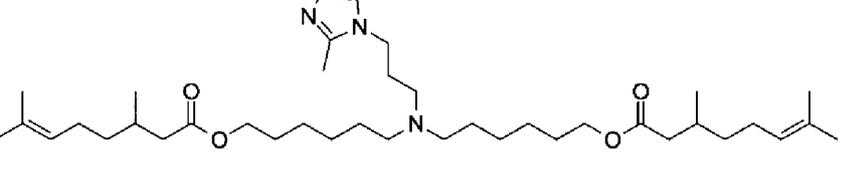
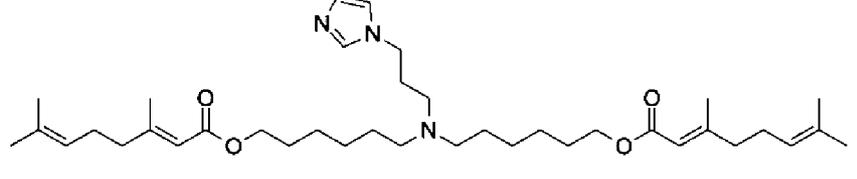
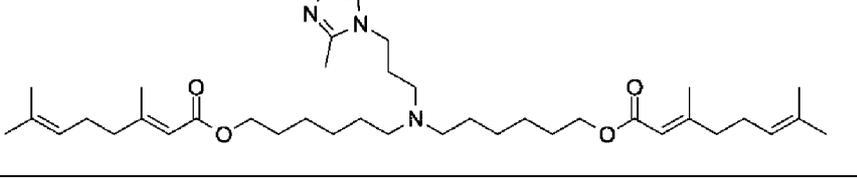
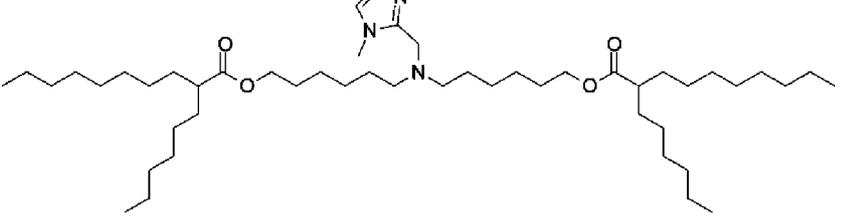
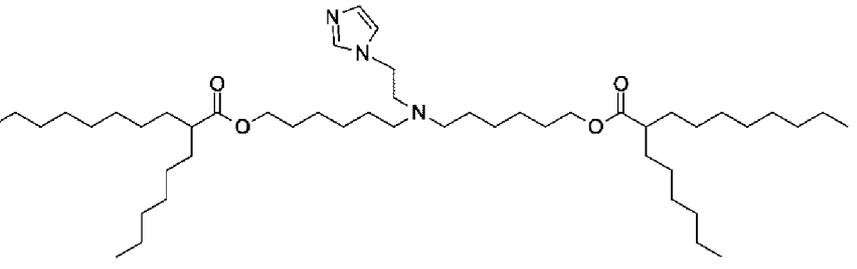
87	
88	
89	
90	
91	

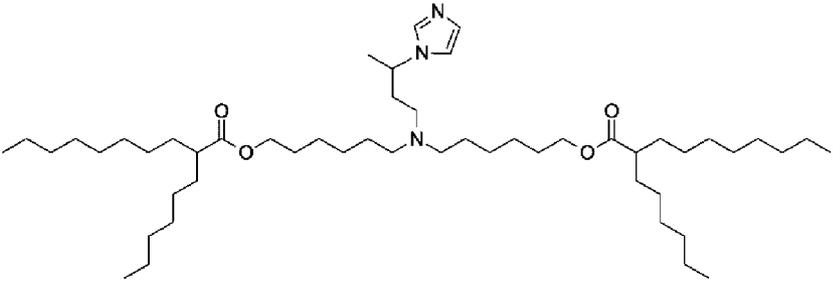
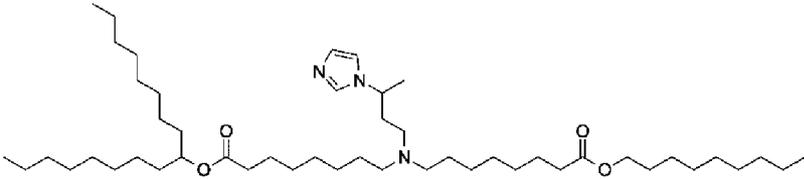
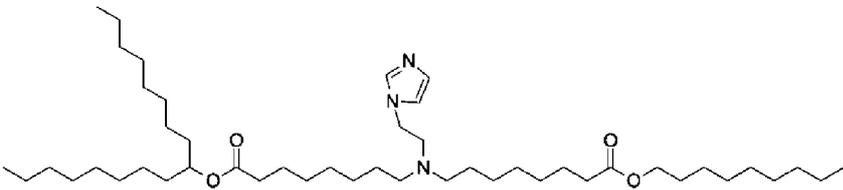
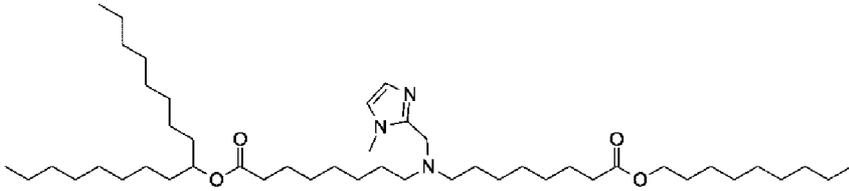
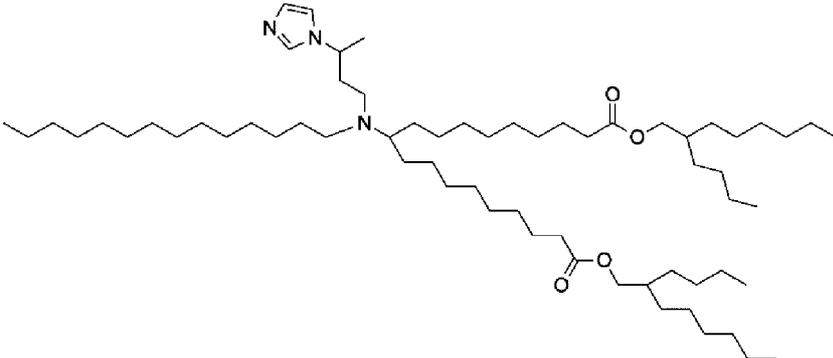
92	
93	
94	
95	
96	
97	

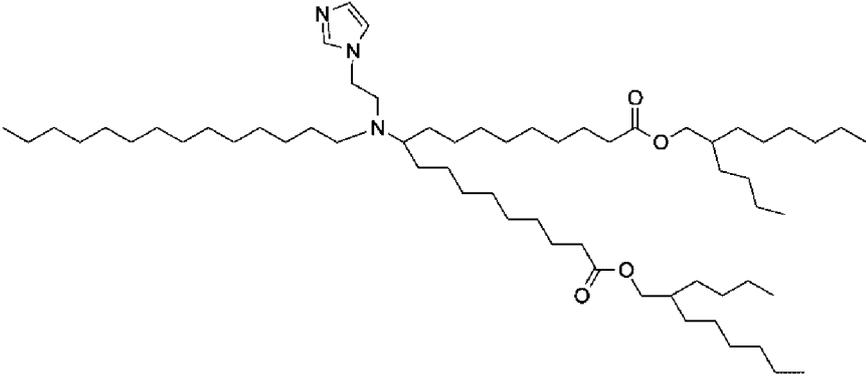
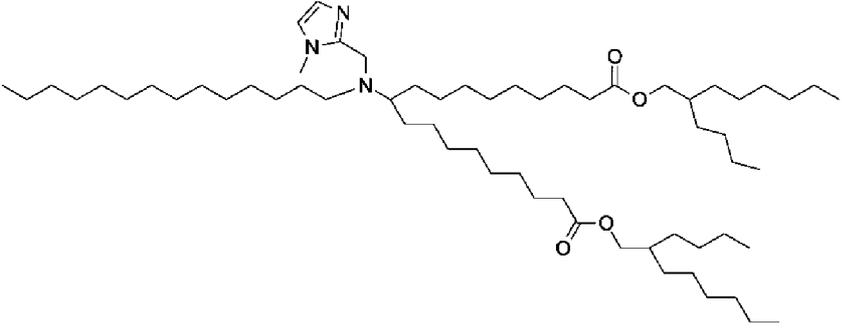
98	
99	
100	
101	
102	
103	
104	
105	

106	
107	
108	
109	
110	
111	
112	
113	

114	
115	
116	
117	
118	
119	
120	
121	

122	
123	
124	
125	
126	
127	
128	
129	

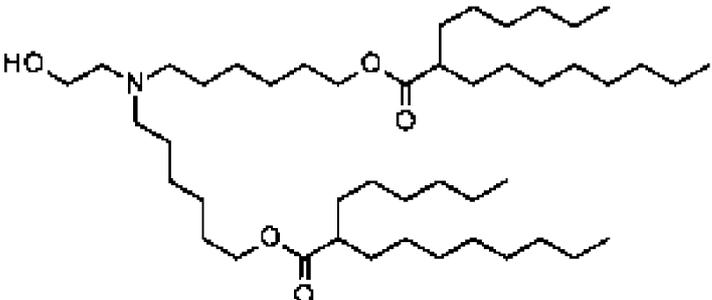
130	
131	
132	
133	
134	

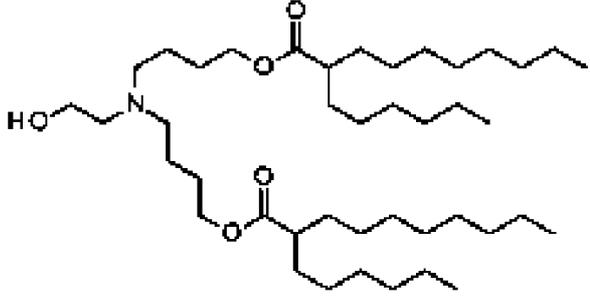
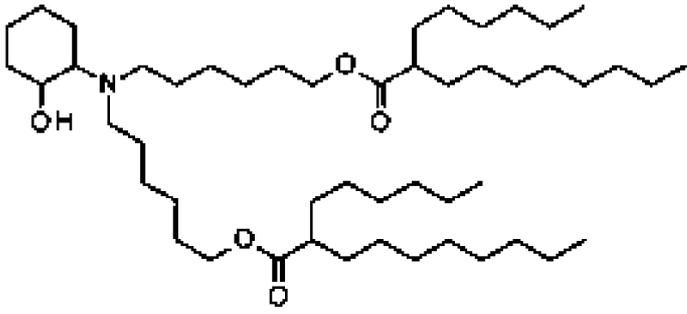
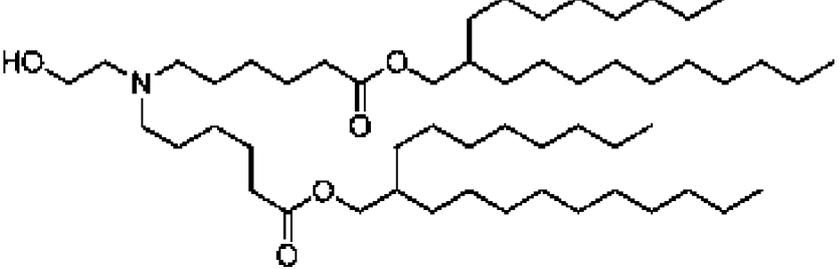
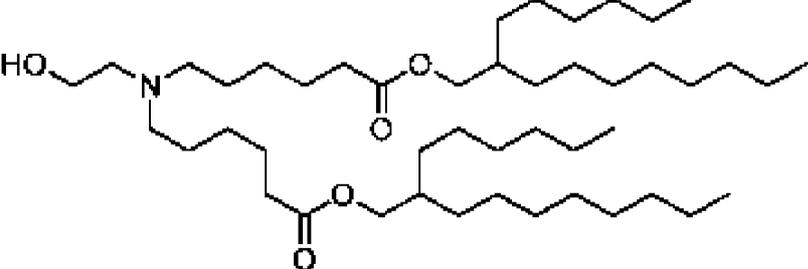
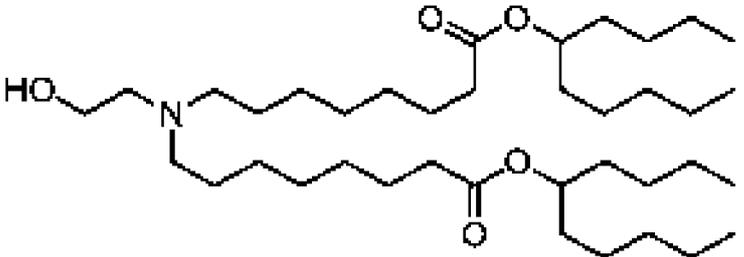
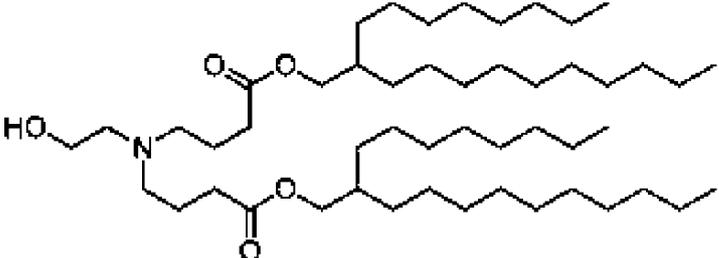
135	
136	

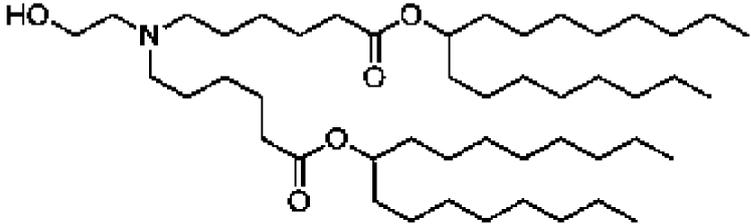
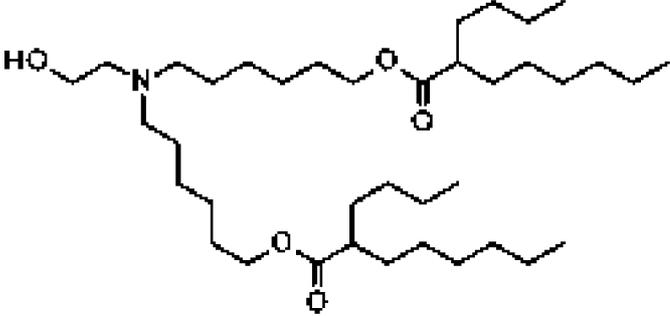
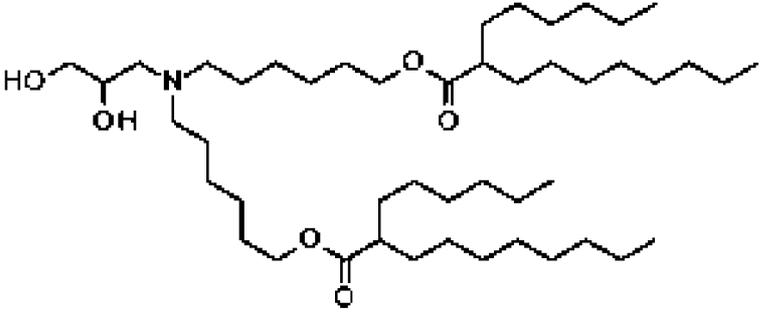
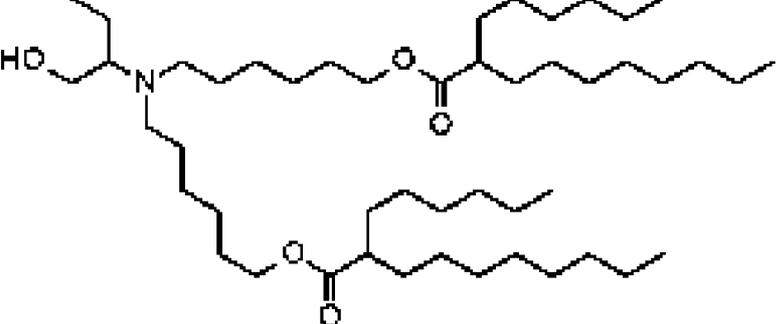
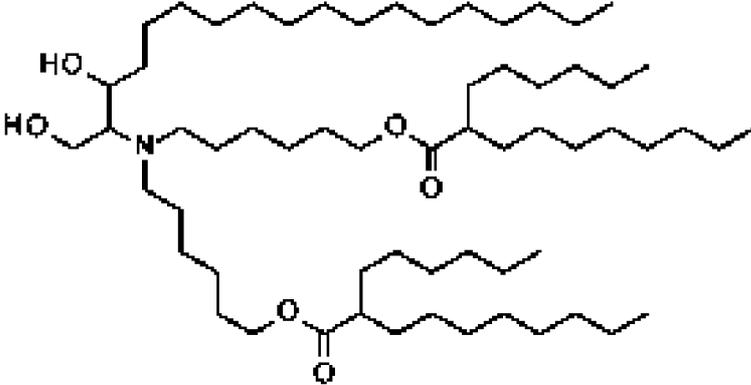
[0463] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет бета-гидроксиламиновую головную группу. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет гамма-гидроксиламиновую головную группу.

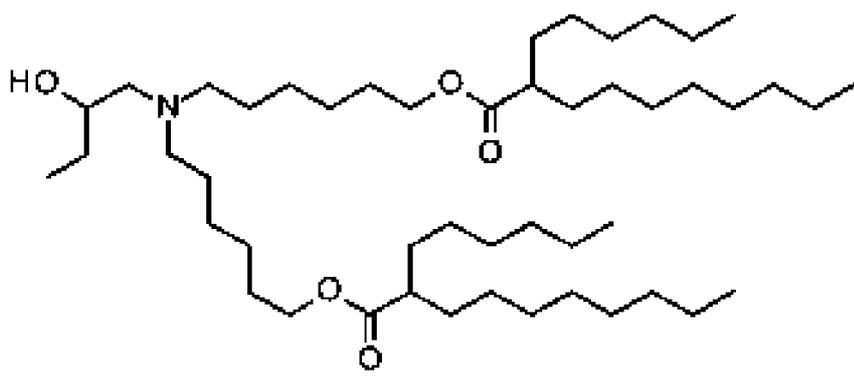
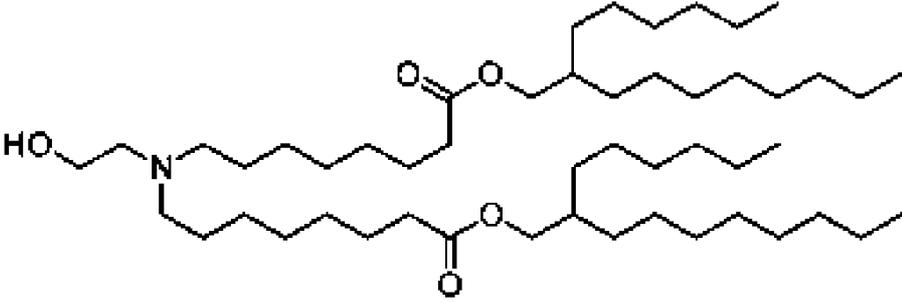
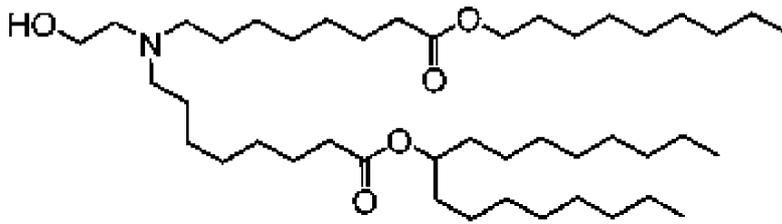
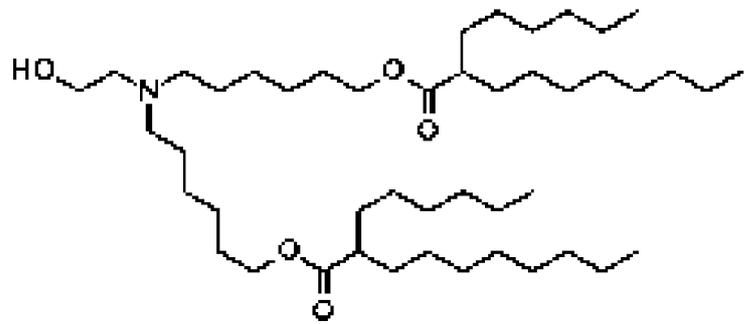
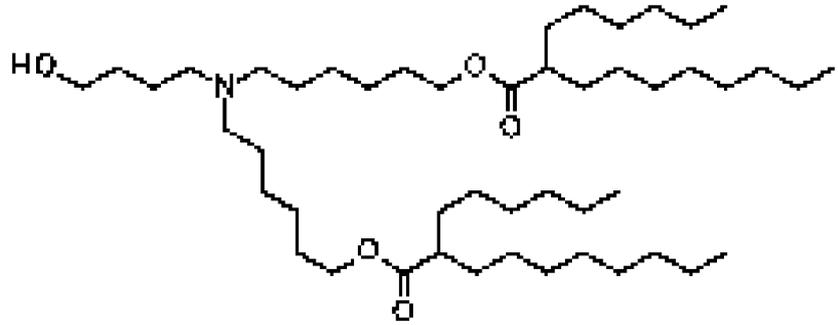
[0464] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид согласно раскрытию представляет собой липид, выбранный из таблицы 10b. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид согласно раскрытию представляет собой липид 15 из таблицы 10b. В одном варианте осуществления ионизируемый липид описан в публикации патента США № US20170210697A1. В одном варианте осуществления ионизируемый липид описан в публикации патента США № US20170119904A1.

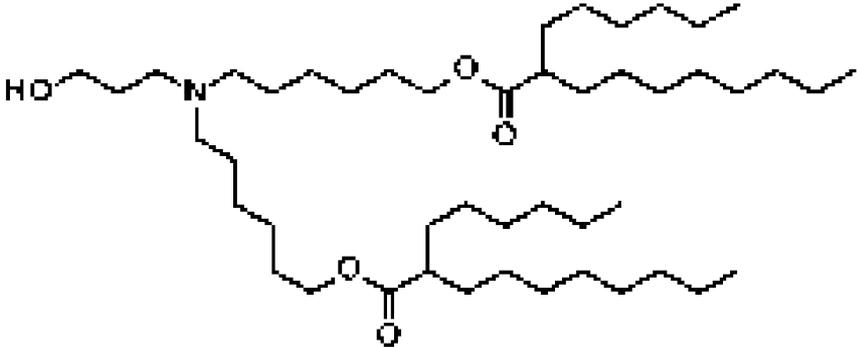
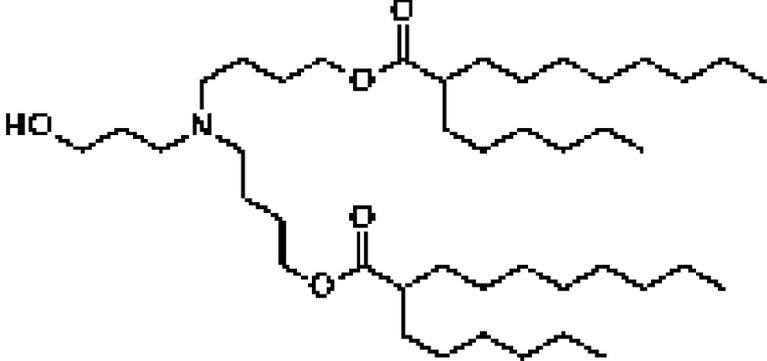
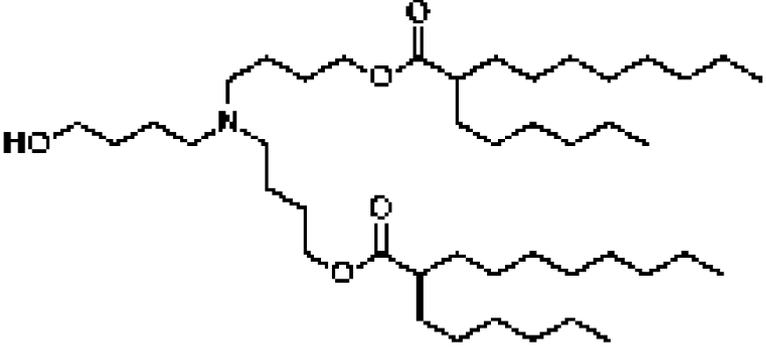
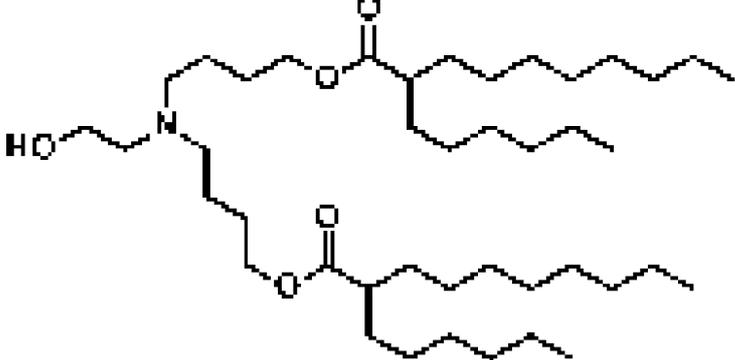
Таблица 10b

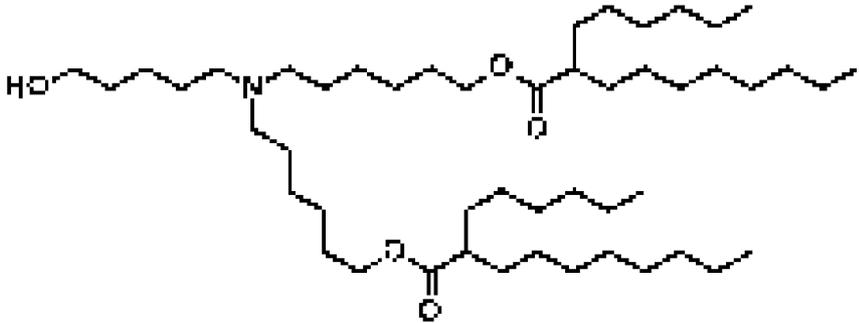
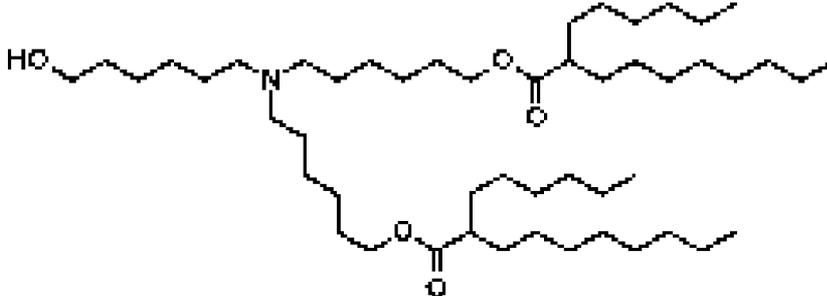
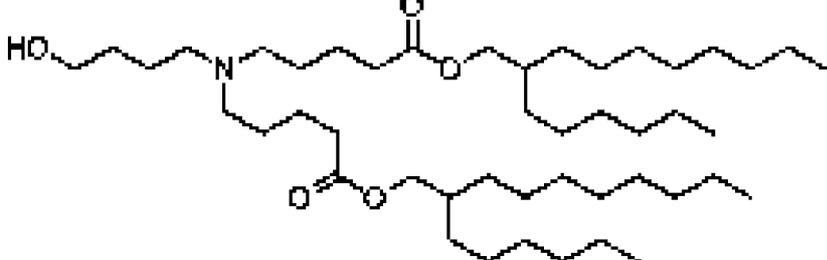
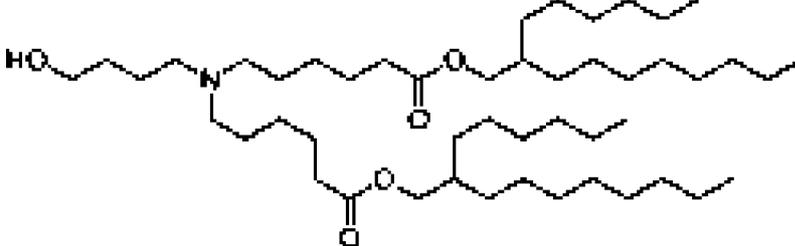
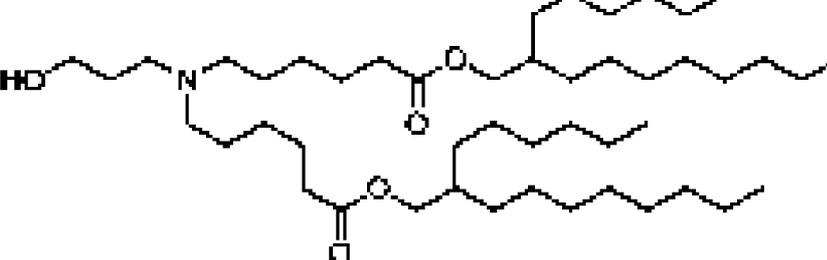
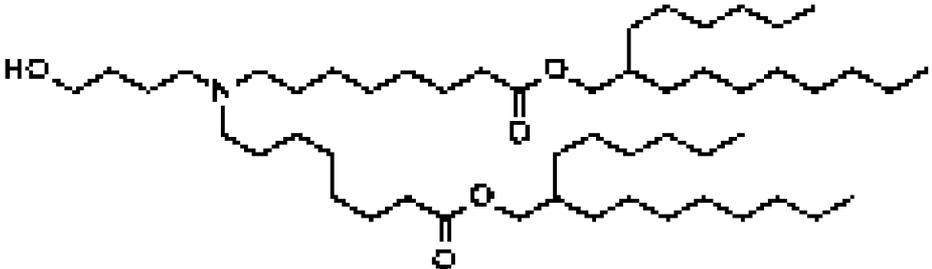
Номер ионизируемого липида	Структура
1	

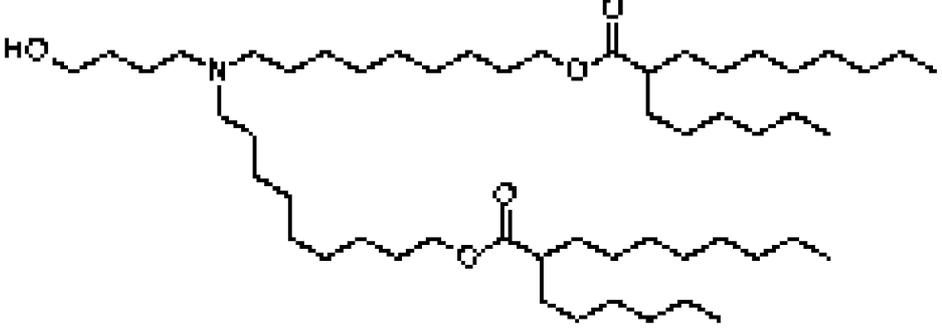
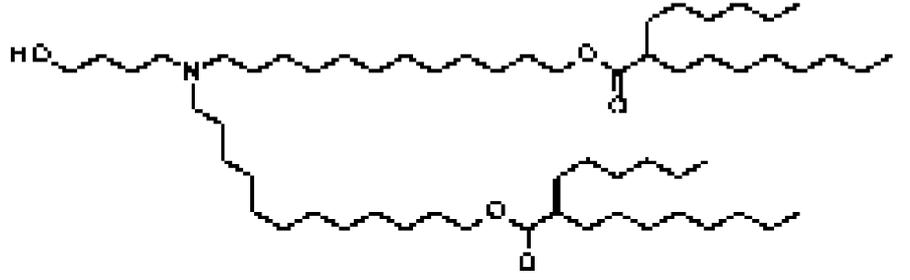
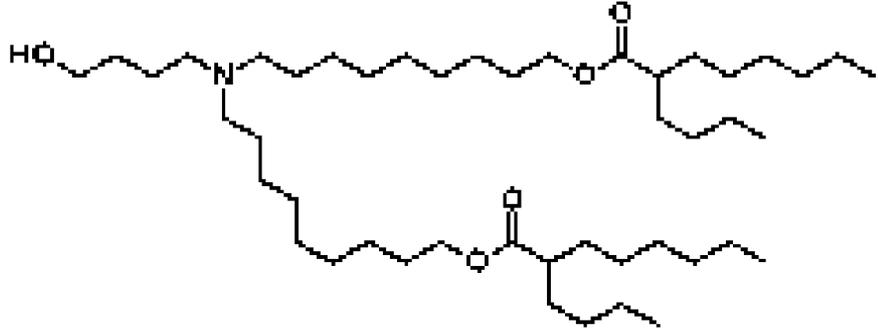
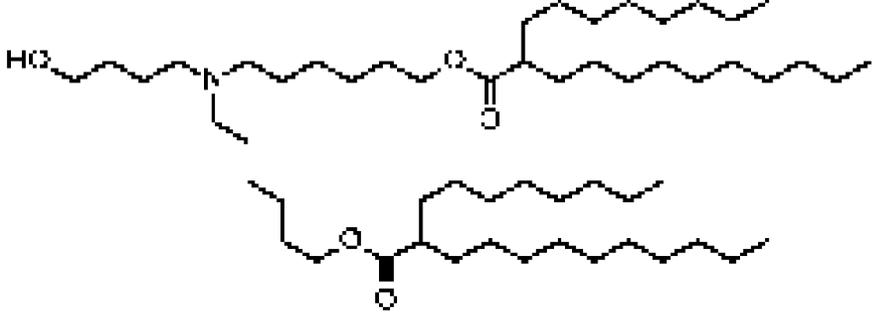
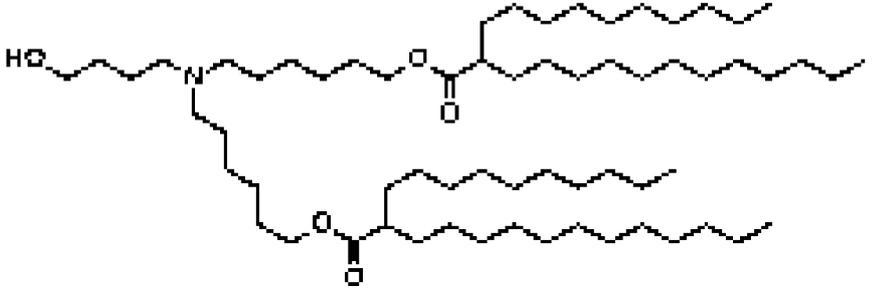
2	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
3	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(C1CCCCC1)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
4	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
5	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
6	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>
7	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC</chem>

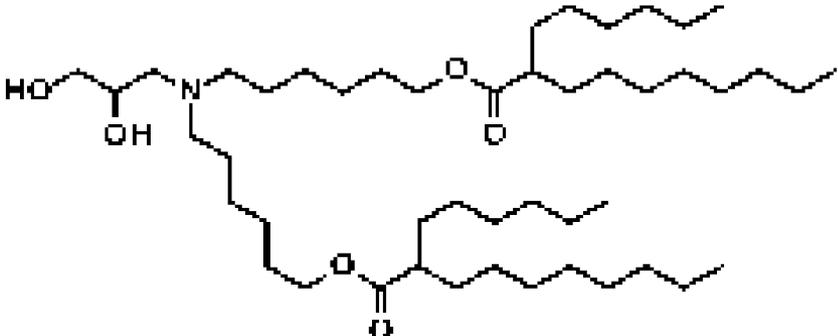
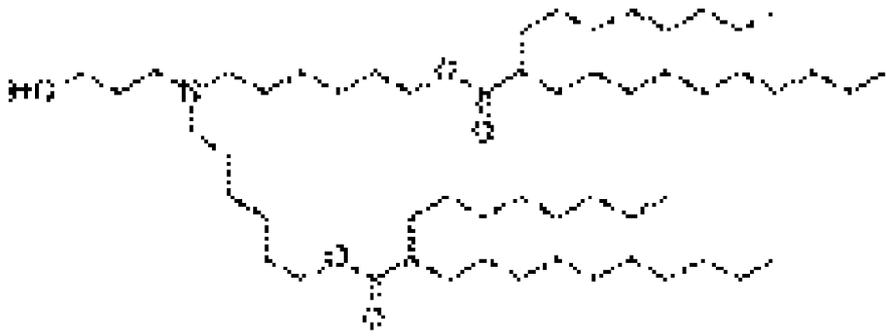
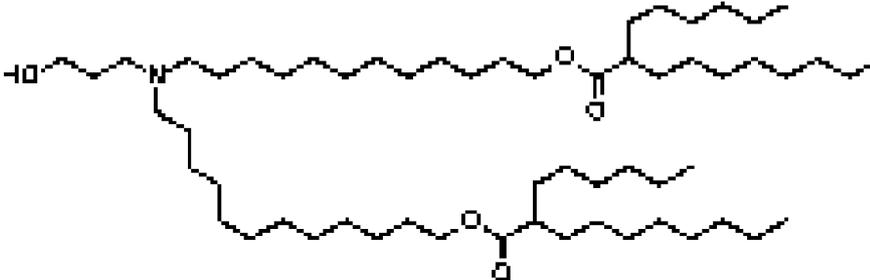
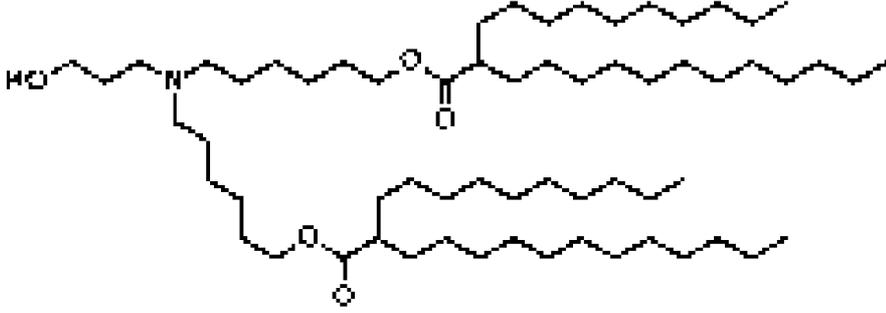
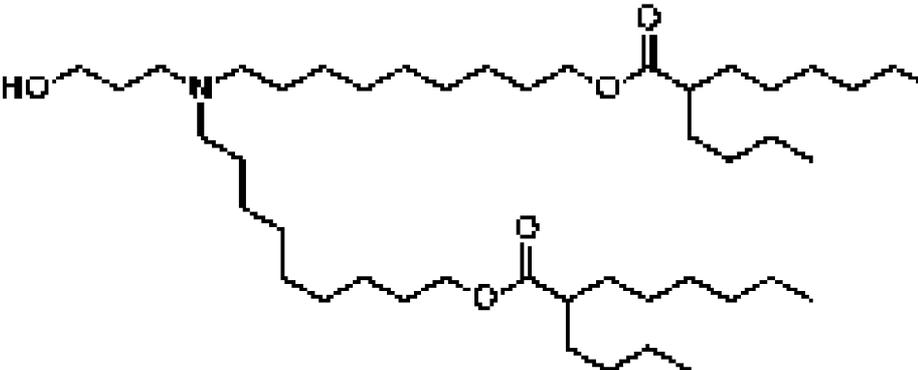
8	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCO</chem>
9	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCO</chem>
10	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCO</chem>
11	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCO</chem>
12	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCO</chem>

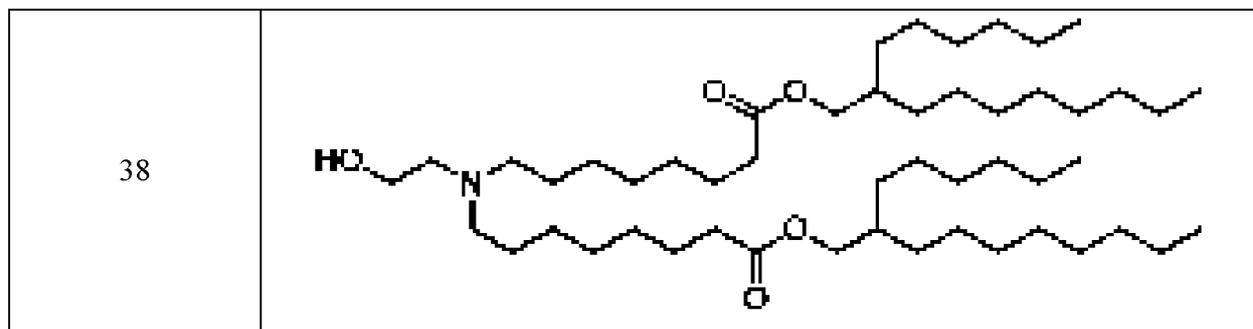
13	 <chem>CCCC(C)CN(CCCCCCCCCCCCOC(=O)CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCOC(=O)CCCCCCCCCCCC</chem>
14	 <chem>CCOCCN(CCCCCCCCCCCCOC(=O)CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCOC(=O)CCCCCCCCCCCC</chem>
15	 <chem>CCOCCN(CCCCCCCCCCCCOC(=O)CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCO</chem>
16	 <chem>CCOCCN(CCCCCCCCCCCCOC(=O)CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCO</chem>
17	 <chem>CCOCCN(CCCCCCCCCCCCOC(=O)CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCCO</chem>

18	 <p>Chemical structure 18: A tertiary amine with a 3-hydroxypropyl group and two 2-(2-ethylhexanoyloxy)ethyl groups.</p>
19	 <p>Chemical structure 19: A tertiary amine with a 3-hydroxypropyl group and two 2-(2-ethylhexanoyloxy)ethyl groups, with a different conformation than structure 18.</p>
20	 <p>Chemical structure 20: A tertiary amine with a 3-hydroxypropyl group and two 2-(2-ethylhexanoyloxy)ethyl groups, with a different conformation than structure 18.</p>
21	 <p>Chemical structure 21: A tertiary amine with a 3-hydroxypropyl group and two 2-(2-ethylhexanoyloxy)ethyl groups, with a different conformation than structure 18.</p>

22	
23	
24	
25	
26	
27	

28	
29	
30	
31	
32	

33	
34	
35	
36	
37	

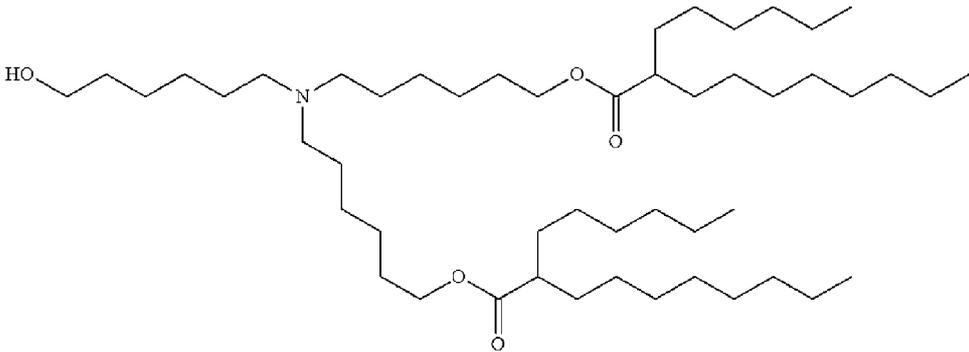
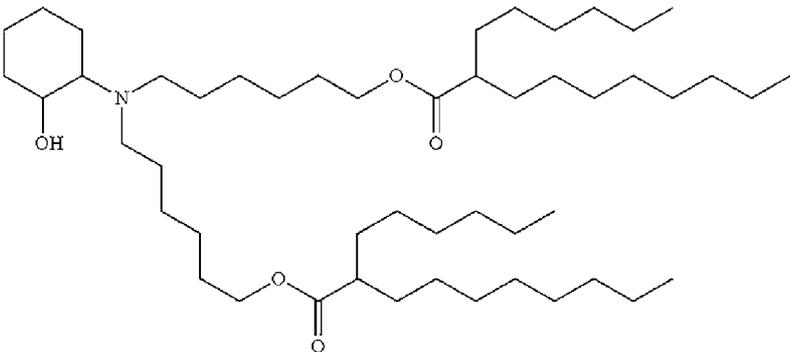
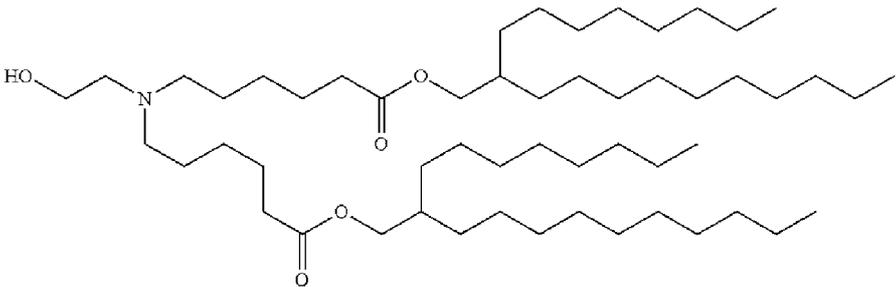
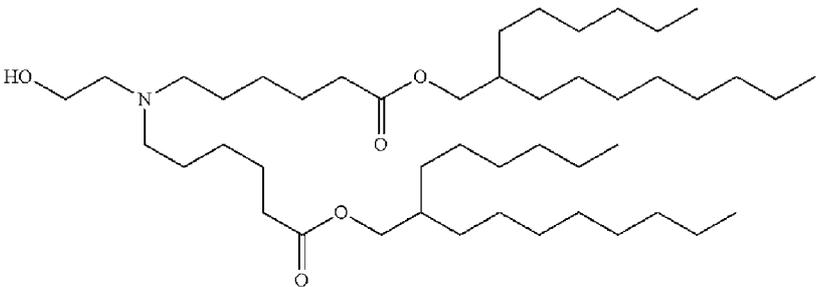
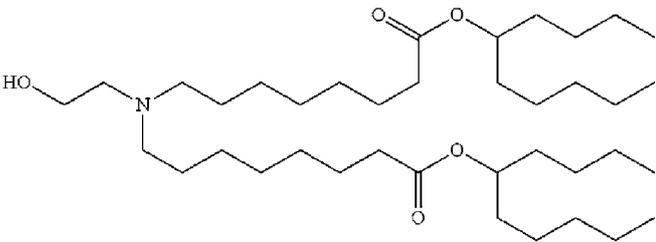


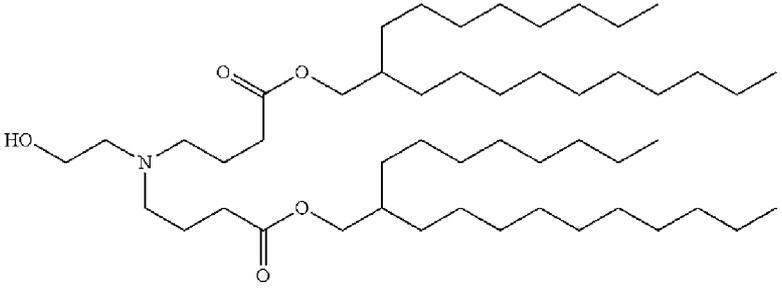
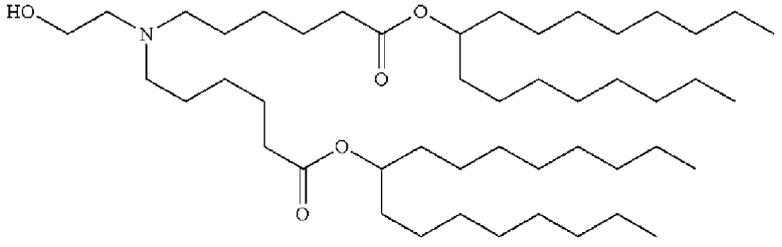
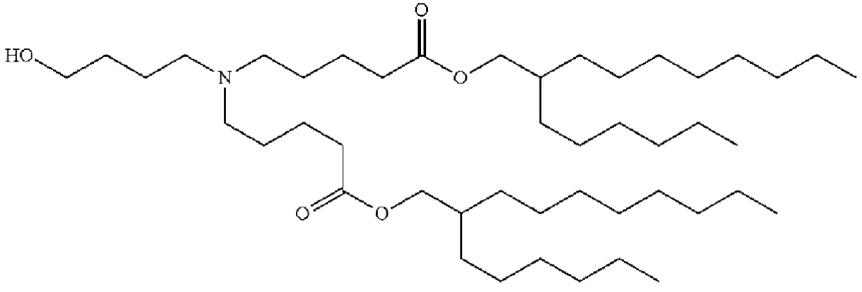
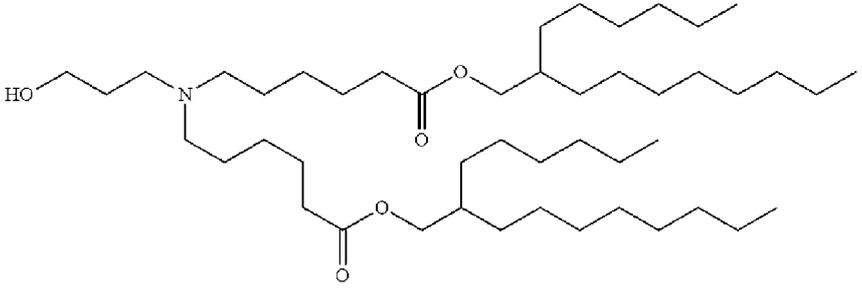
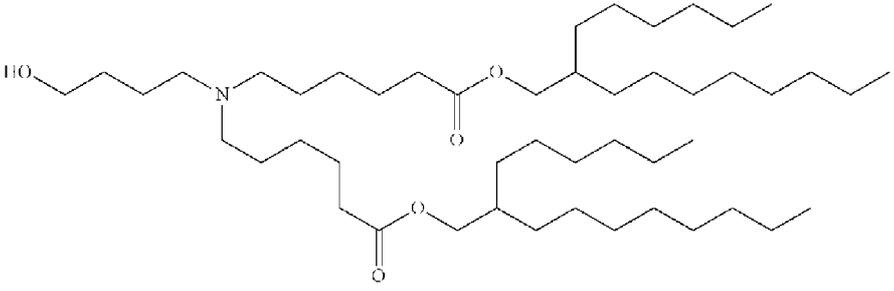
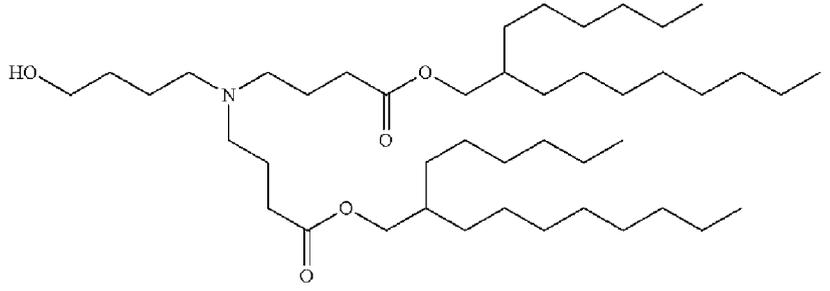
[0465] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет одну из структур, приведенных в таблице 10 ниже.

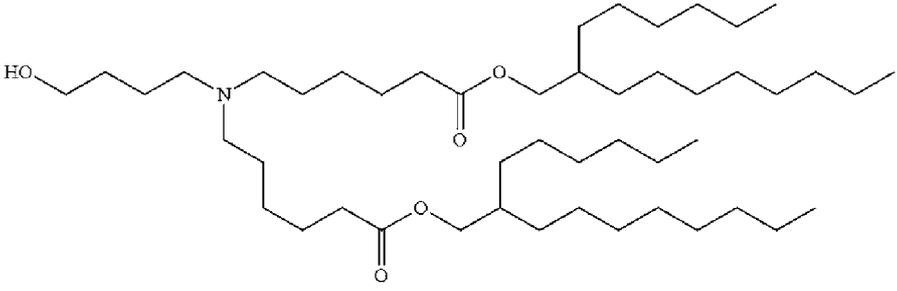
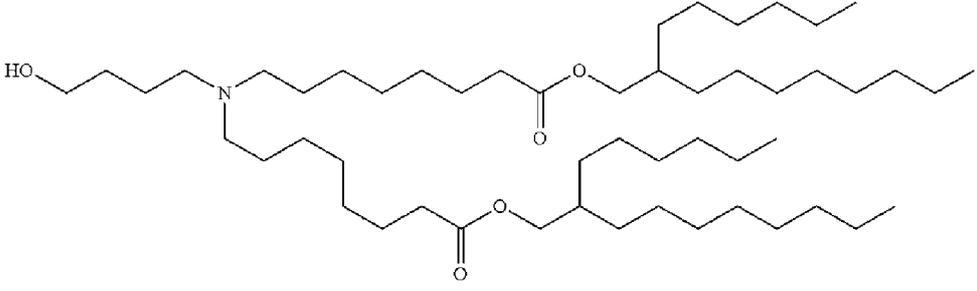
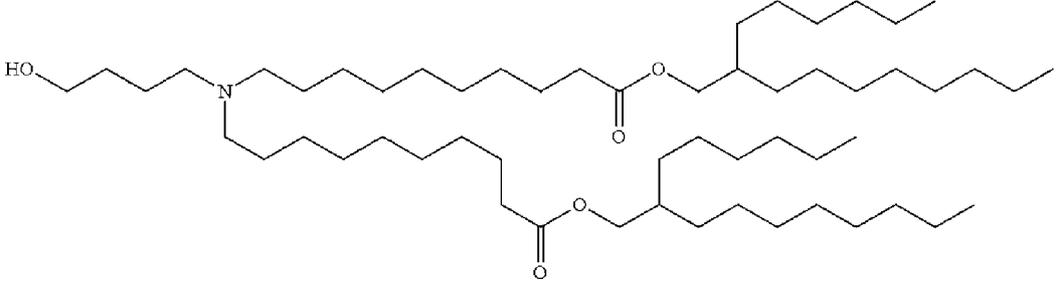
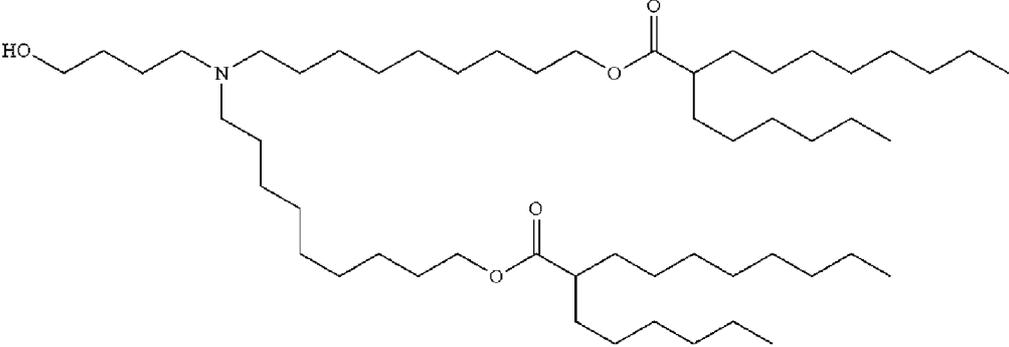
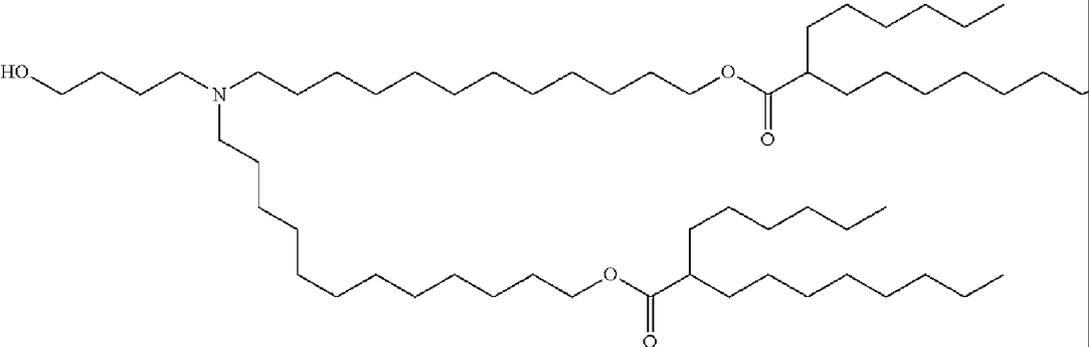
Таблица 10

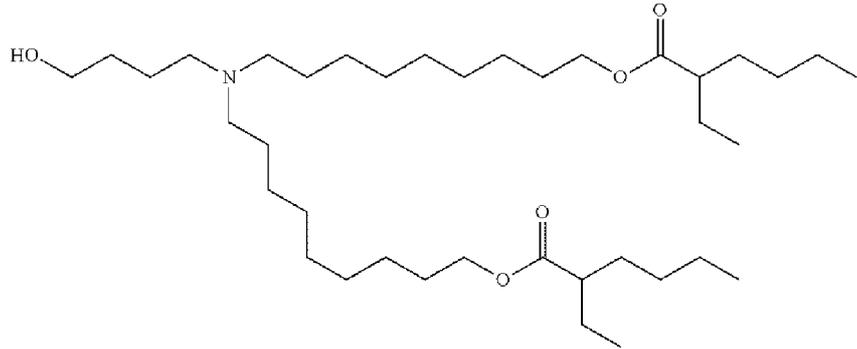
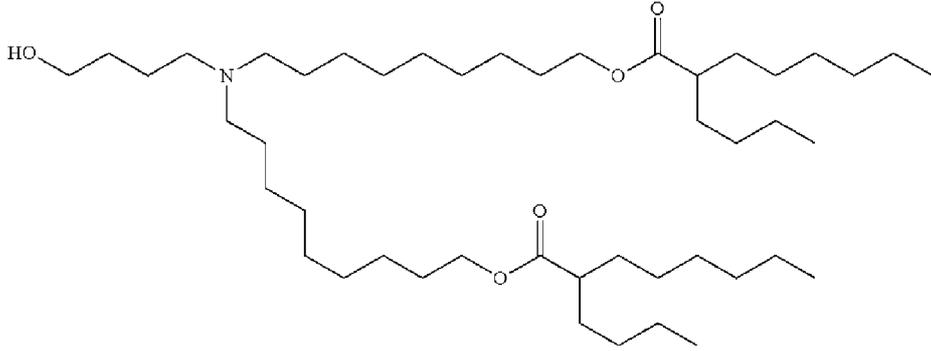
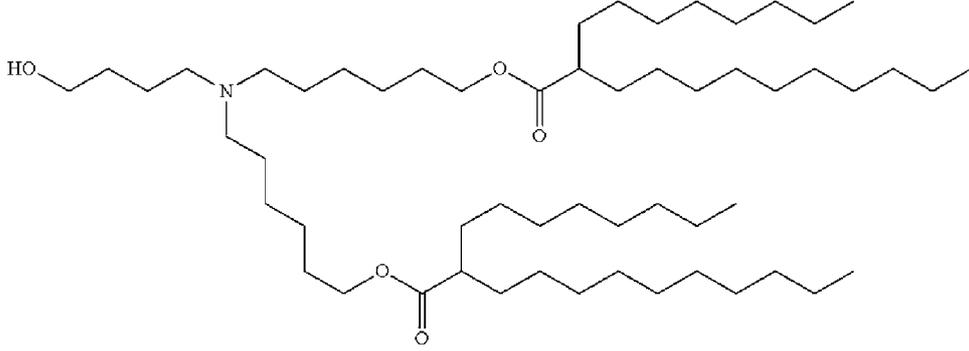
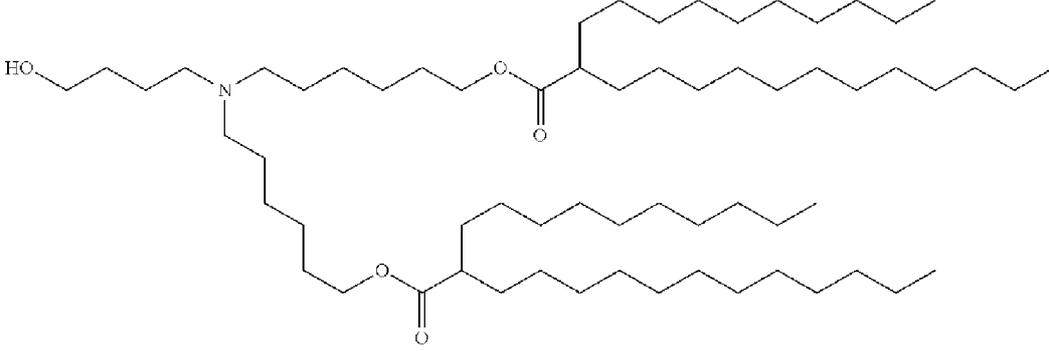
Номер	Структура
1	
2	
3	

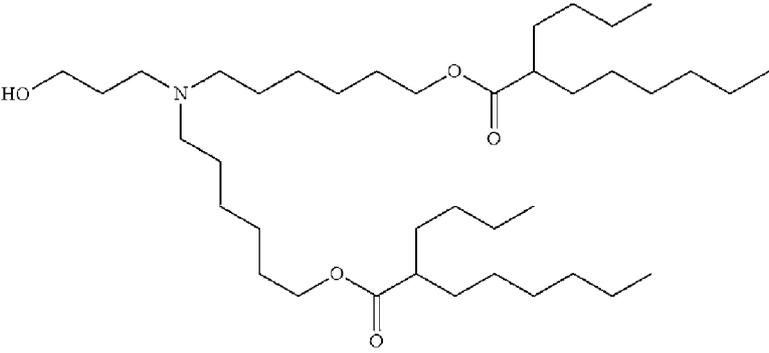
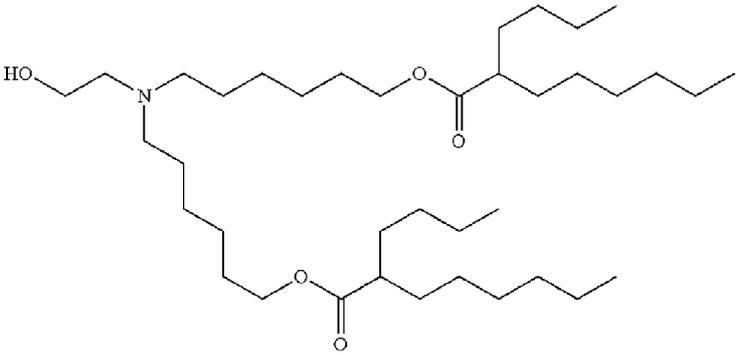
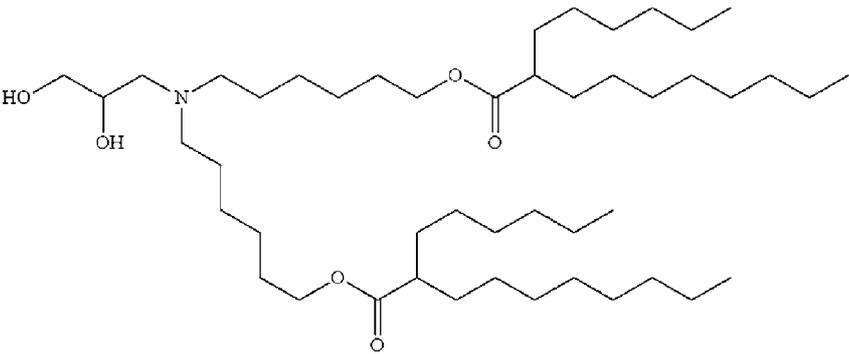
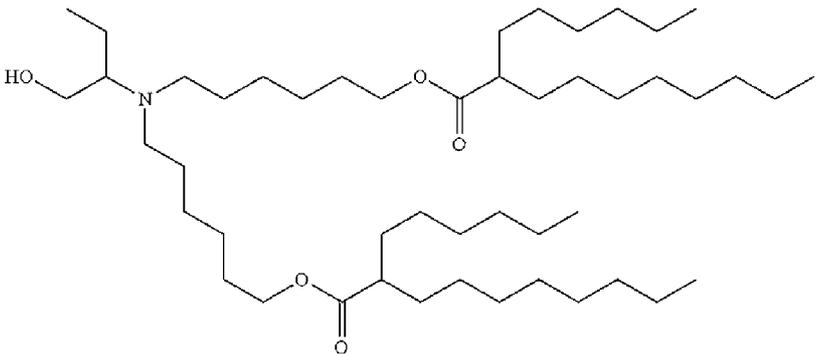
4	<p>Chemical structure 4: A tertiary amine with a 4-hydroxybutyl group and two 6-octylhexyl chains. The nitrogen is bonded to a 4-hydroxybutyl group, a 6-octylhexyl chain, and another 6-octylhexyl chain via an ether linkage (-O-).</p>
5	<p>Chemical structure 5: A tertiary amine with a 4-hydroxybutyl group and two 6-octylhexyl chains. The nitrogen is bonded to a 4-hydroxybutyl group, a 6-octylhexyl chain, and another 6-octylhexyl chain via an ether linkage (-O-).</p>
6	<p>Chemical structure 6: A tertiary amine with a 2-hydroxyethyl group and two 6-octylhexyl chains. The nitrogen is bonded to a 2-hydroxyethyl group, a 6-octylhexyl chain, and another 6-octylhexyl chain via an ether linkage (-O-).</p>
7	<p>Chemical structure 7: A tertiary amine with a 6-hydroxyhexyl group and two 6-octylhexyl chains. The nitrogen is bonded to a 6-hydroxyhexyl group, a 6-octylhexyl chain, and another 6-octylhexyl chain via an ether linkage (-O-).</p>

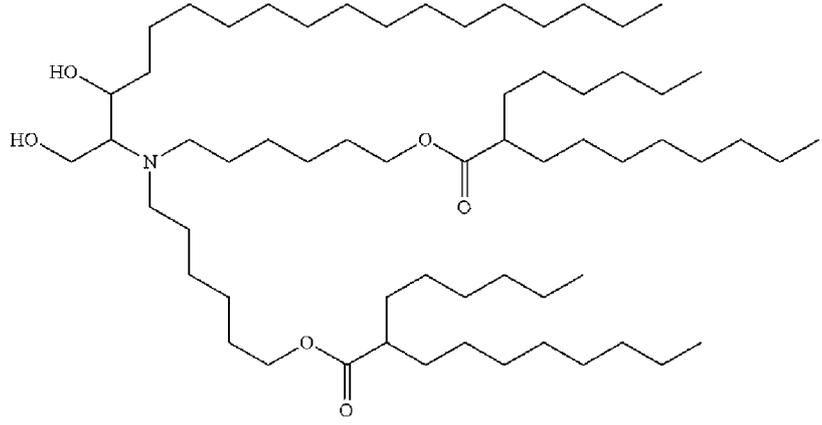
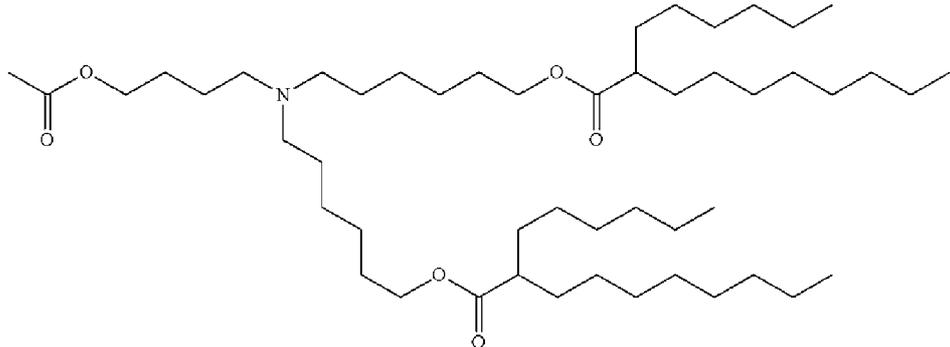
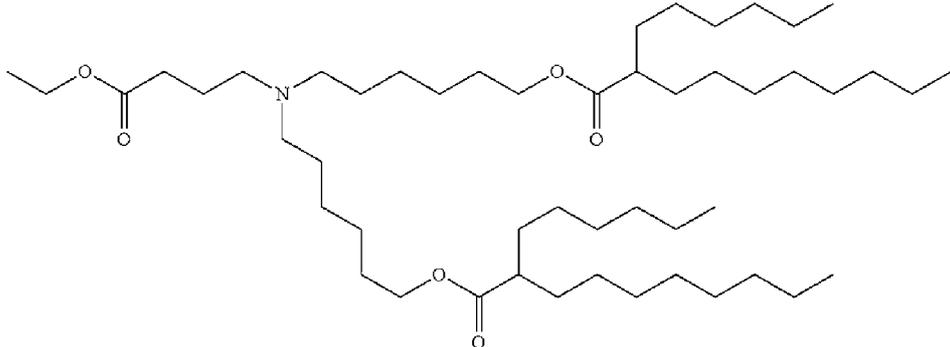
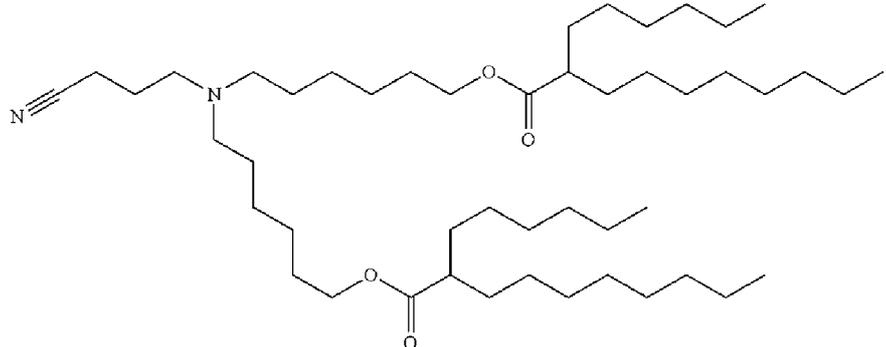
8	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(CCCCCCO)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>
9	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(C1CCCCC1O)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>
10	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(CCO)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>
11	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(CCO)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>
12	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(CCO)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>

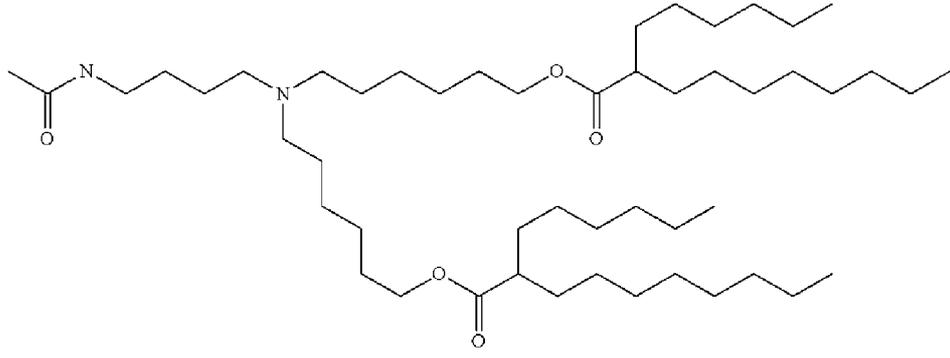
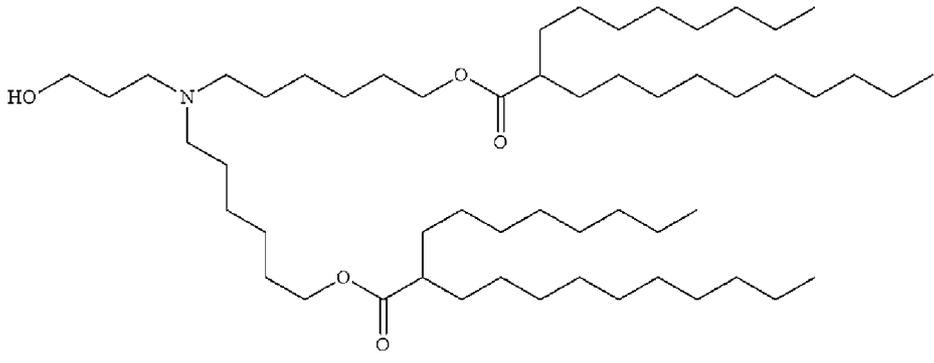
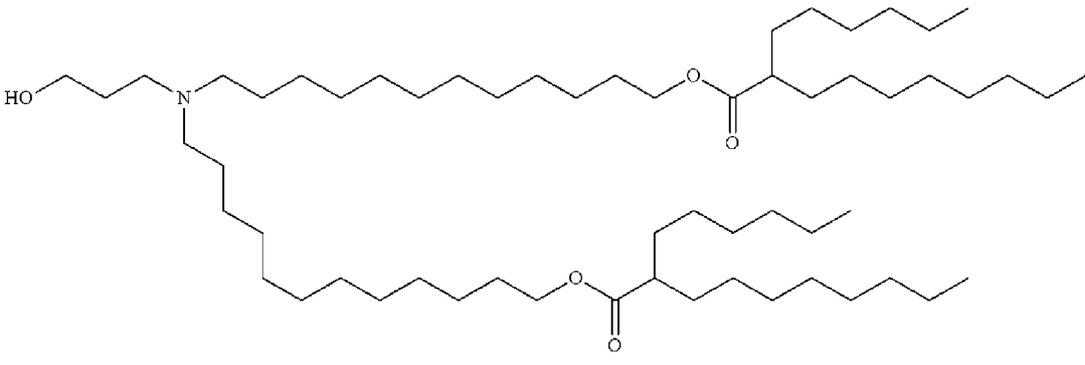
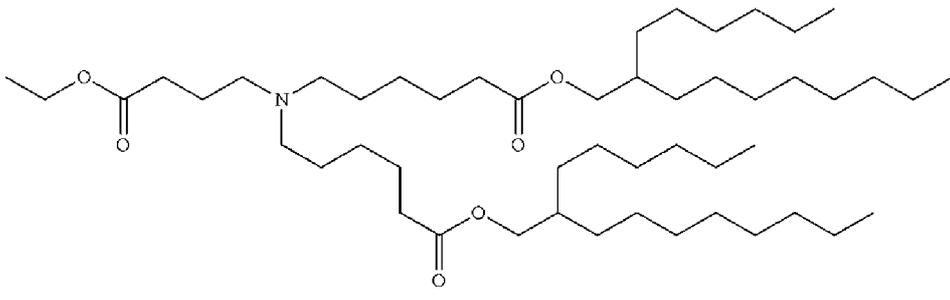
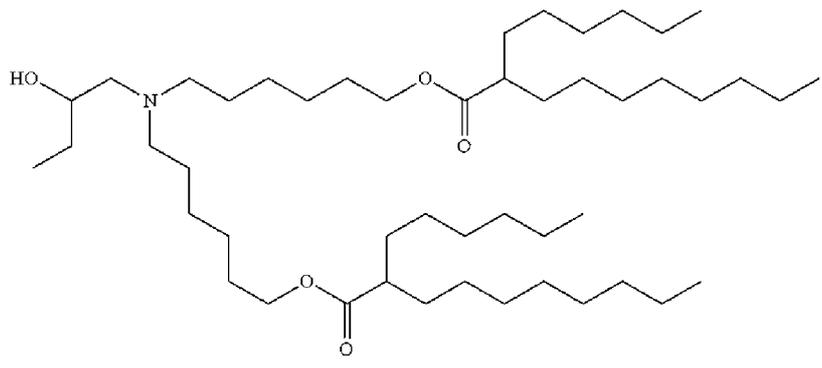
13	 <chem>CCCCCCCCOC(=O)CCN(CCO)CC(=O)OCCCCCCCC</chem>
14	 <chem>CCCCCCCCOC(=O)CCN(CCO)CC(=O)OCCCCCCCC</chem>
15	 <chem>CCCCCCCCOC(=O)CCN(CCO)CC(=O)OCCCCCCCC</chem>
16	 <chem>CCCCCCCCOC(=O)CCN(CCO)CC(=O)OCCCCCCCC</chem>
17	 <chem>CCCCCCCCOC(=O)CCN(CCO)CC(=O)OCCCCCCCC</chem>
18	 <chem>CCCCCCCCOC(=O)CCN(CCO)CC(=O)OCCCCCCCC</chem>

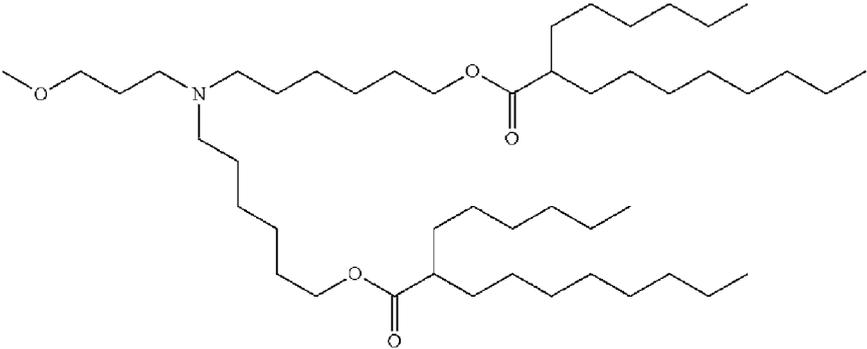
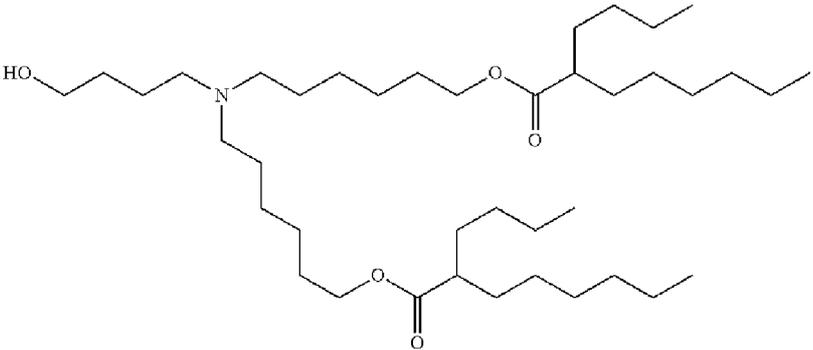
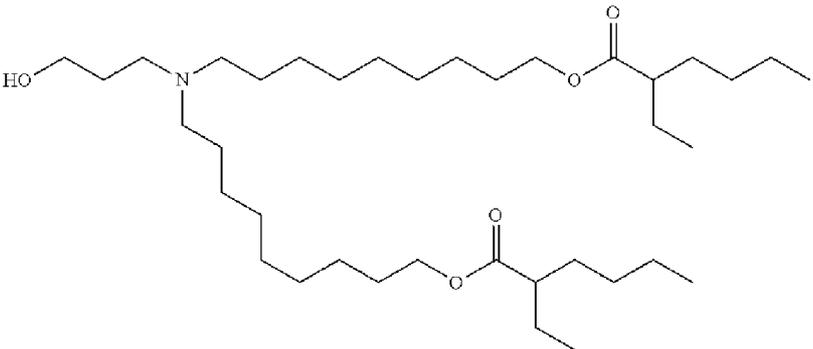
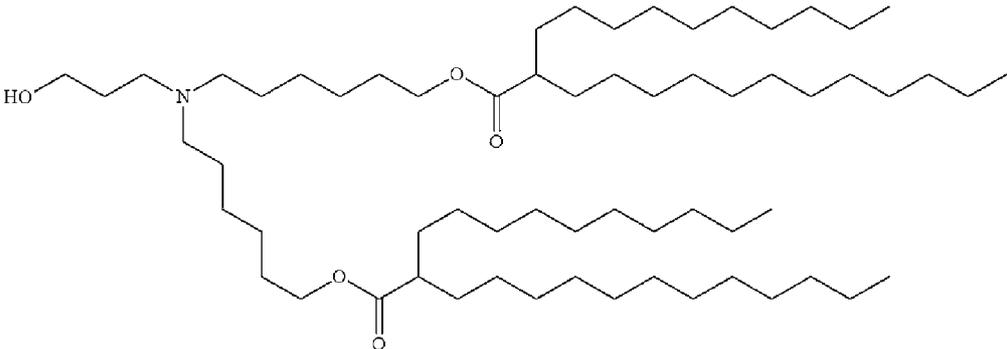
19	 <chem>CCCCOCCN(CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>
20	 <chem>CCCCOCCN(CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>
21	 <chem>CCCCOCCN(CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>
22	 <chem>CCCCOCCN(CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>
23	 <chem>CCCCOCCN(CCCCCCCCCCCC)CCCCCCCCCCCC(=O)OCCCCCCCCCCCC</chem>

24	
25	
26	
27	

28	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(CCCO)CCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCC</chem>
29	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(CCCO)CCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCC</chem>
30	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(C(C)O)CCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCC</chem>
31	 <chem>CCCCCCCCCCCCN(C(C)O)CCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCC</chem>

32	 <p>Chemical structure 32: A tertiary amine with a 1-hydroxyethyl group, a 2-hydroxyethyl group, and a decyl chain. The nitrogen is also bonded to a decyl chain, a decyl ester, and another decyl ester.</p>
33	 <p>Chemical structure 33: A tertiary amine with an ethyl ester, a decyl chain, and a decyl ester. The nitrogen is also bonded to a decyl chain, a decyl ester, and another decyl ester.</p>
34	 <p>Chemical structure 34: A tertiary amine with an ethyl ester, a decyl chain, and a decyl ester. The nitrogen is also bonded to a decyl chain, a decyl ester, and another decyl ester.</p>
35	 <p>Chemical structure 35: A tertiary amine with a 3-cyanopropyl group, a decyl chain, and a decyl ester. The nitrogen is also bonded to a decyl chain, a decyl ester, and another decyl ester.</p>

36	
37	
38	
39	
40	

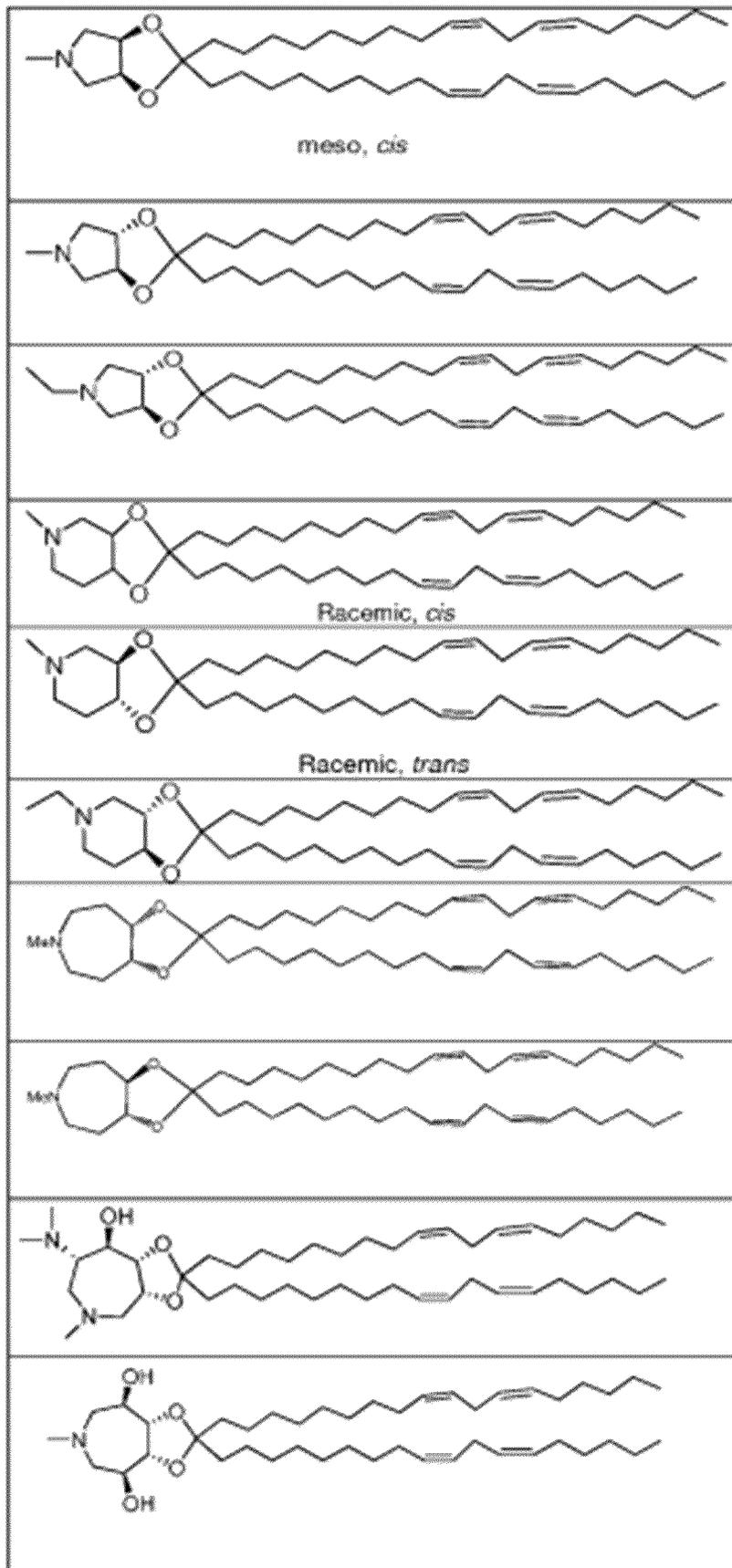
41	 <p>Chemical structure 41: A bis(alkyl)amine derivative. The central nitrogen atom is bonded to a 3-methoxypropyl group, a 10-undecyl chain, and a 6-hexyl chain. The 10-undecyl chain is further substituted with a 2-ethylhexanoate ester group. The 6-hexyl chain is substituted with a 2-ethylhexanoate ester group.</p>
42	 <p>Chemical structure 42: A bis(alkyl)amine derivative. The central nitrogen atom is bonded to a 3-hydroxypropyl group, a 10-undecyl chain, and a 6-hexyl chain. The 10-undecyl chain is further substituted with a 2-ethylhexanoate ester group. The 6-hexyl chain is substituted with a 2-ethylhexanoate ester group.</p>
43	 <p>Chemical structure 43: A bis(alkyl)amine derivative. The central nitrogen atom is bonded to a 3-hydroxypropyl group, a 10-undecyl chain, and a 6-hexyl chain. The 10-undecyl chain is further substituted with a 2-ethylhexanoate ester group. The 6-hexyl chain is substituted with a 2-ethylhexanoate ester group.</p>
44	 <p>Chemical structure 44: A bis(alkyl)amine derivative. The central nitrogen atom is bonded to a 3-hydroxypropyl group, a 10-undecyl chain, and a 6-hexyl chain. The 10-undecyl chain is further substituted with a 2-ethylhexanoate ester group. The 6-hexyl chain is substituted with a 2-ethylhexanoate ester group.</p>

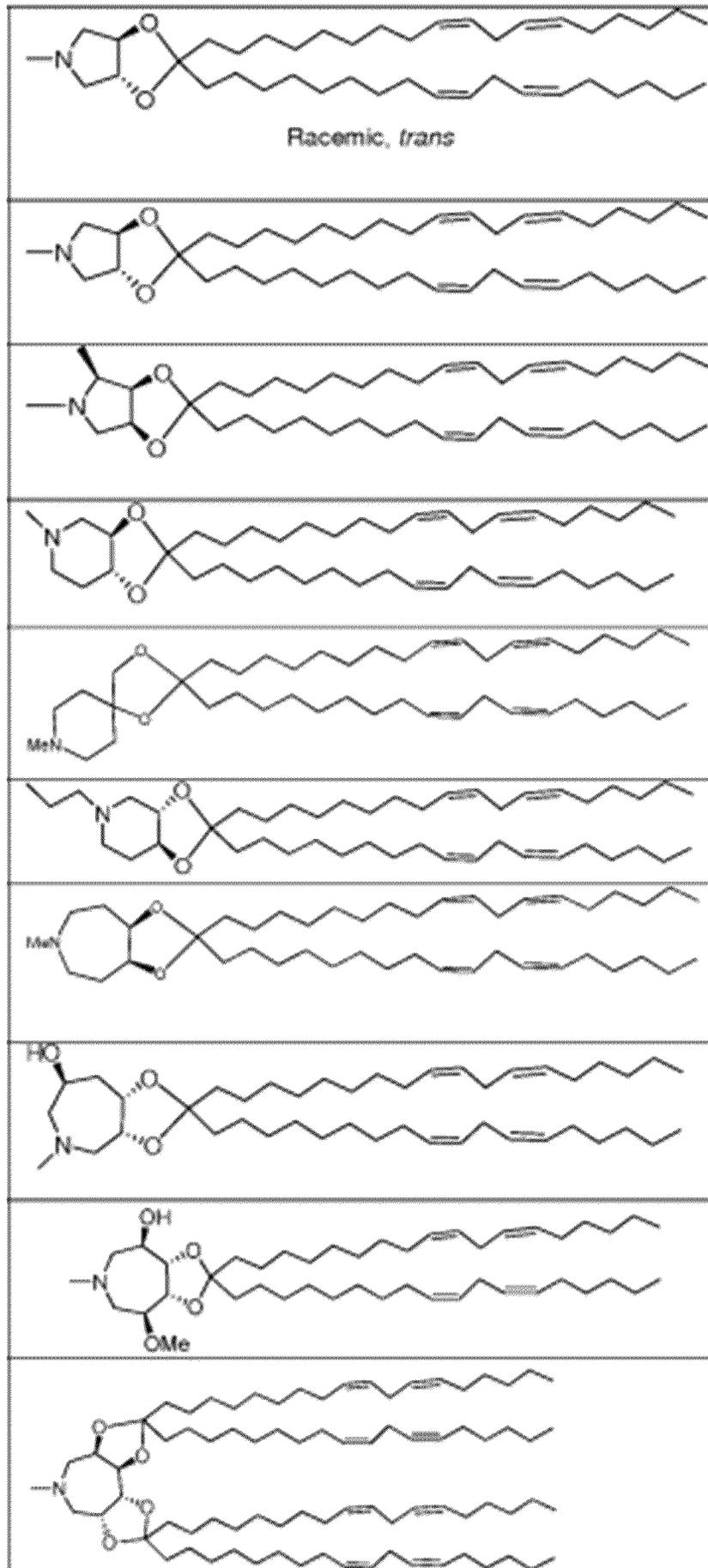
45	
46	
47	
48	
49	

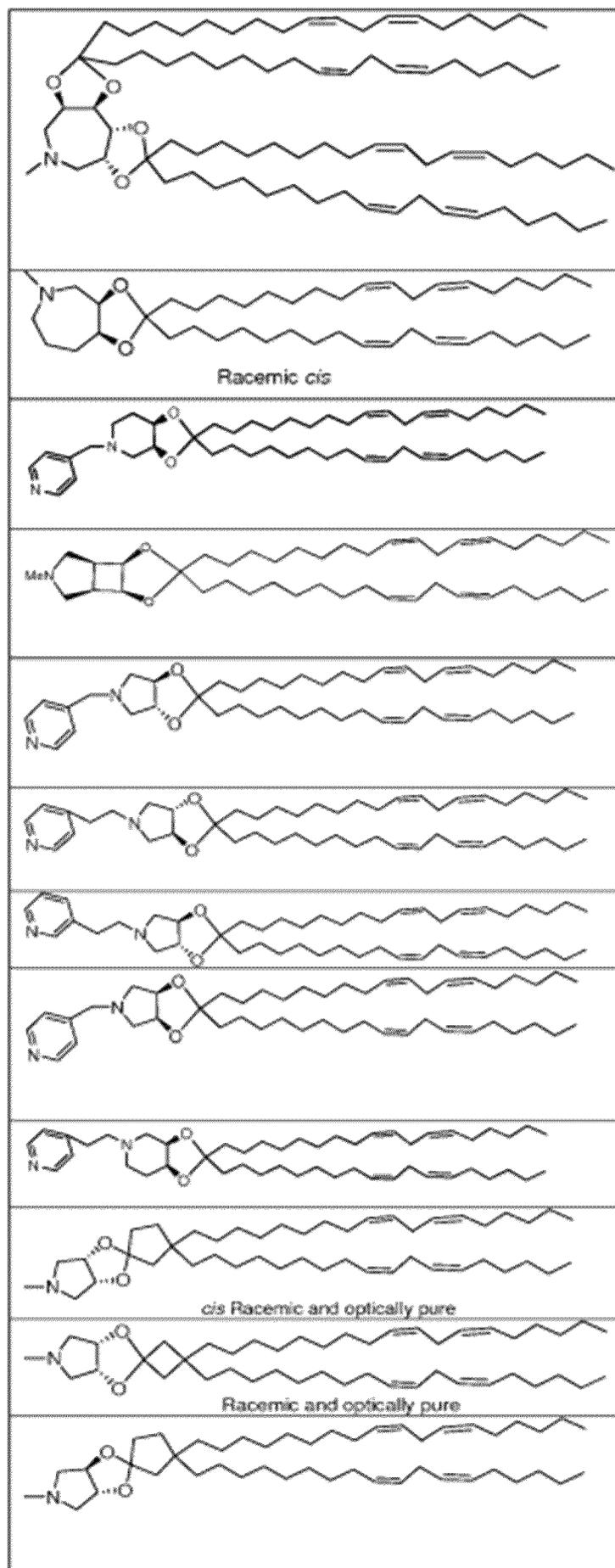
[0466] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет одну из структур, приведенных в таблице 11 ниже. В некоторых вариантах осуществления

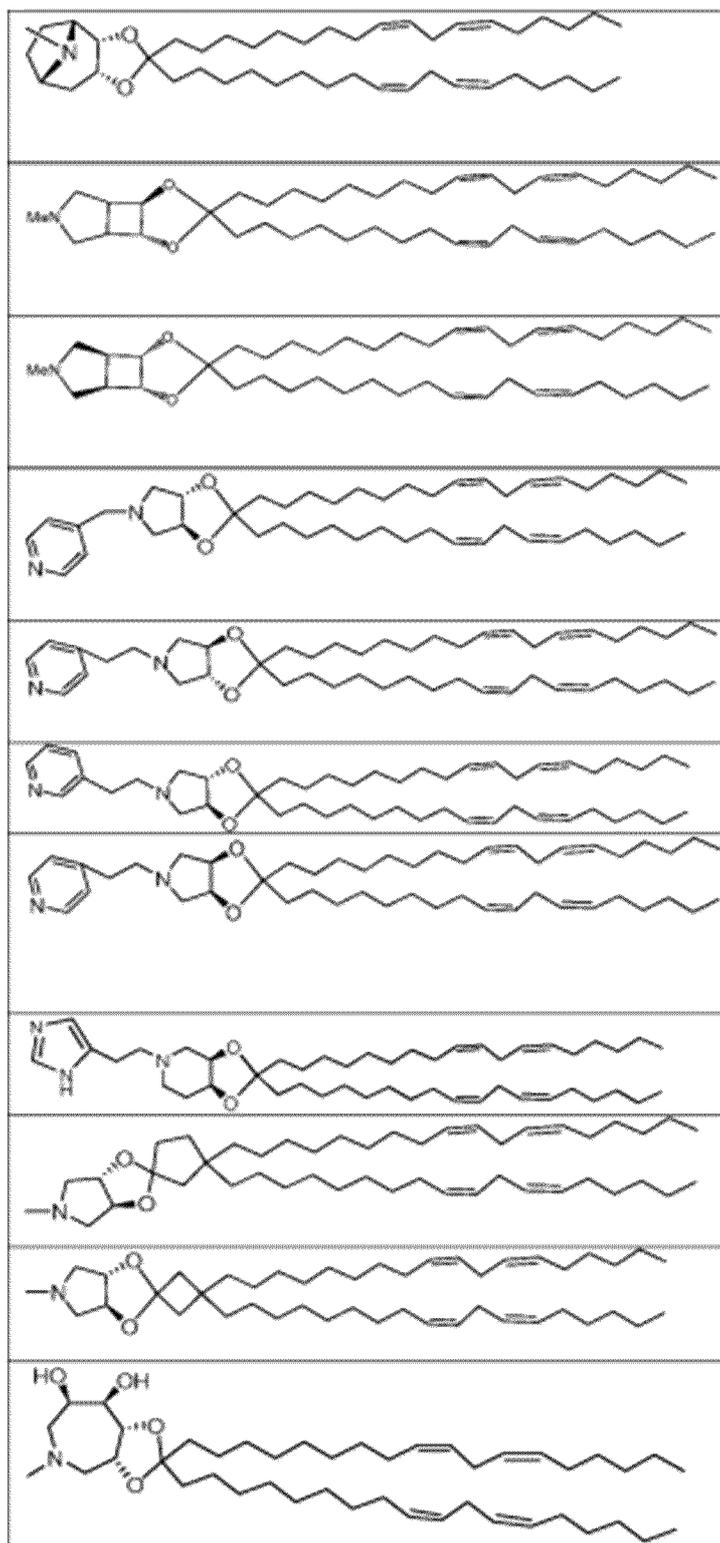
ионизируемый липид, приведенный в таблице 11, описан в международной заявке на патент PCT/US2010/061058.

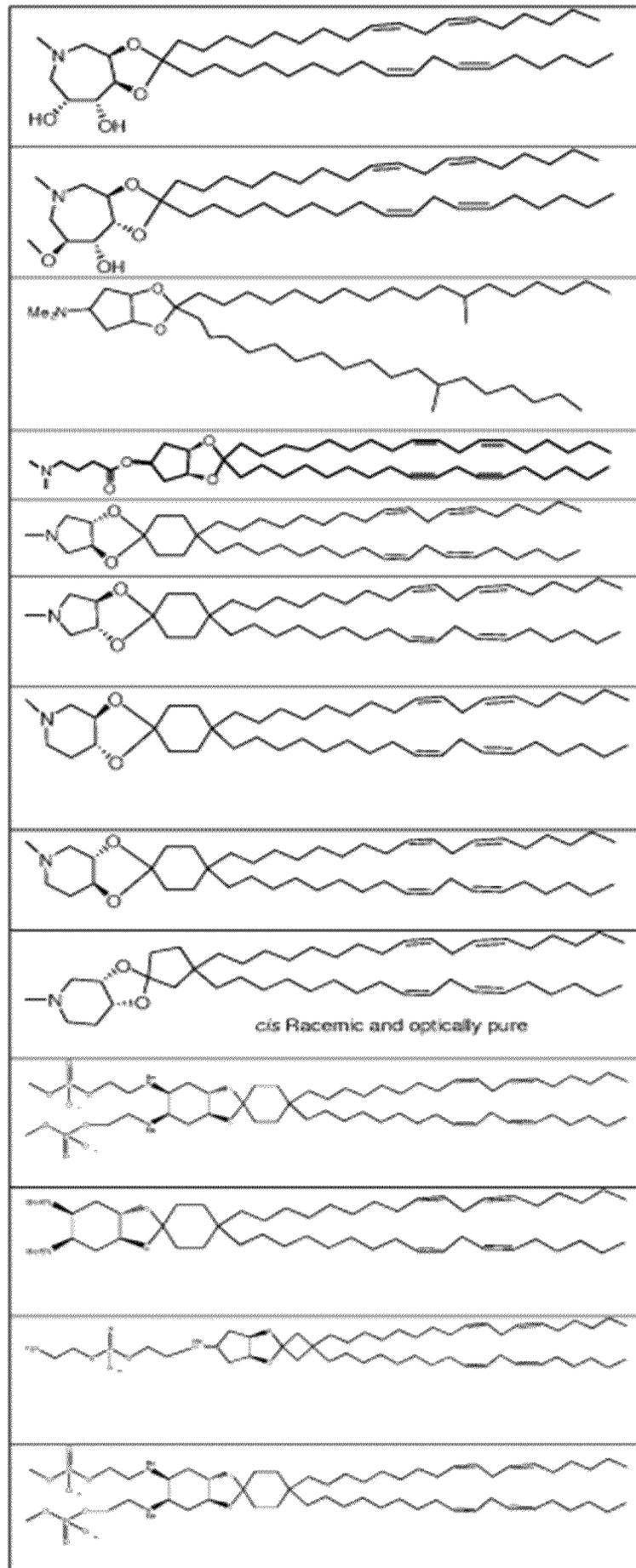
Таблица 11

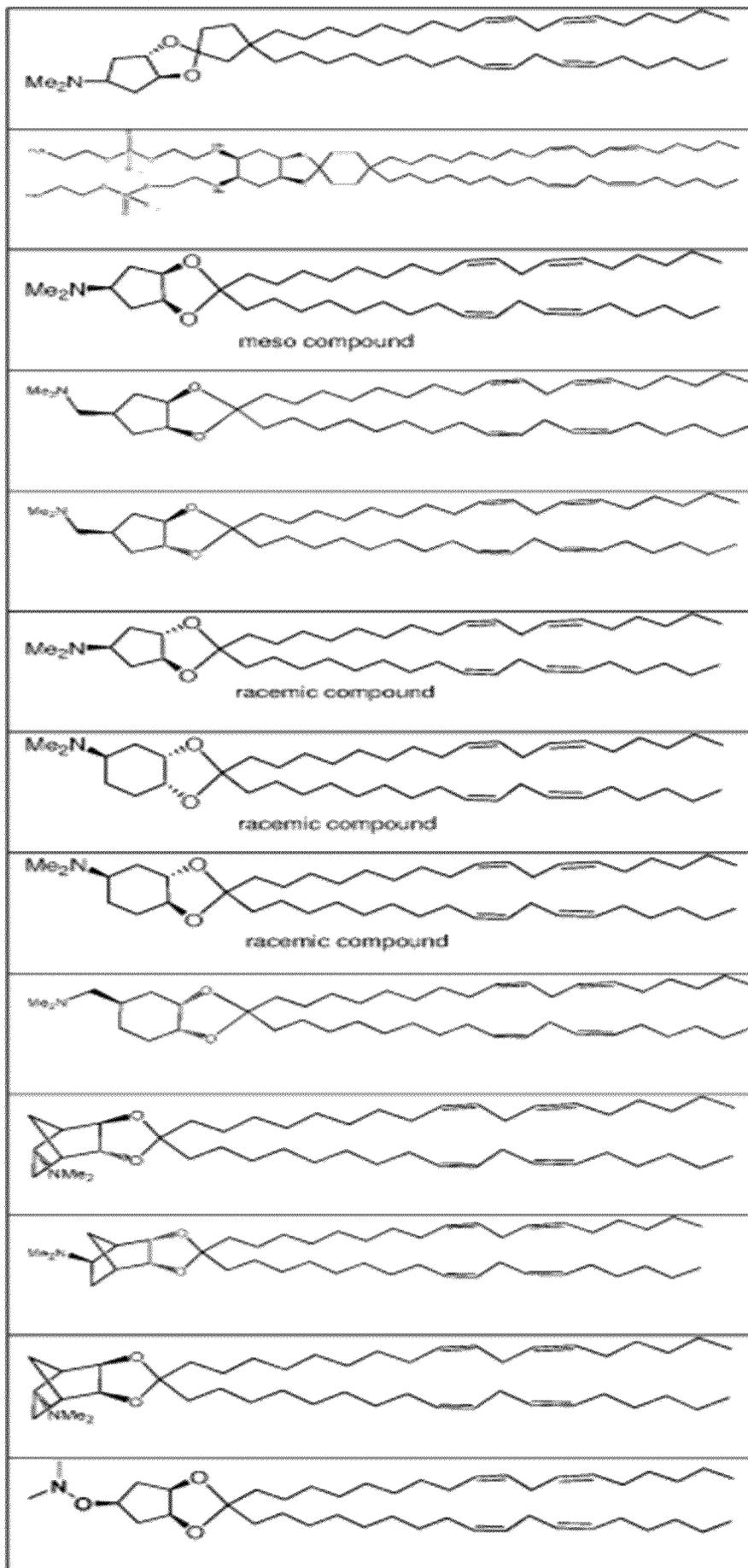


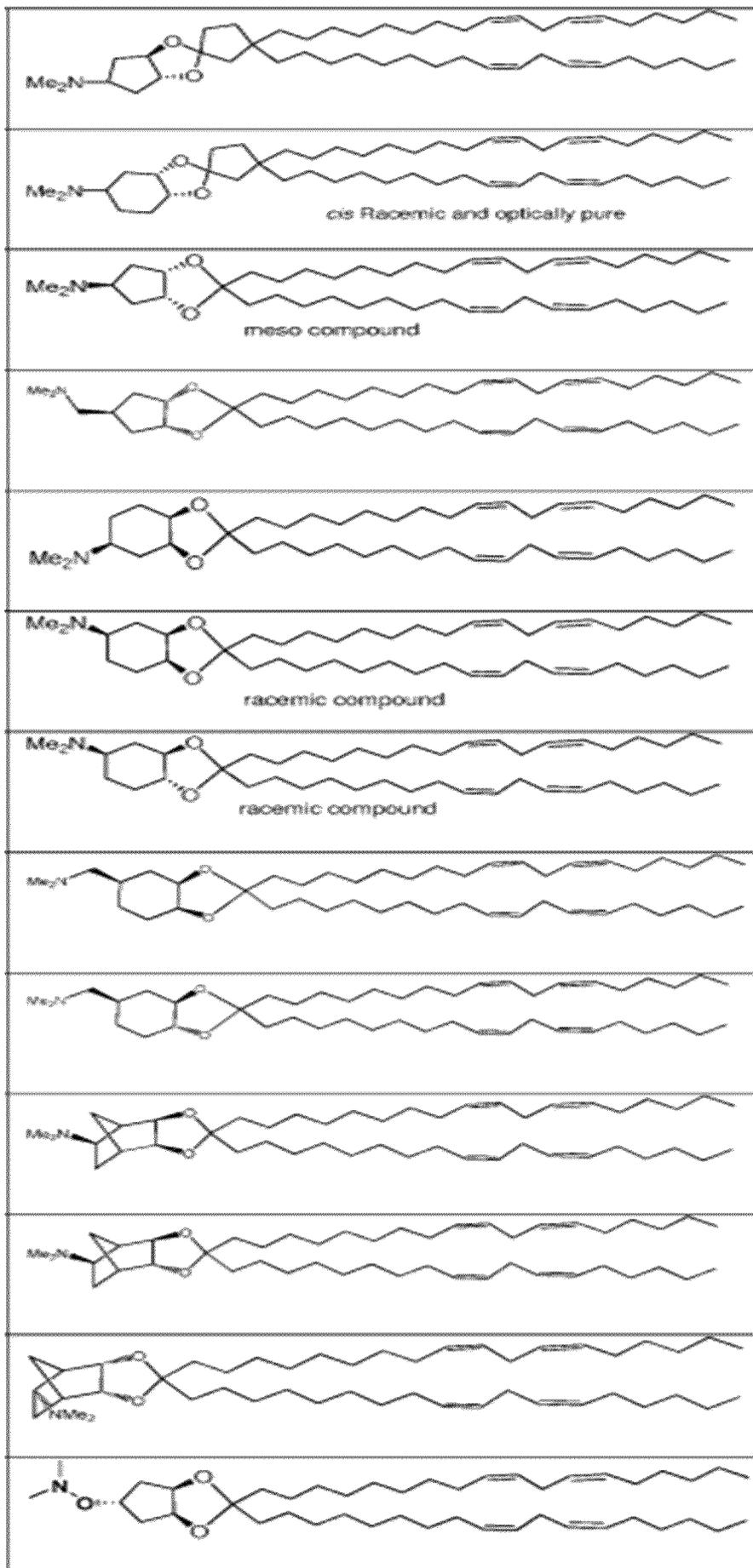


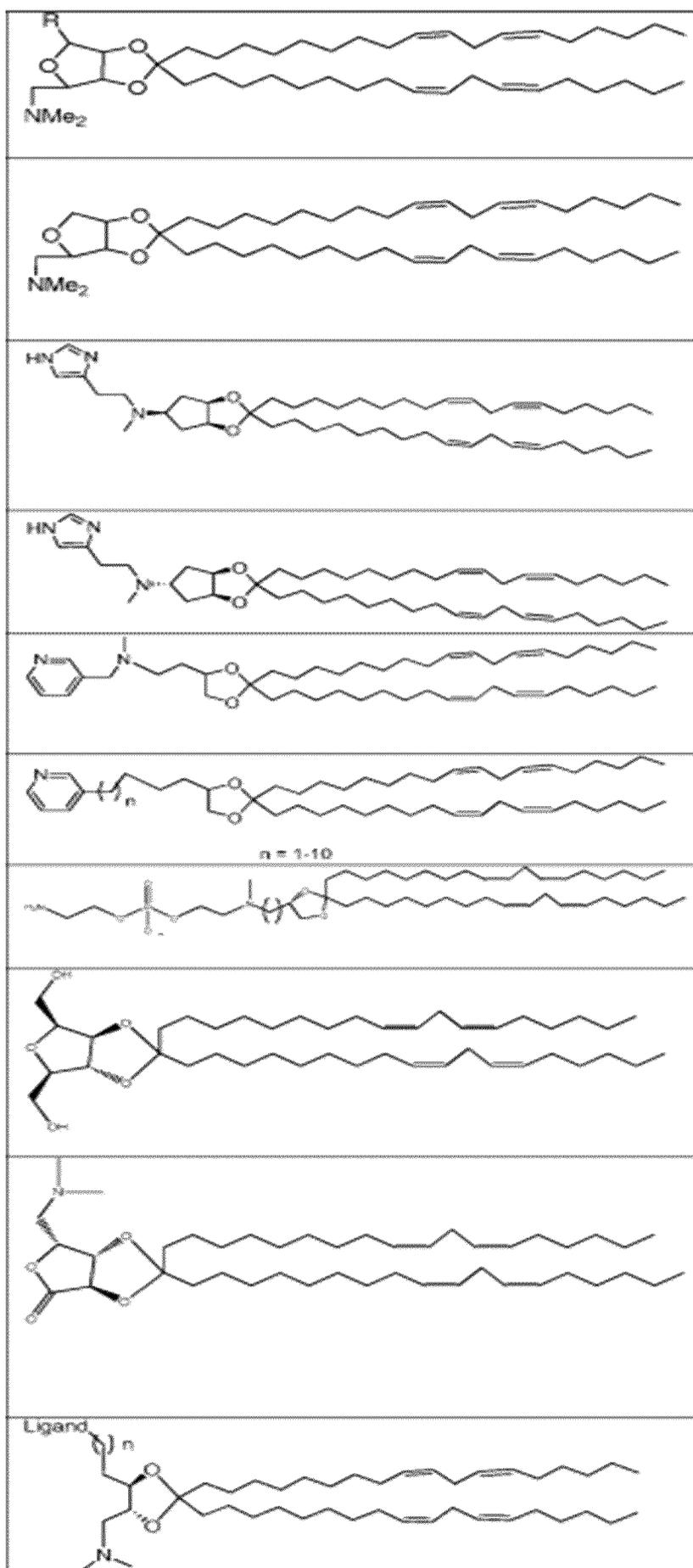


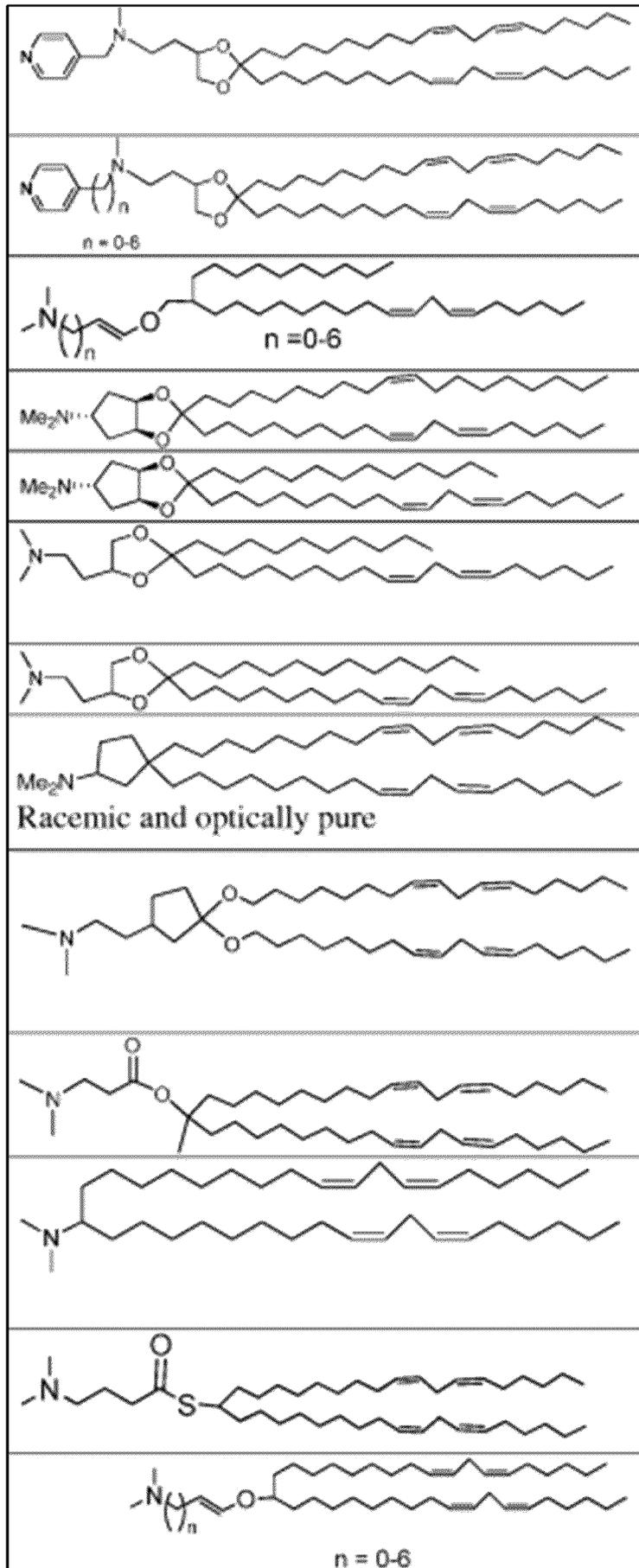


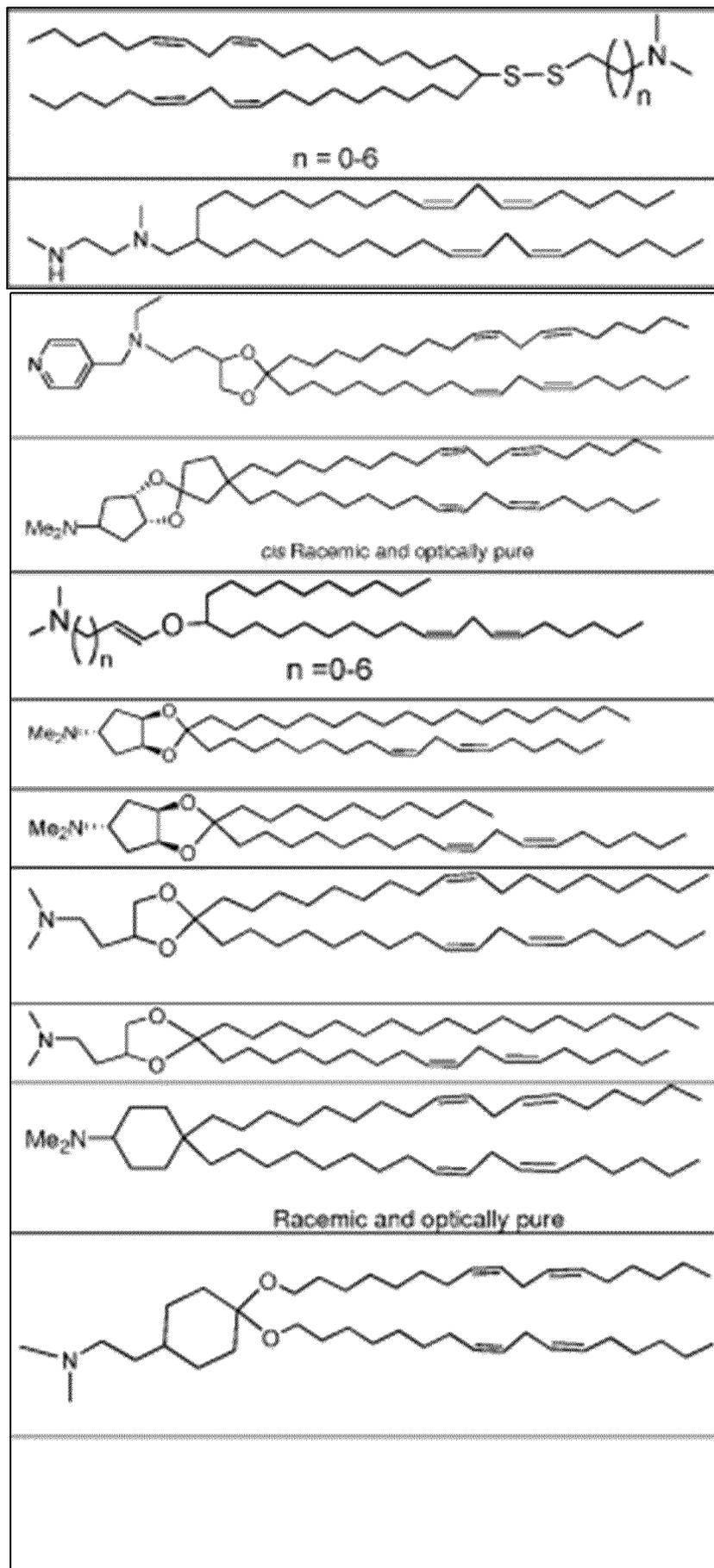


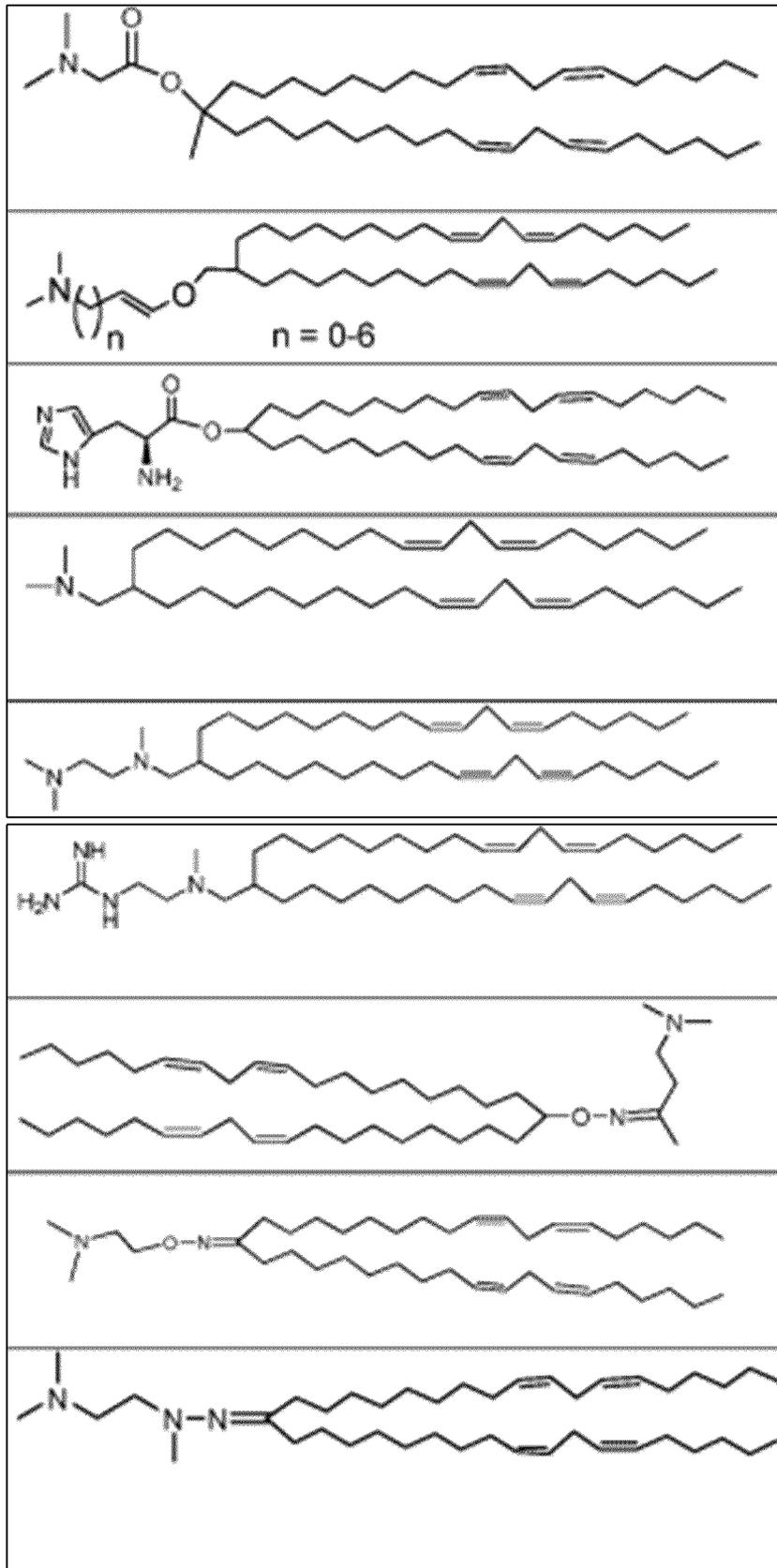


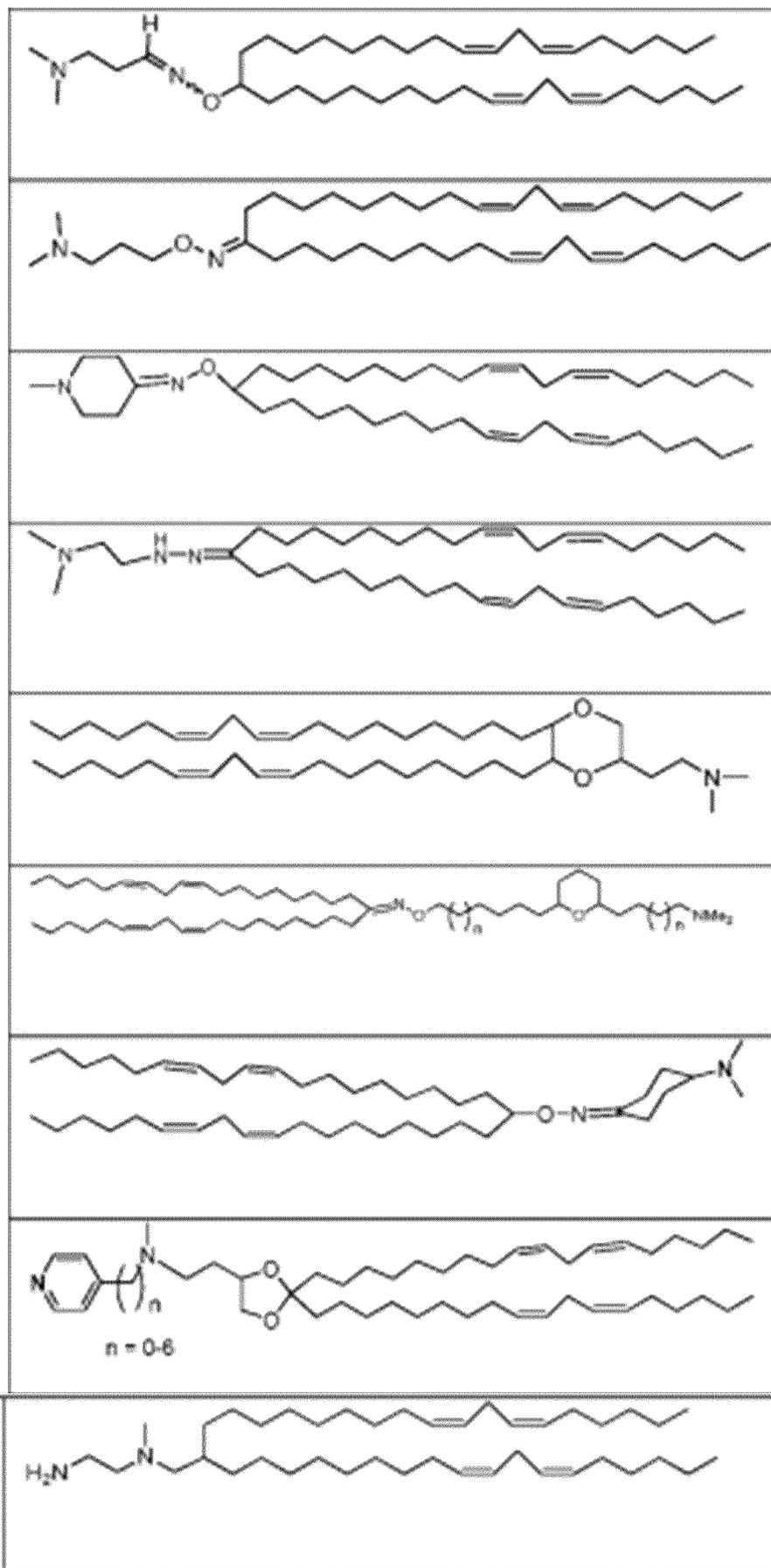


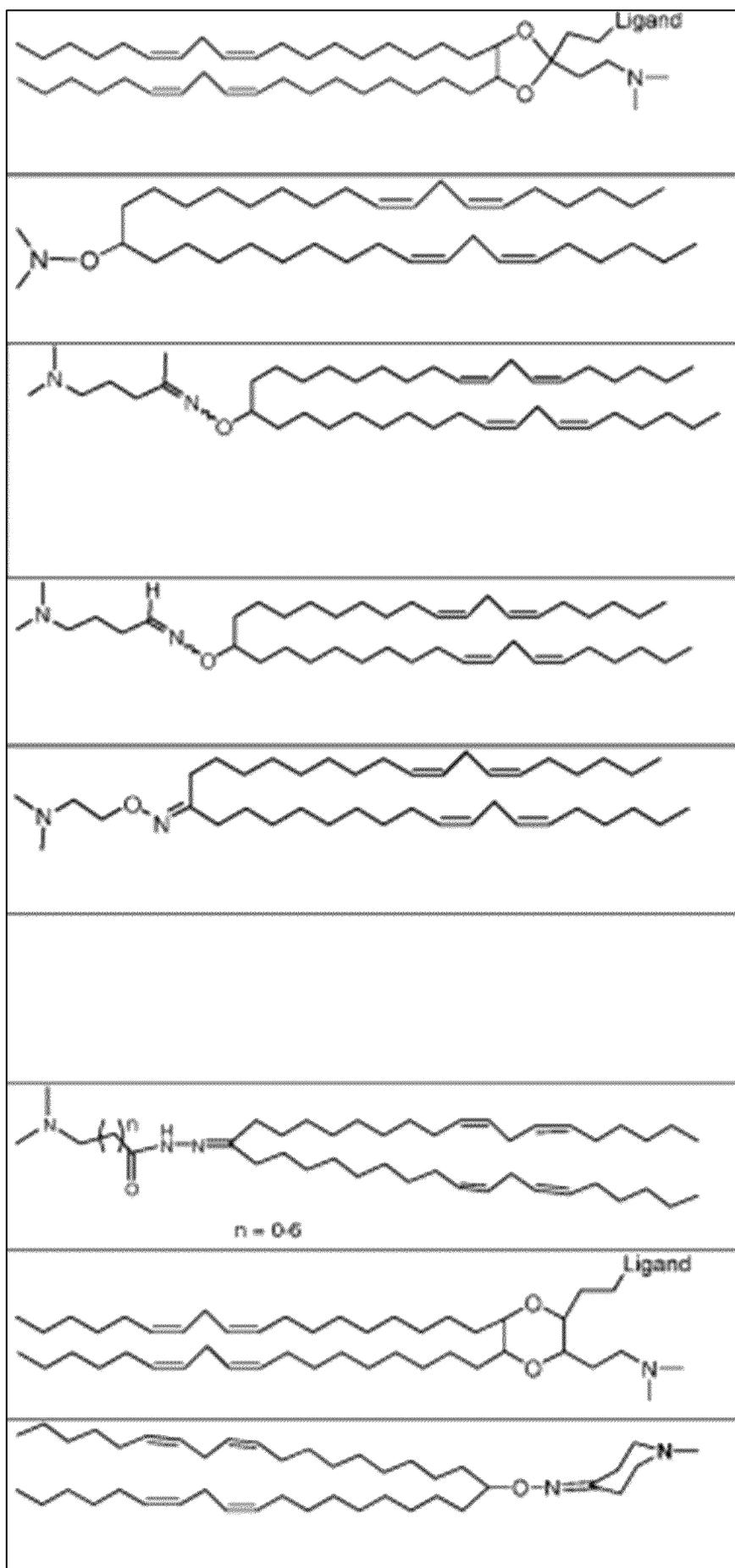


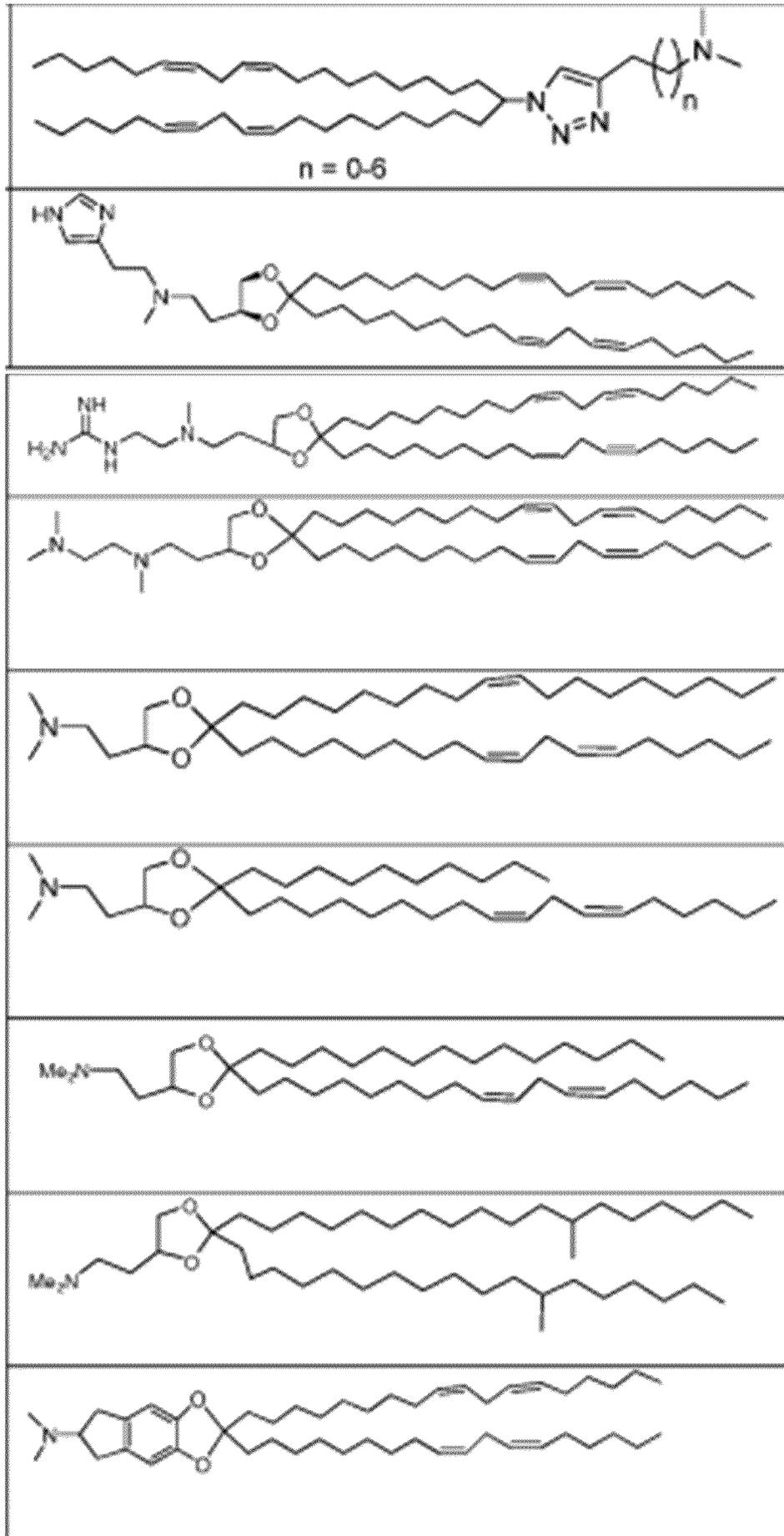


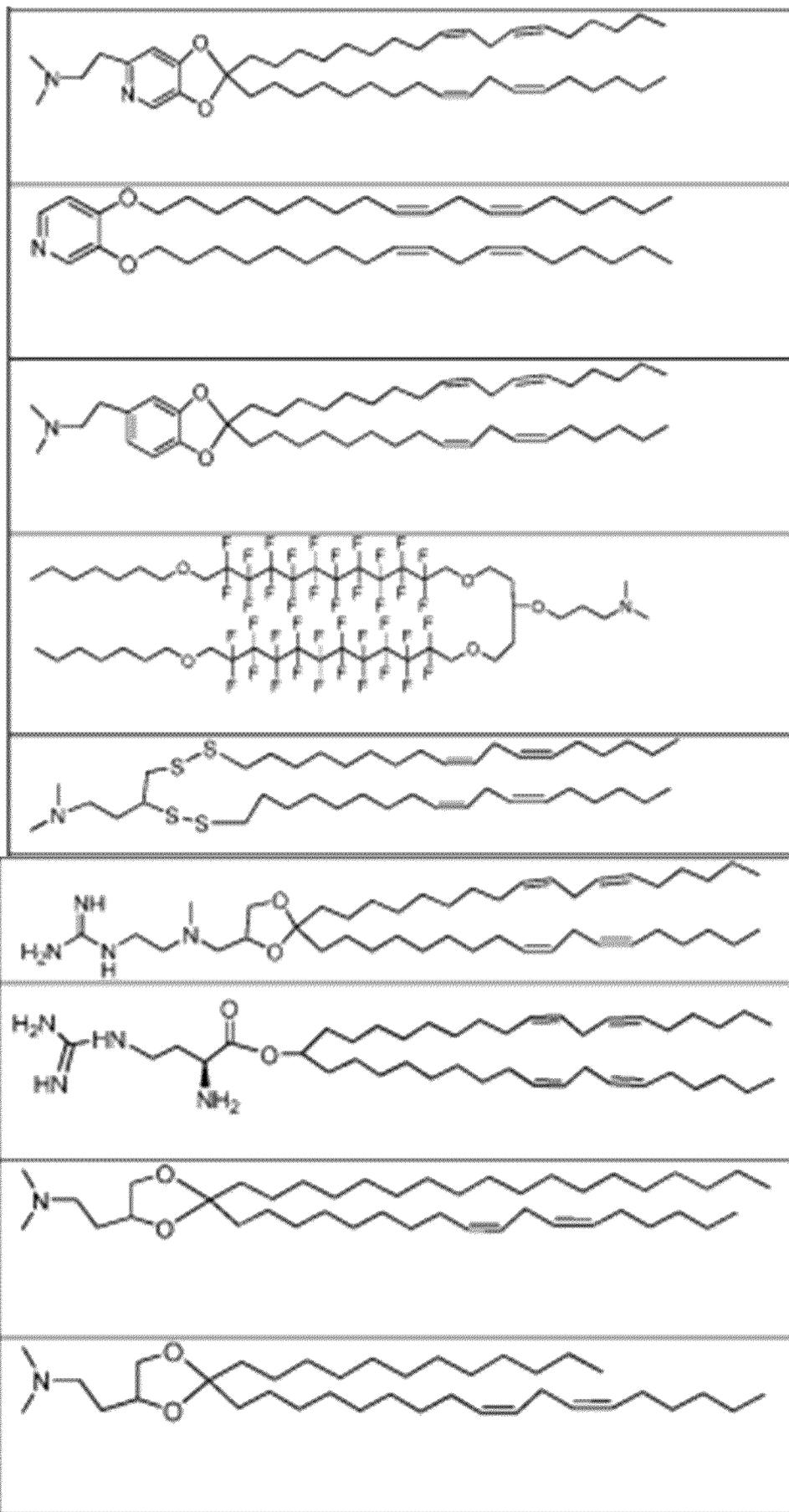


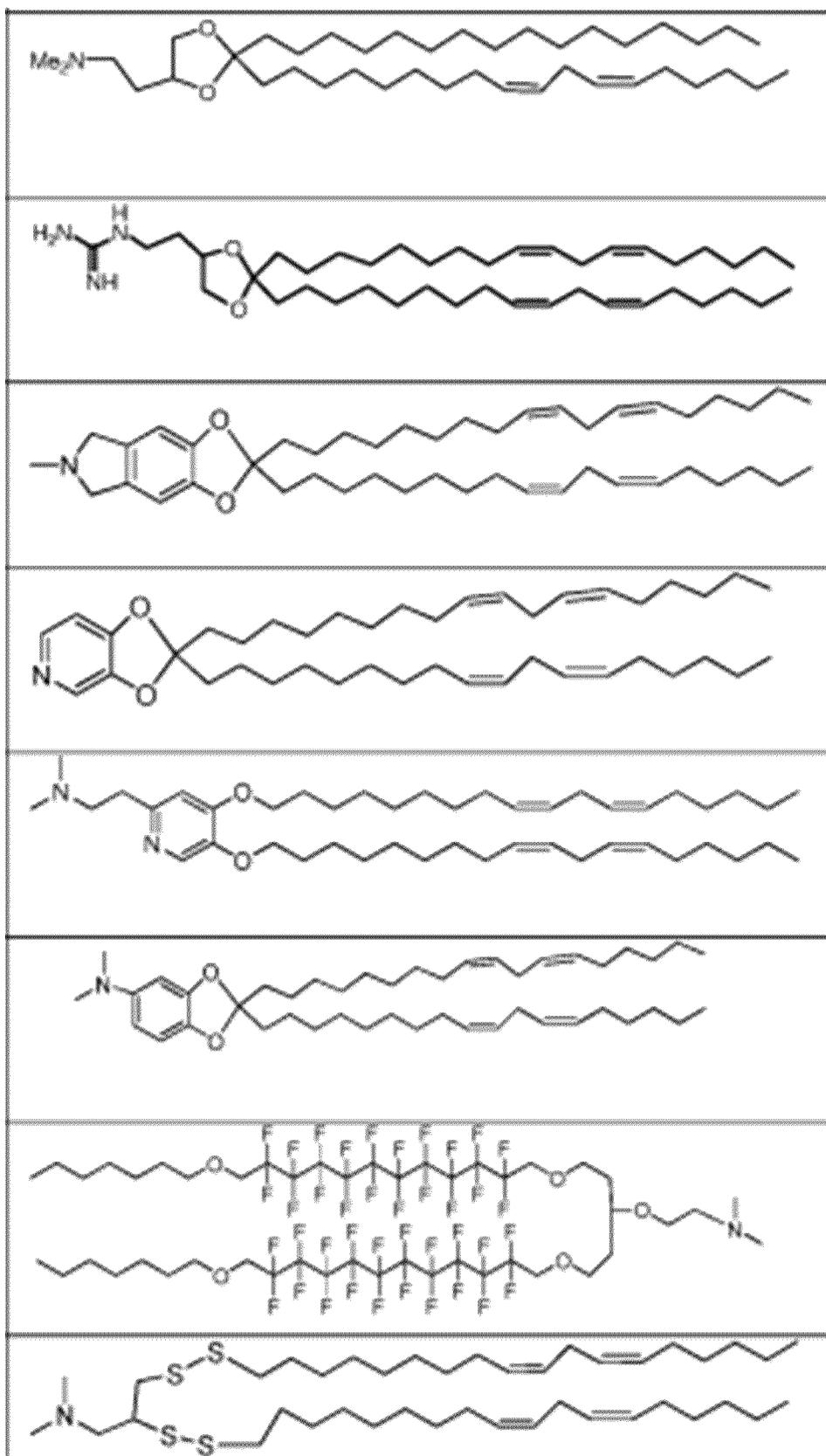


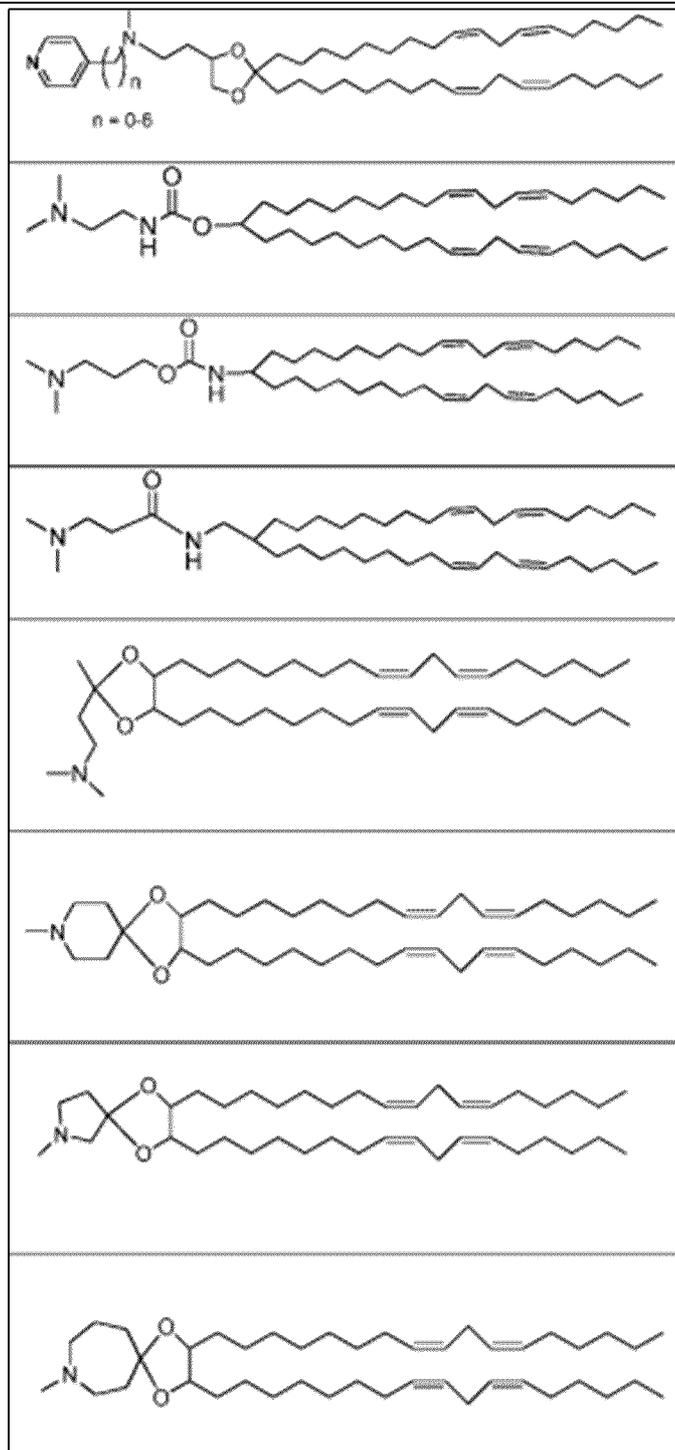
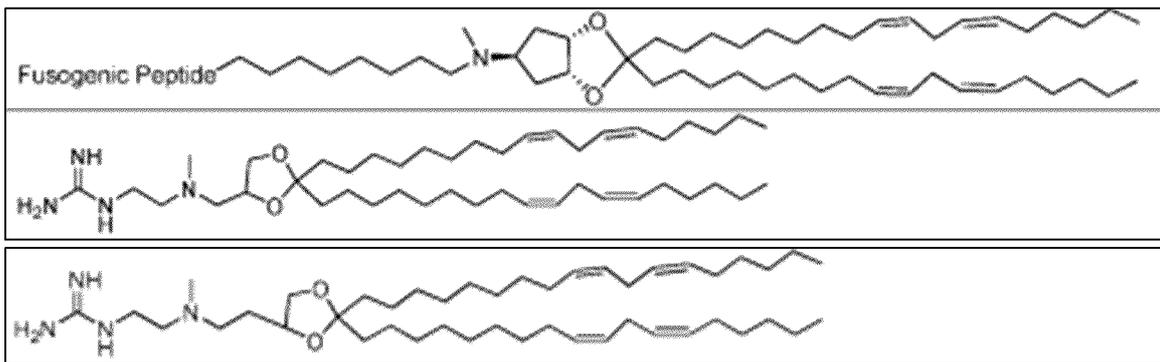


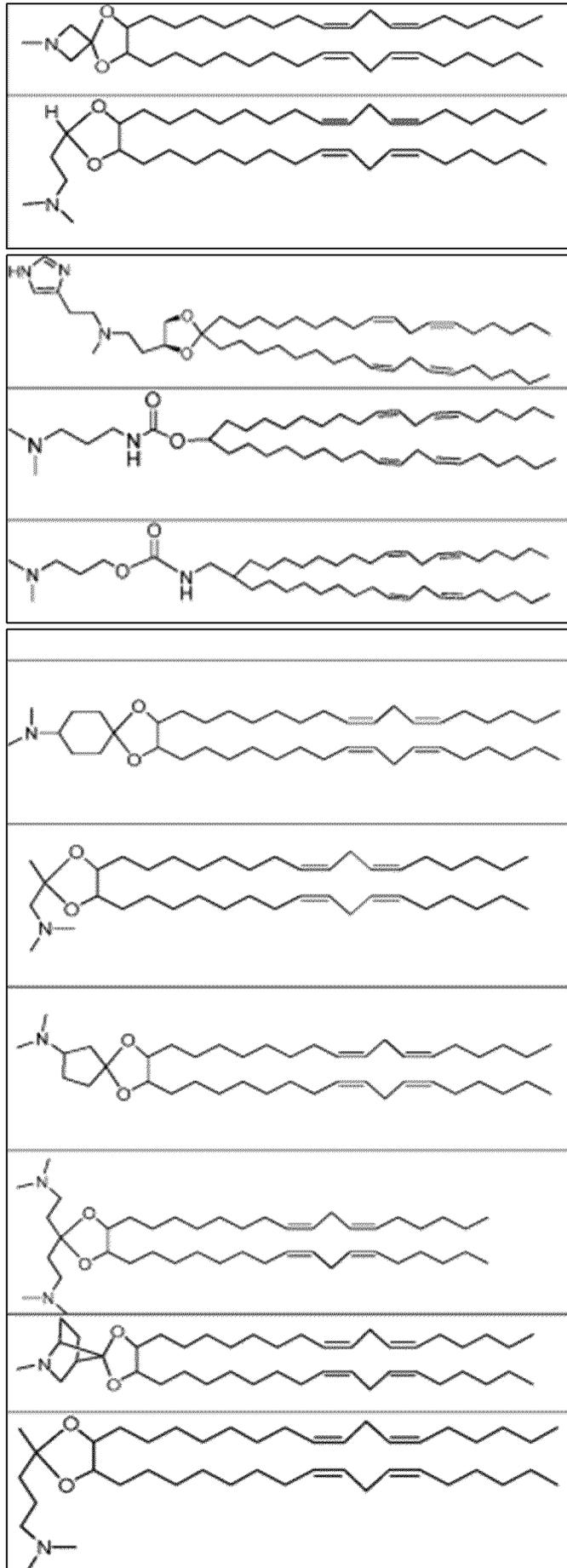


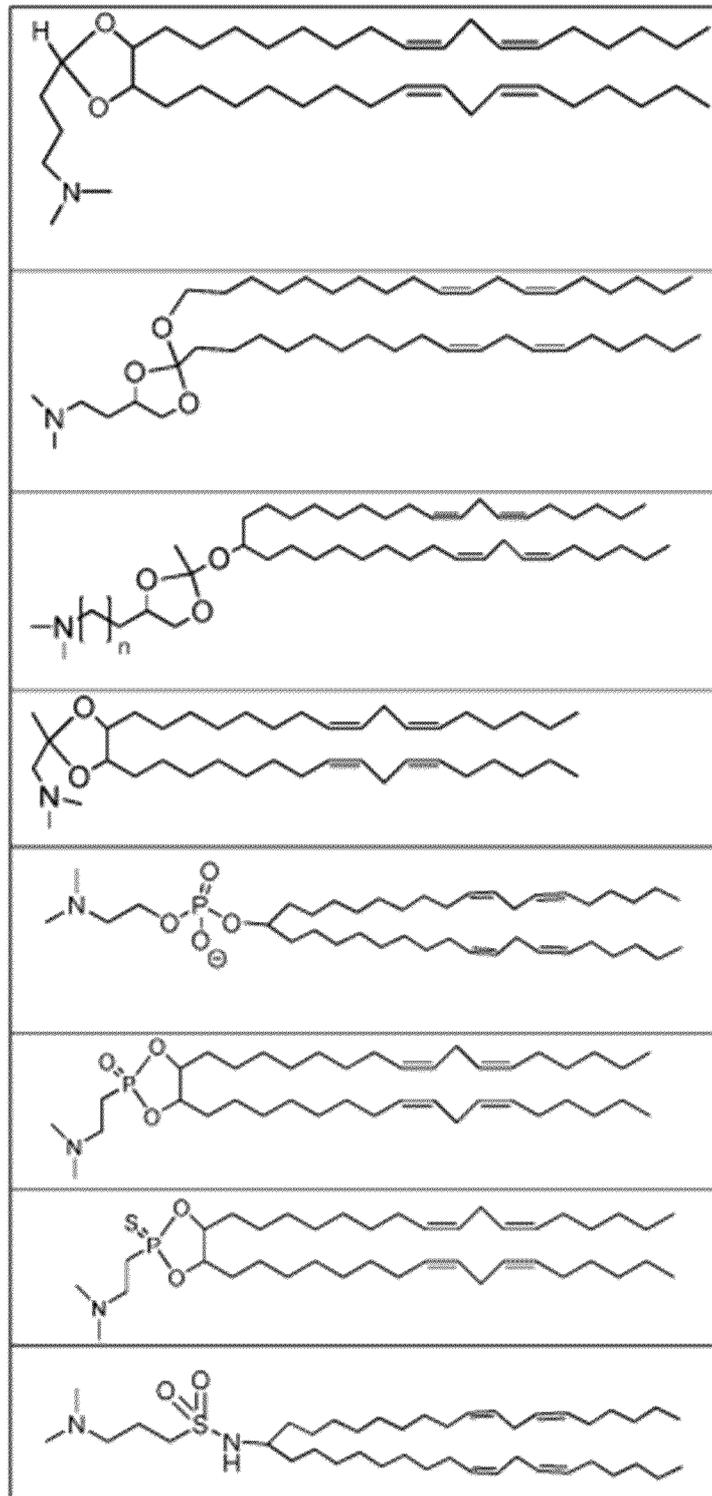


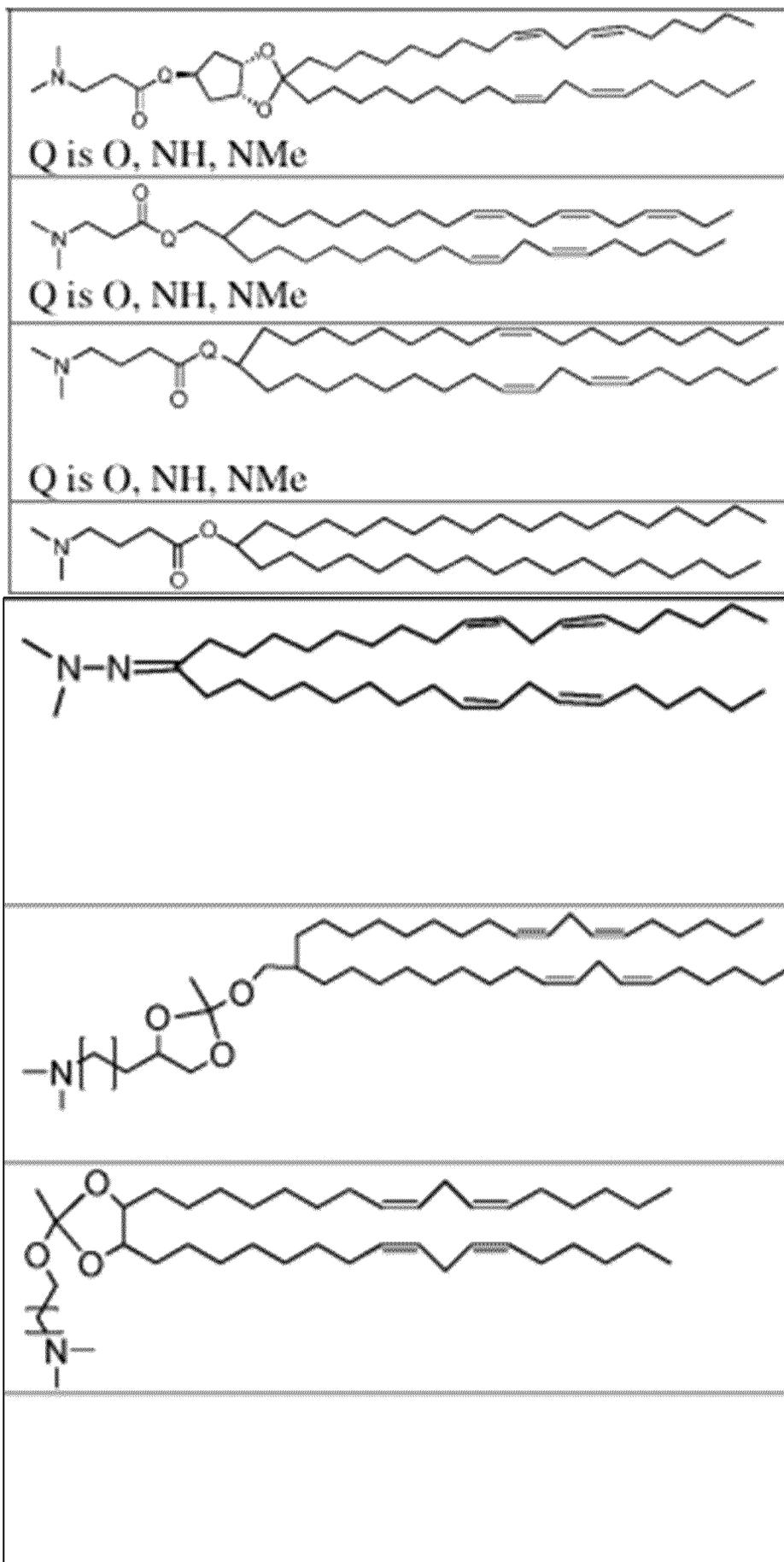


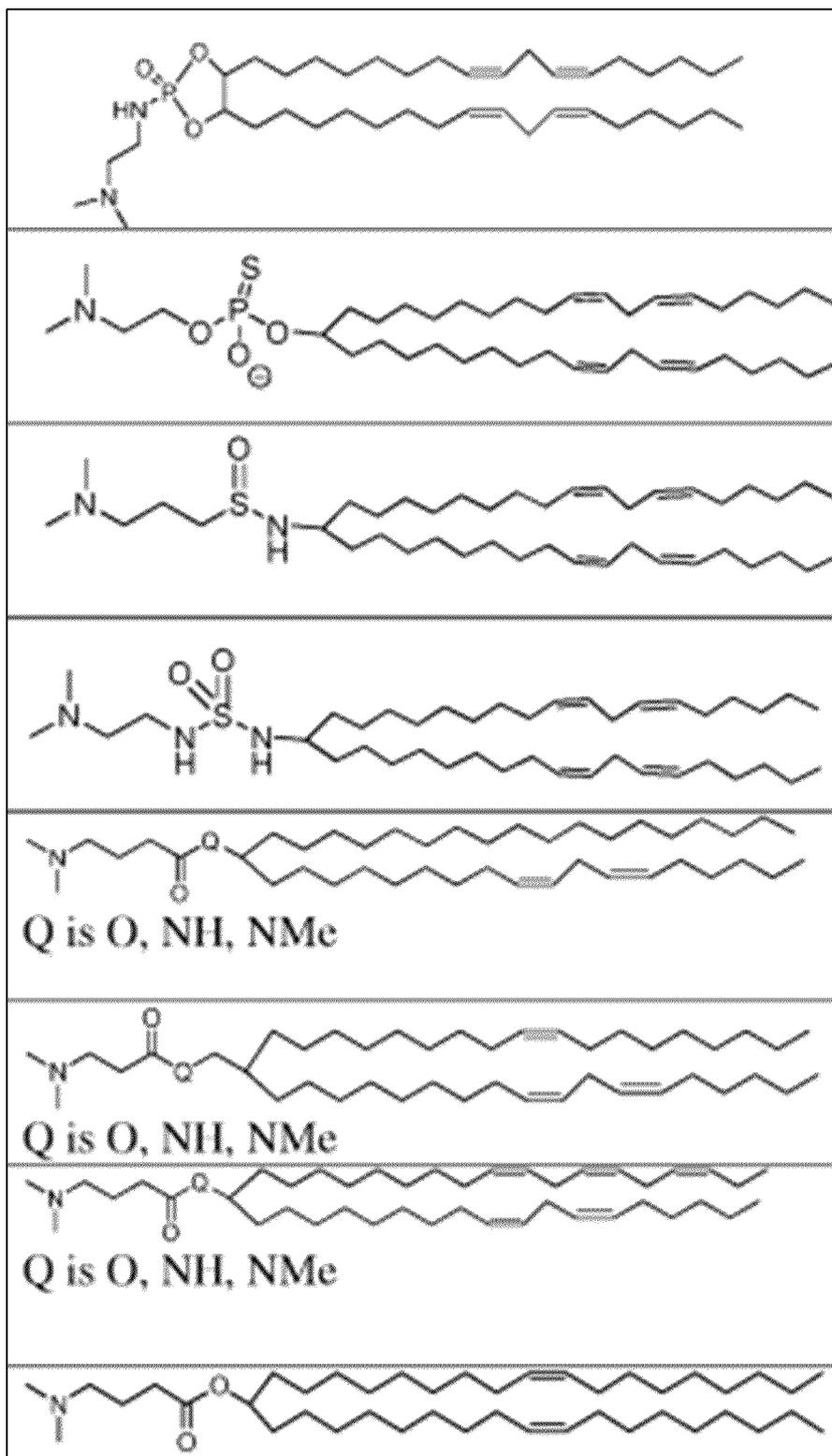


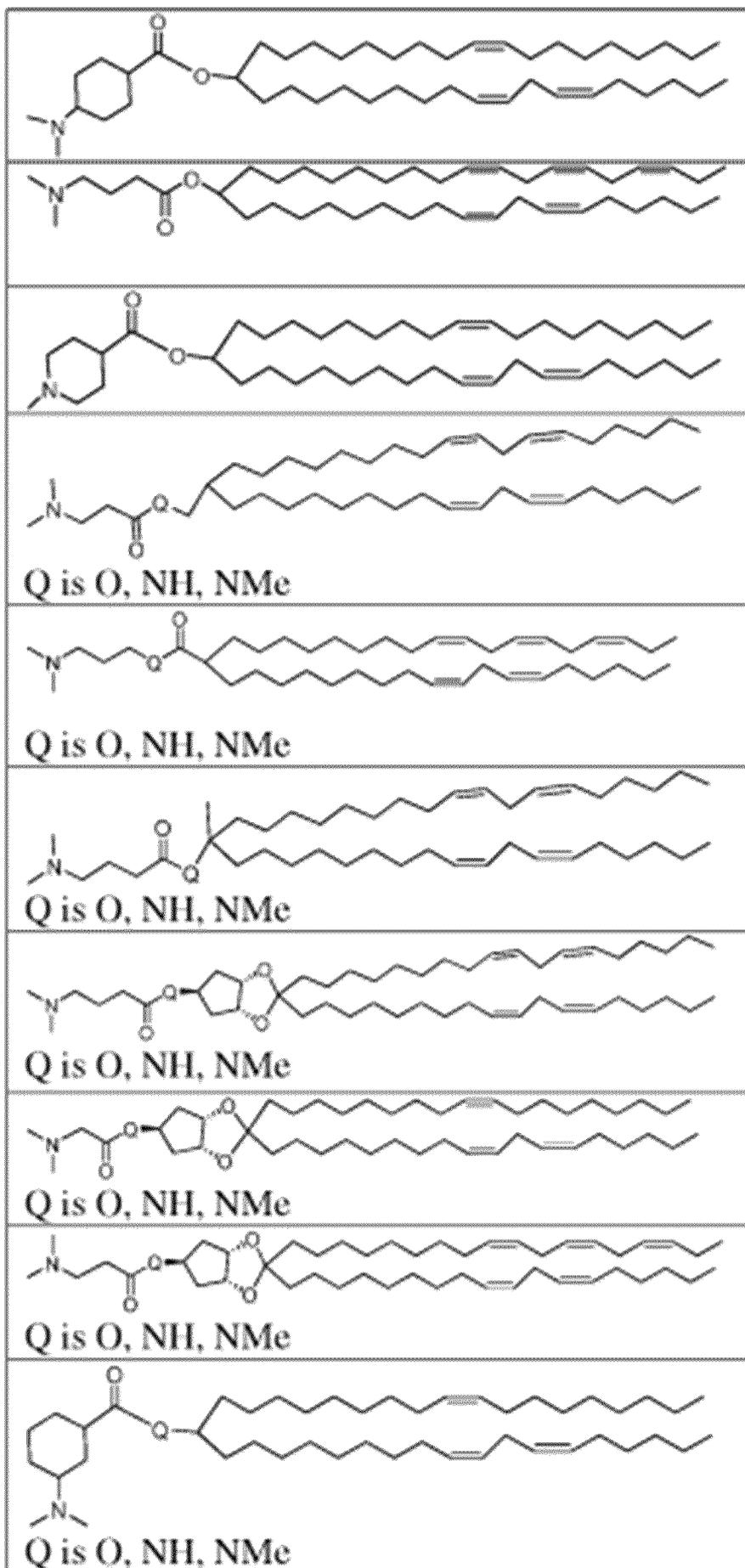


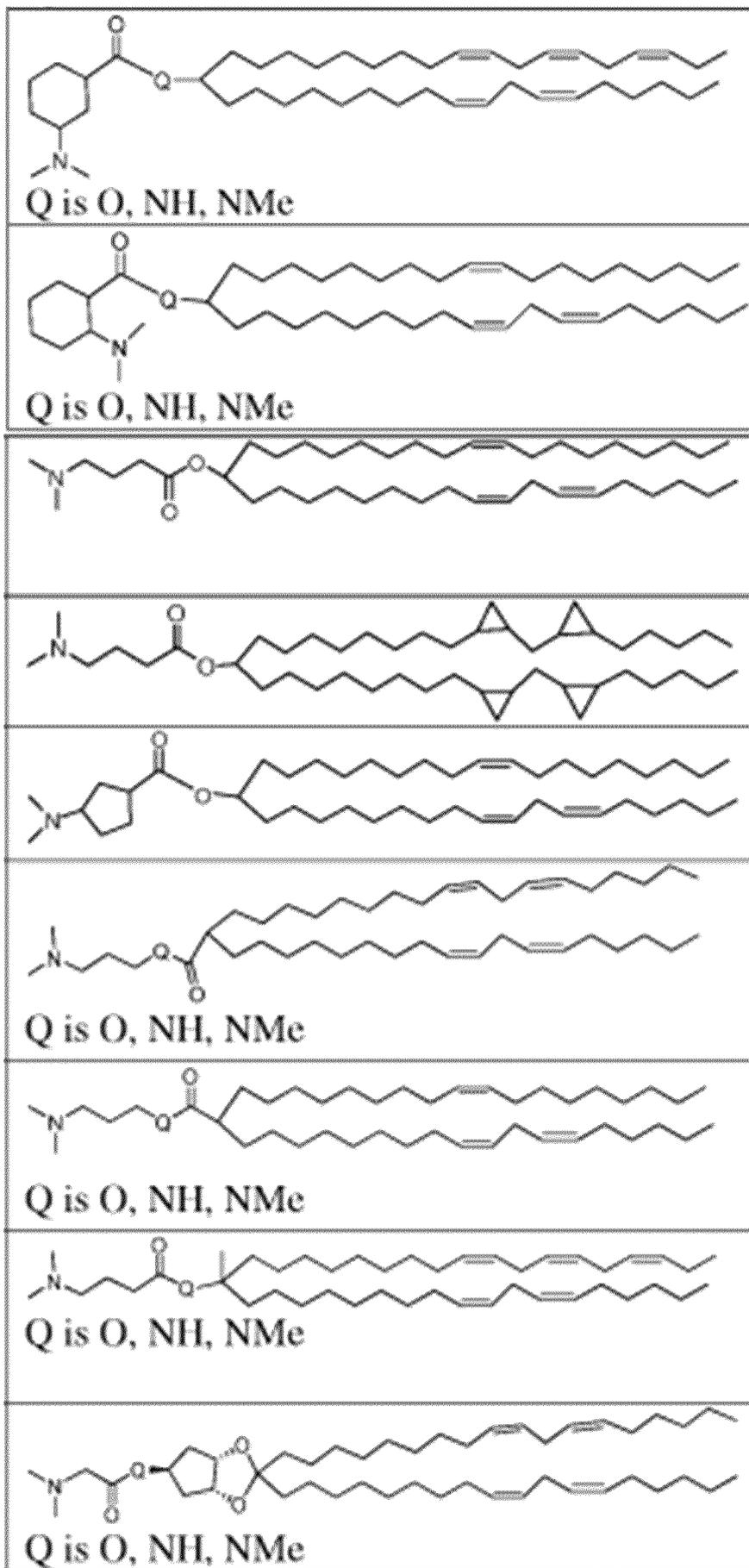


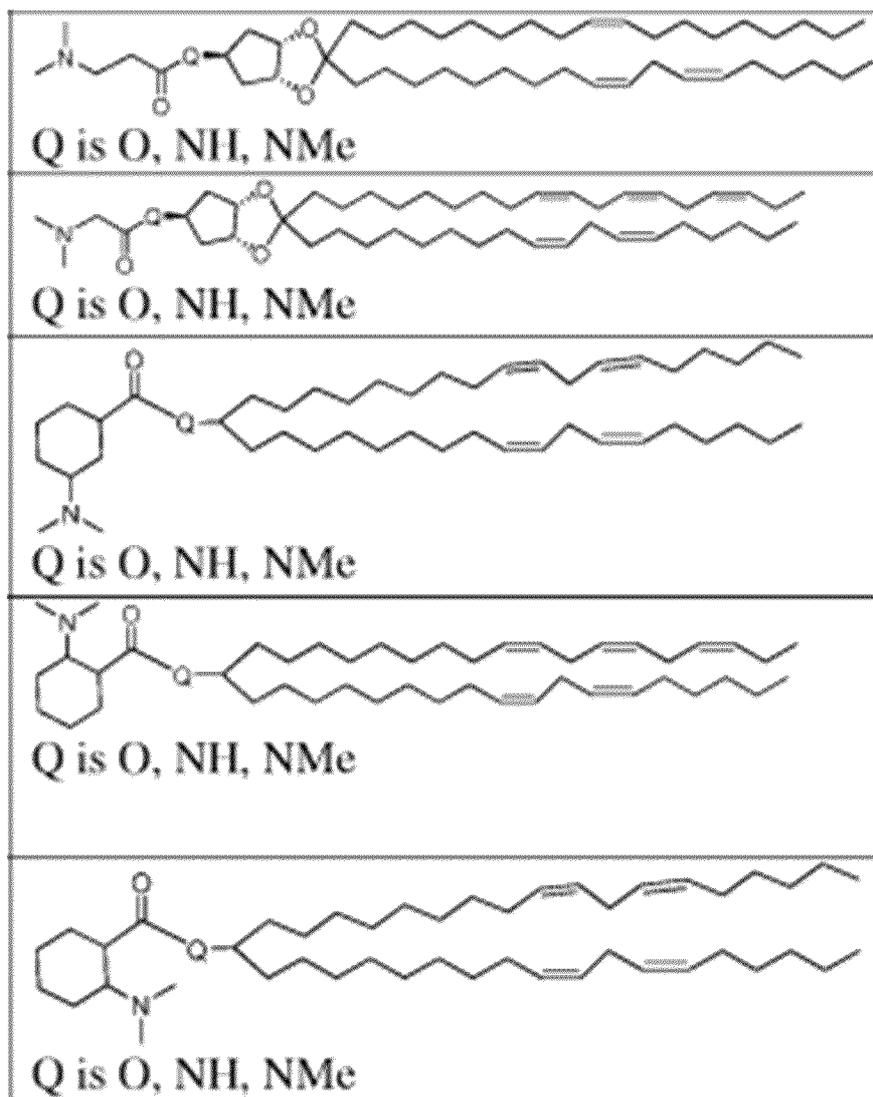


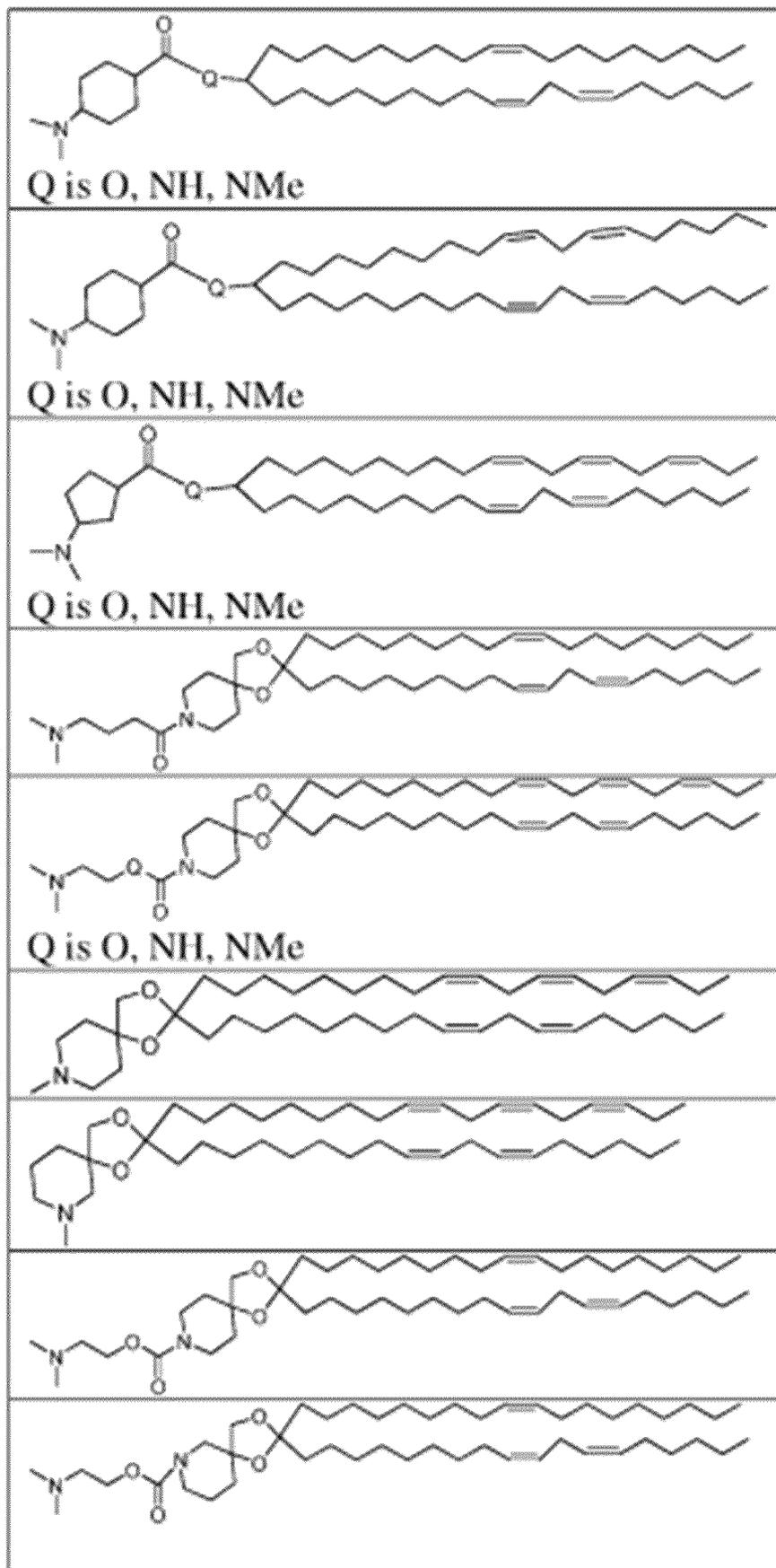


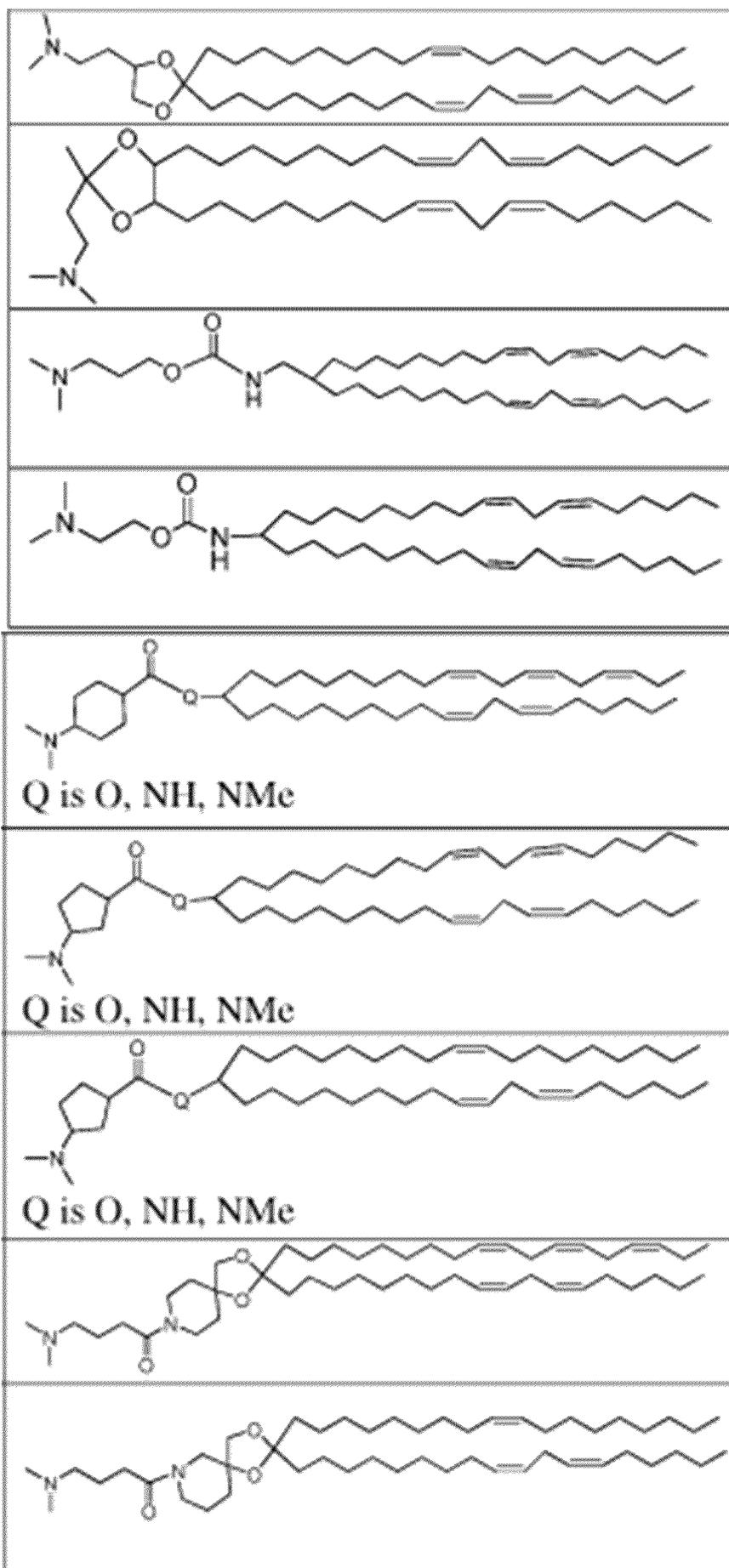


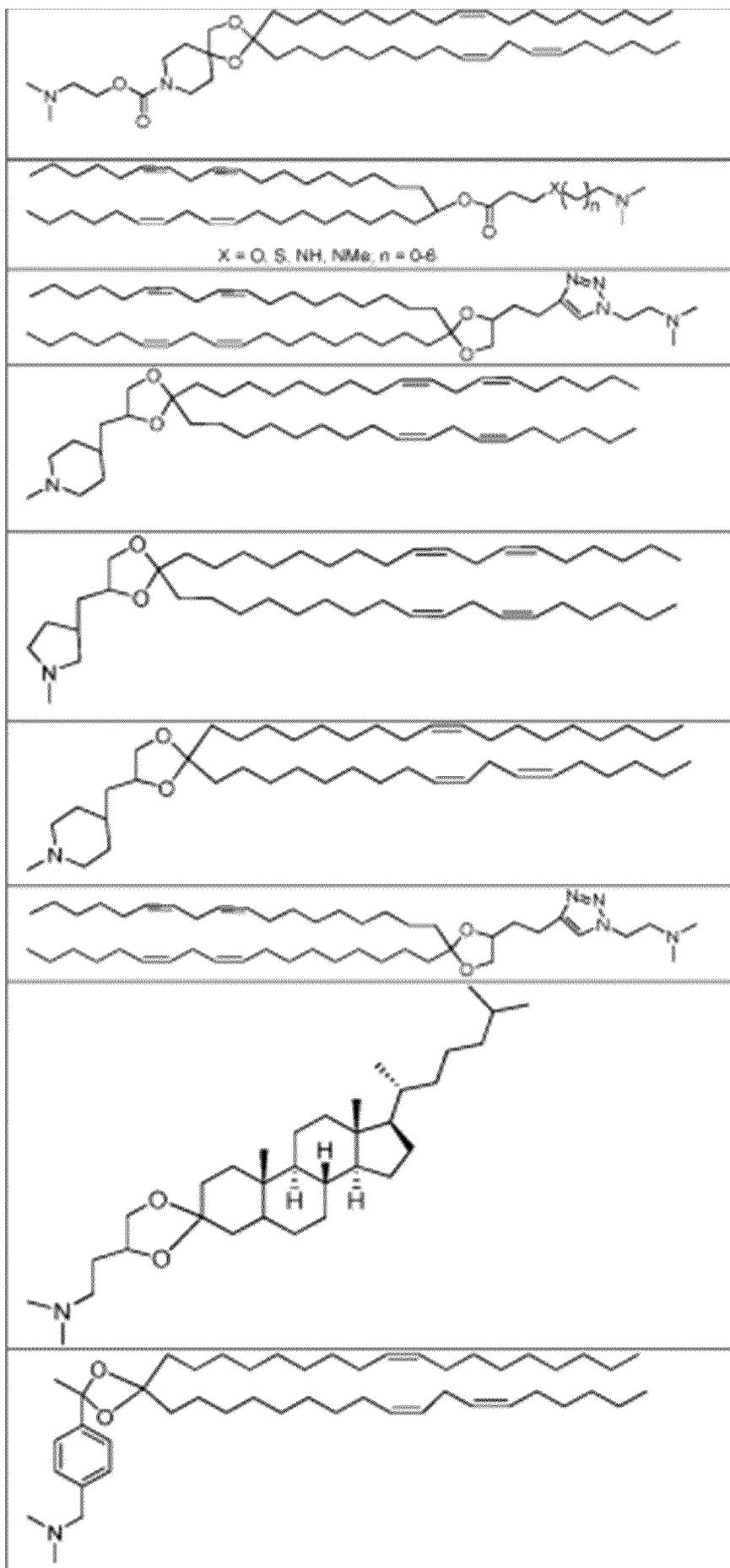


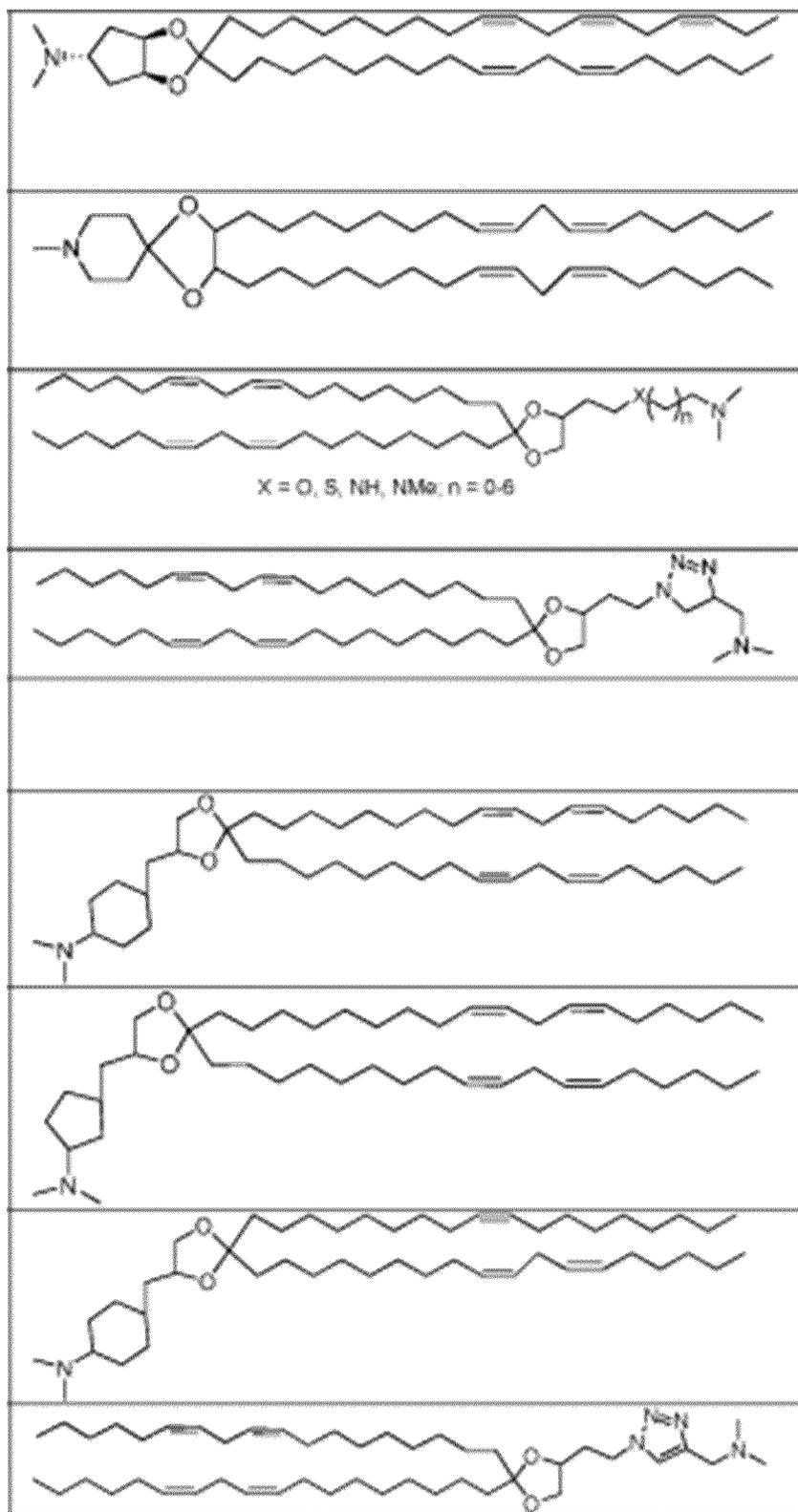


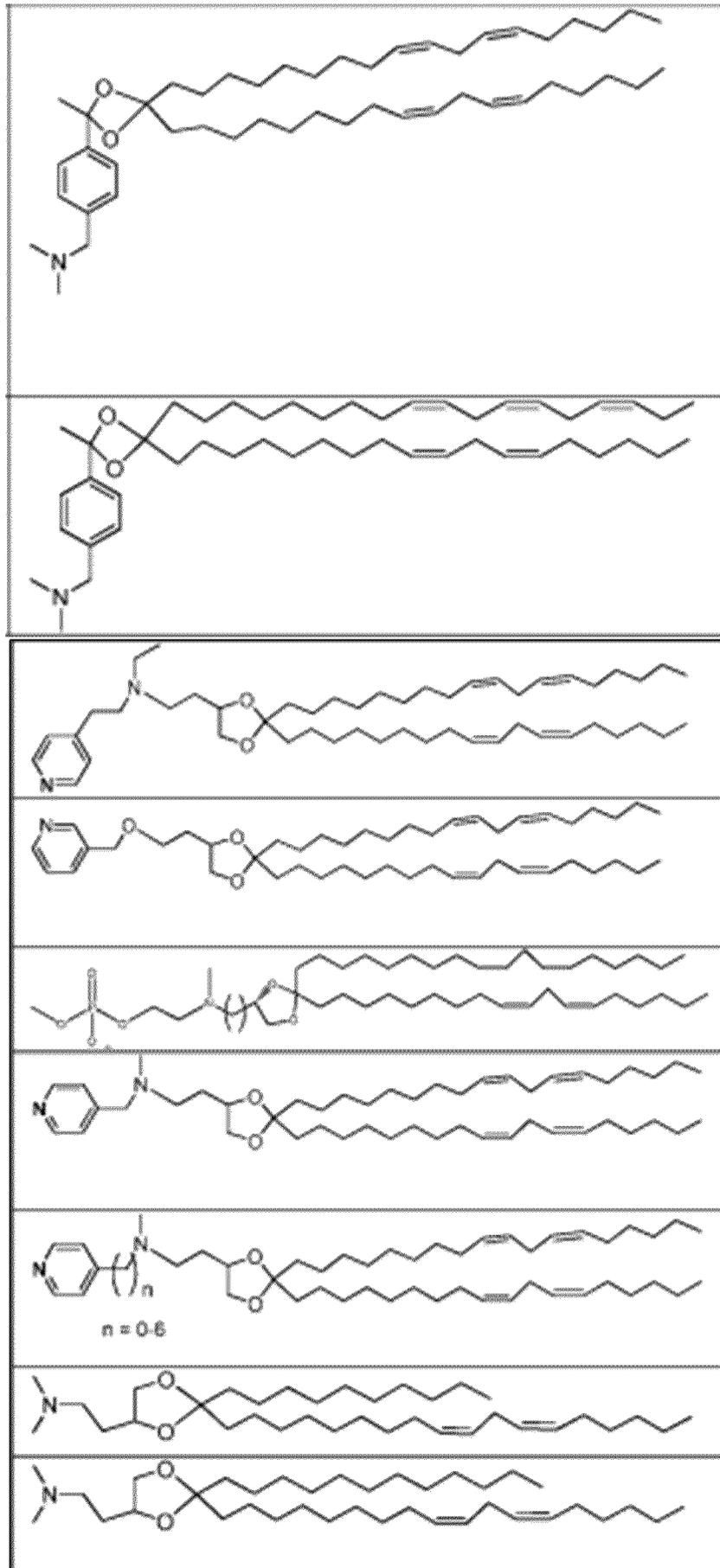


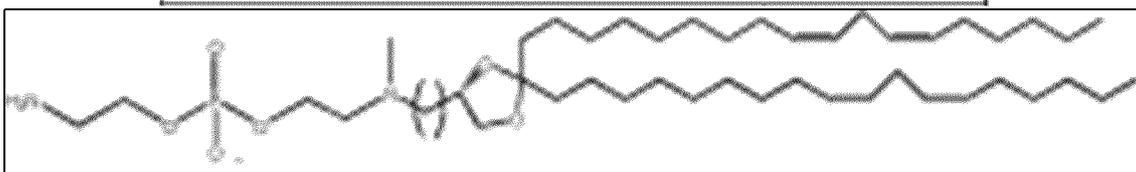
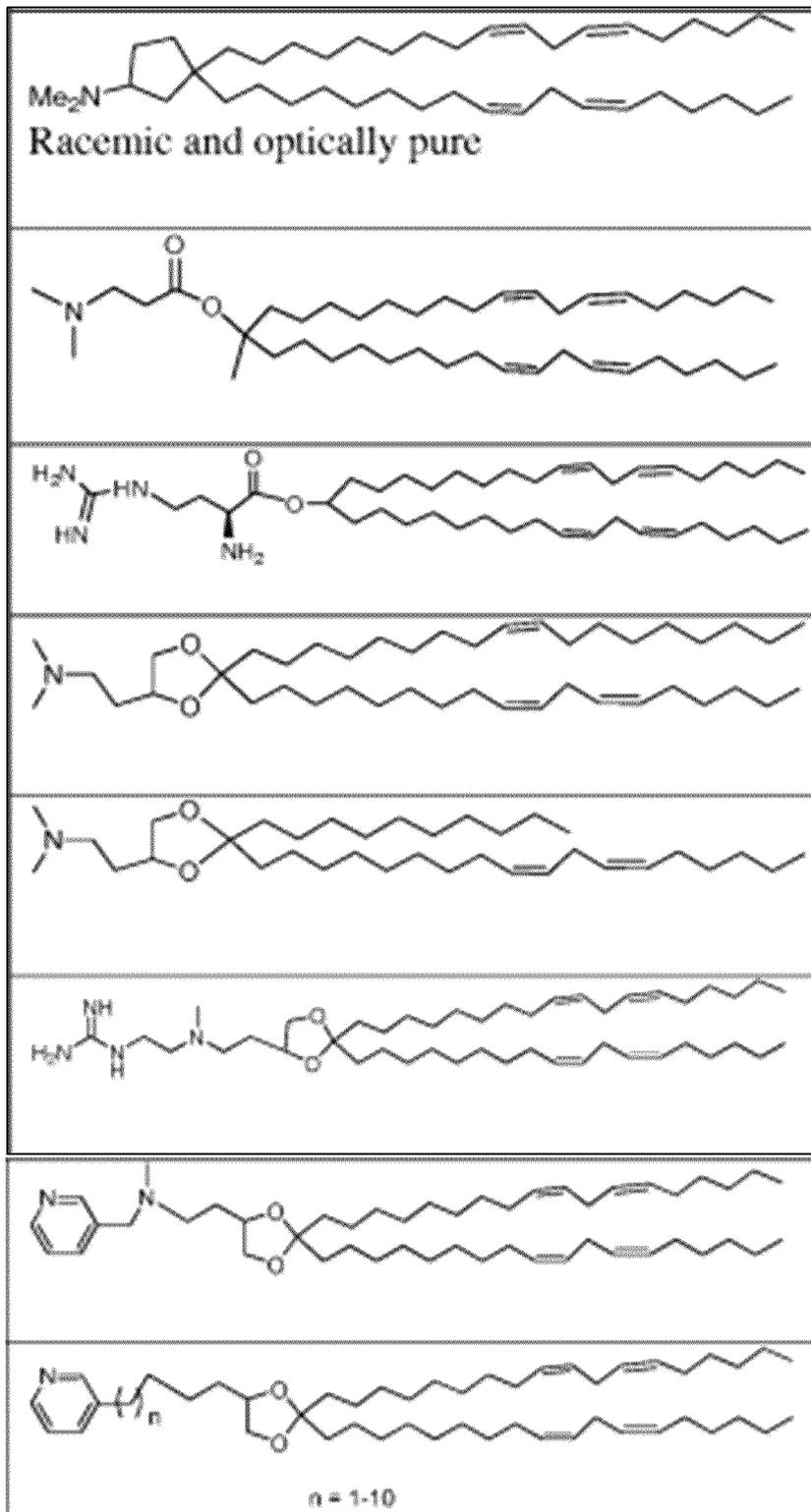


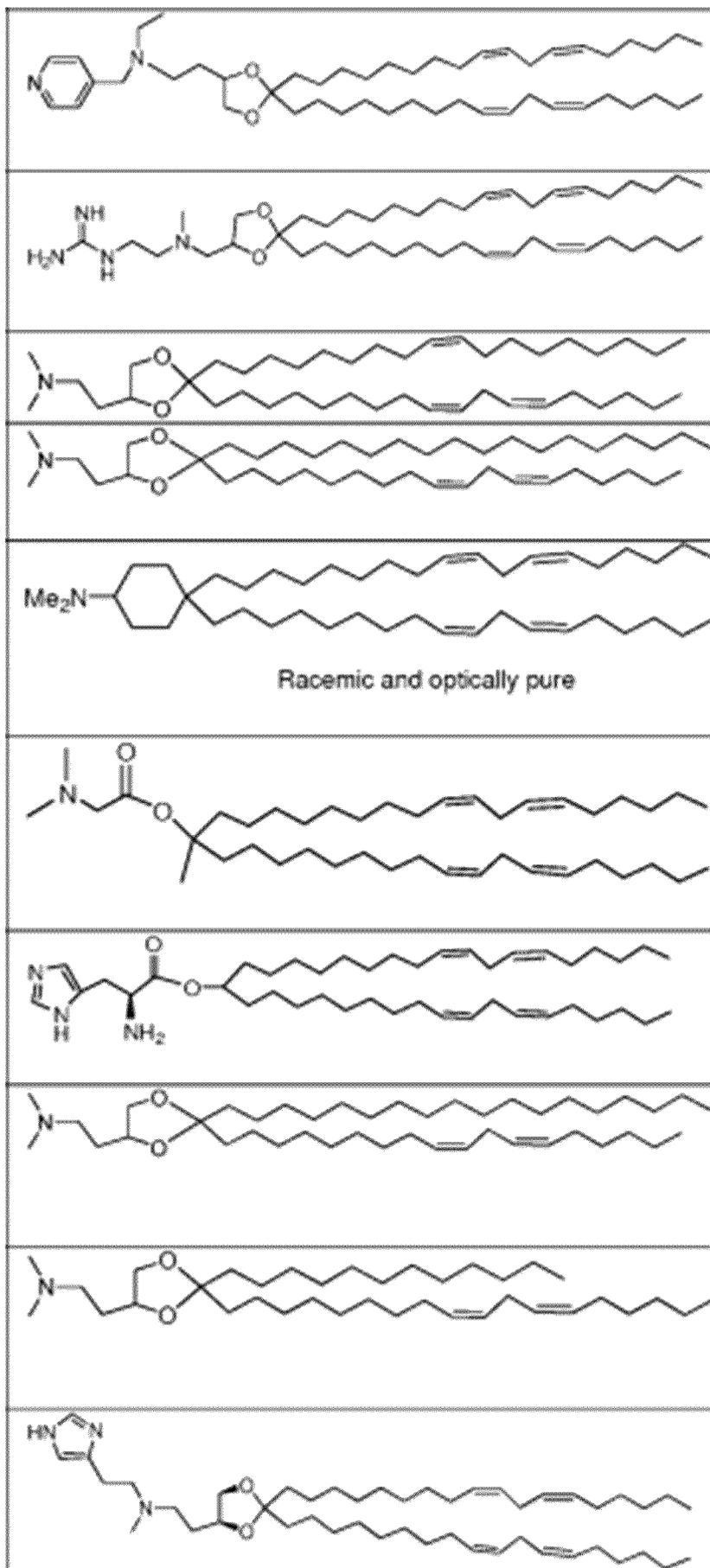


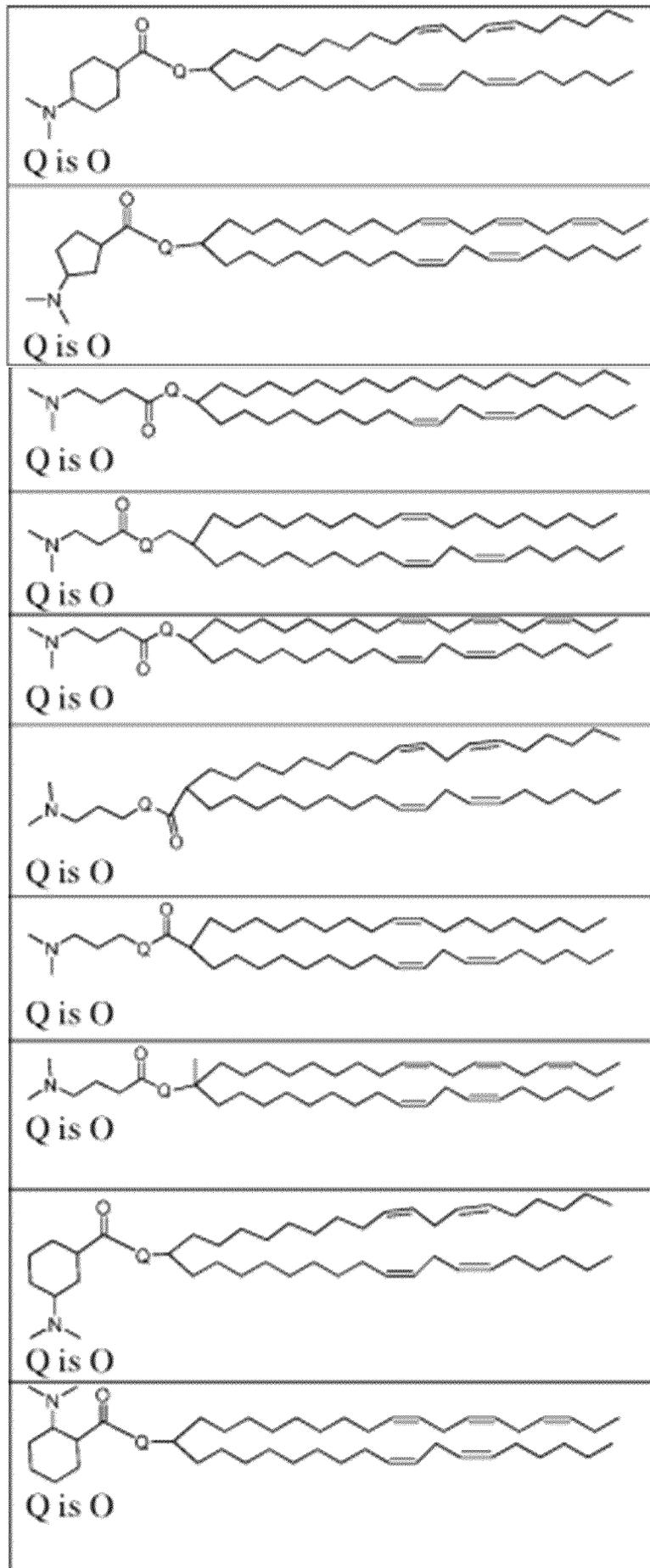


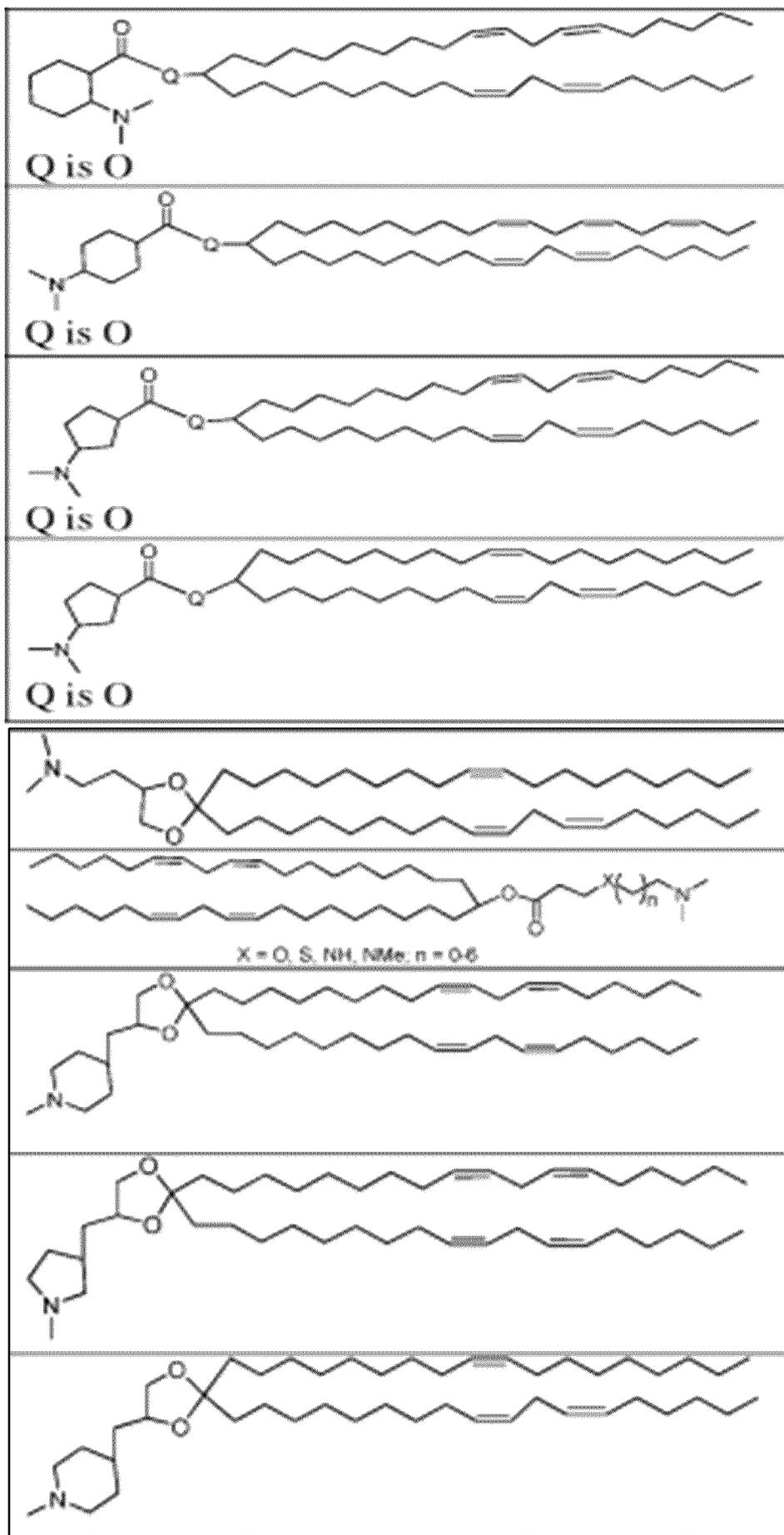


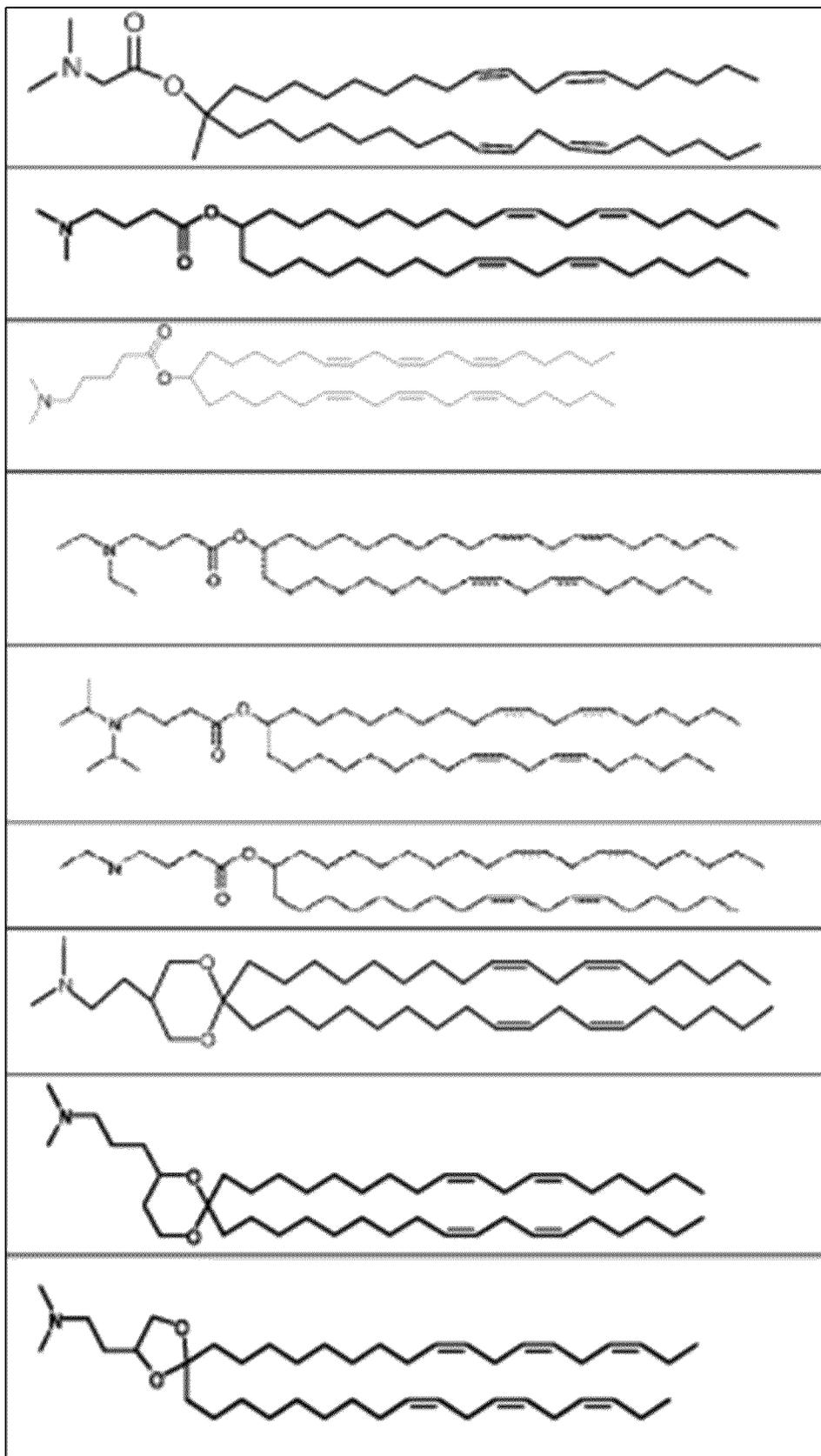


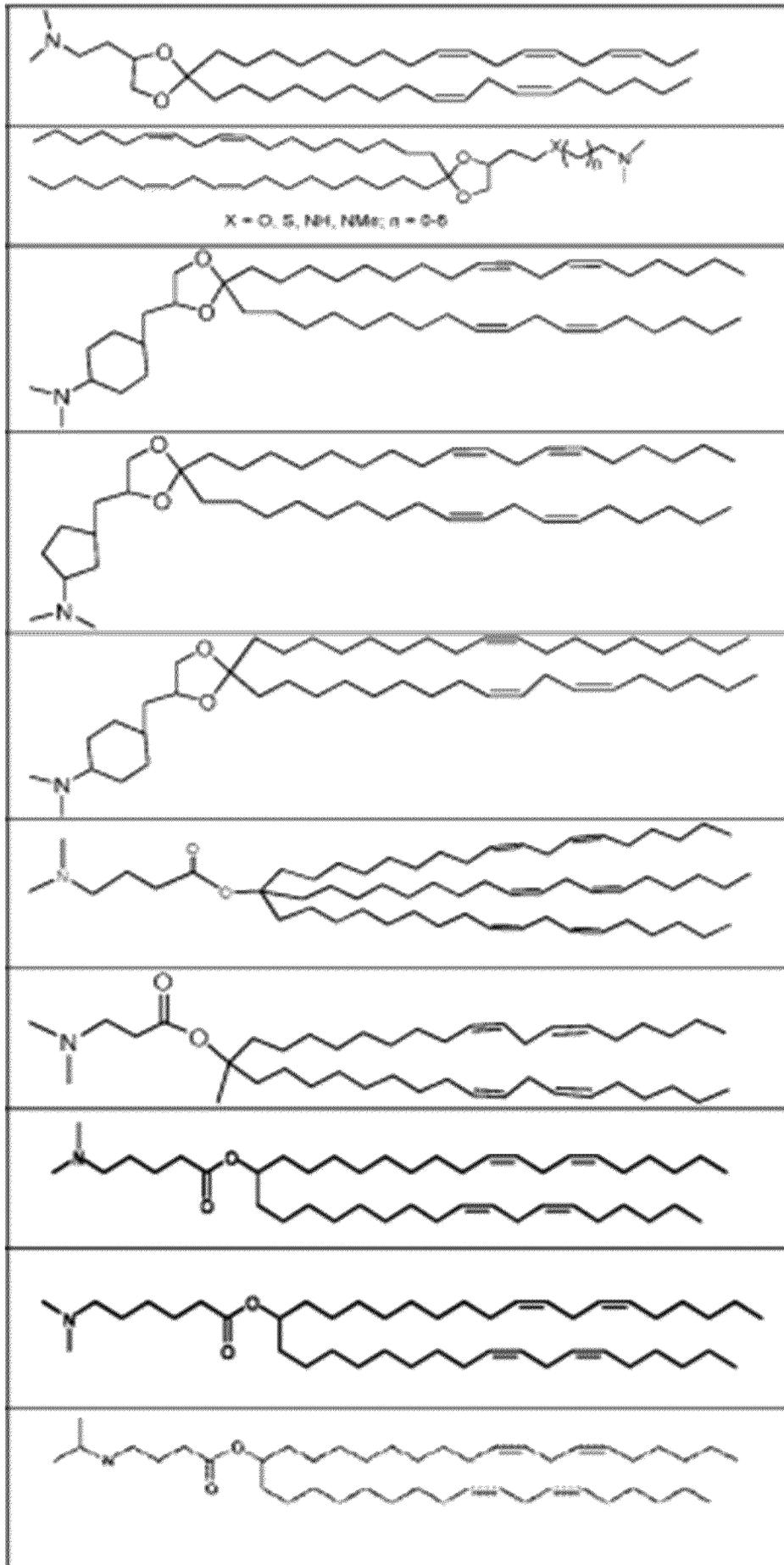


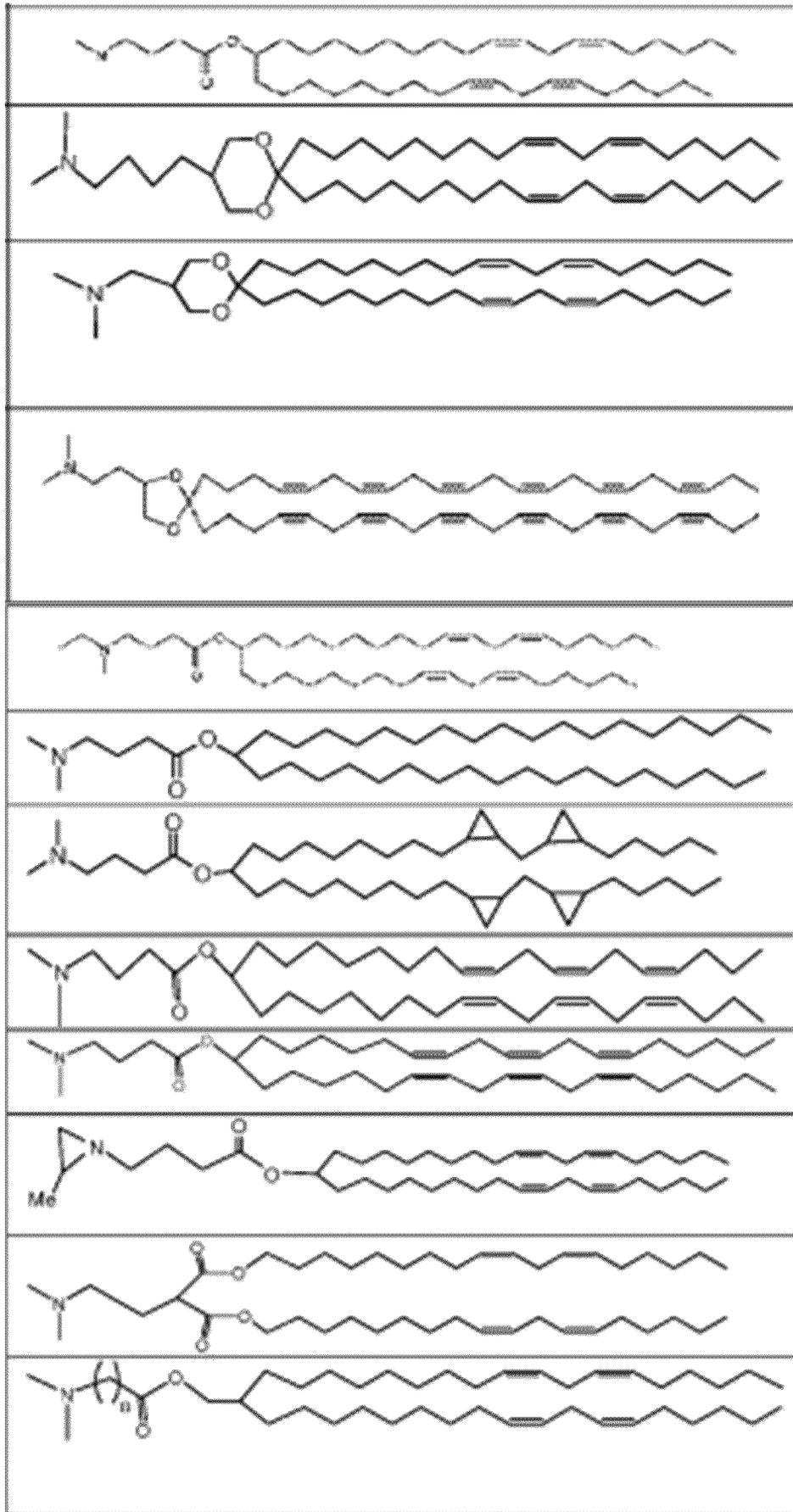


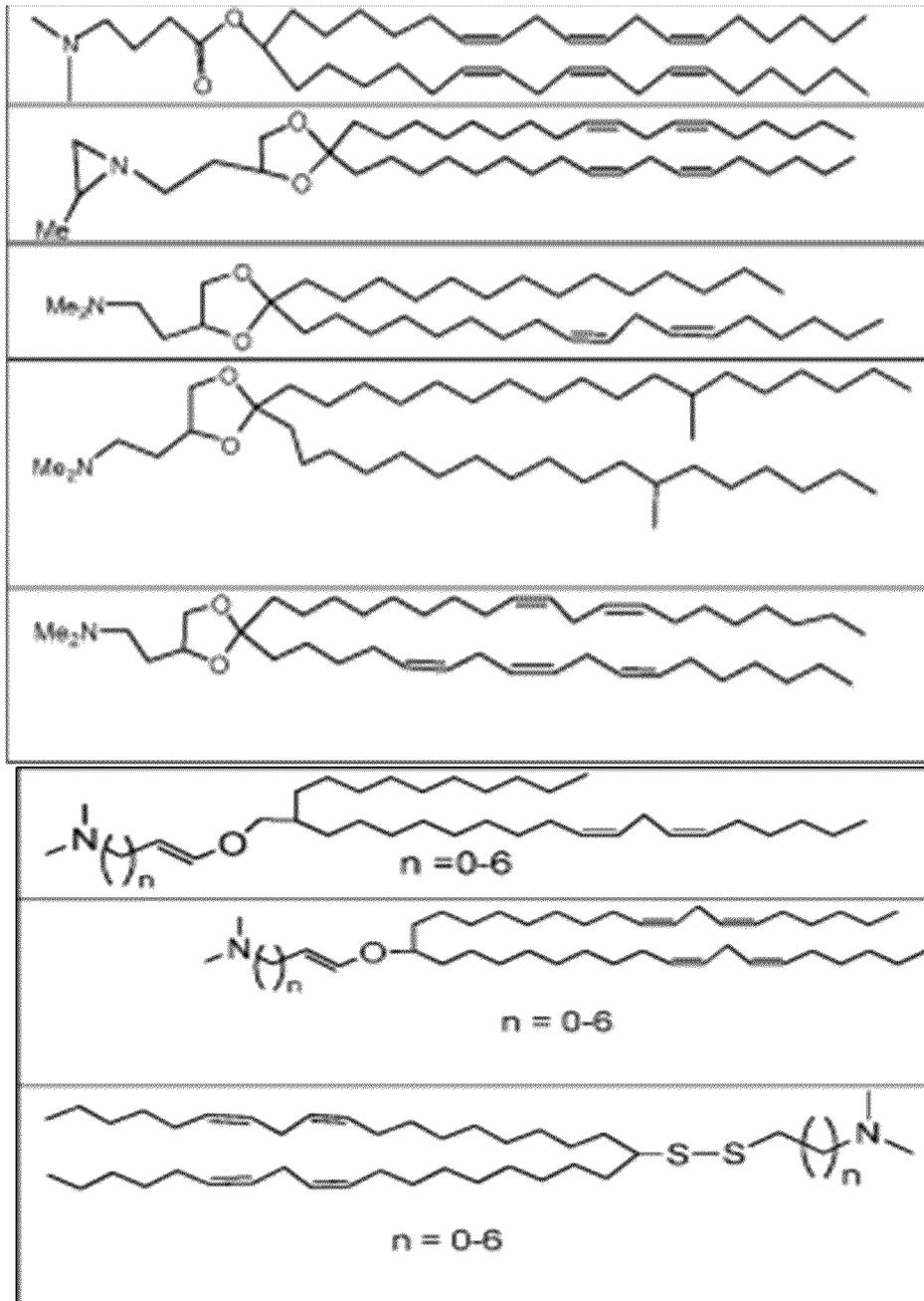


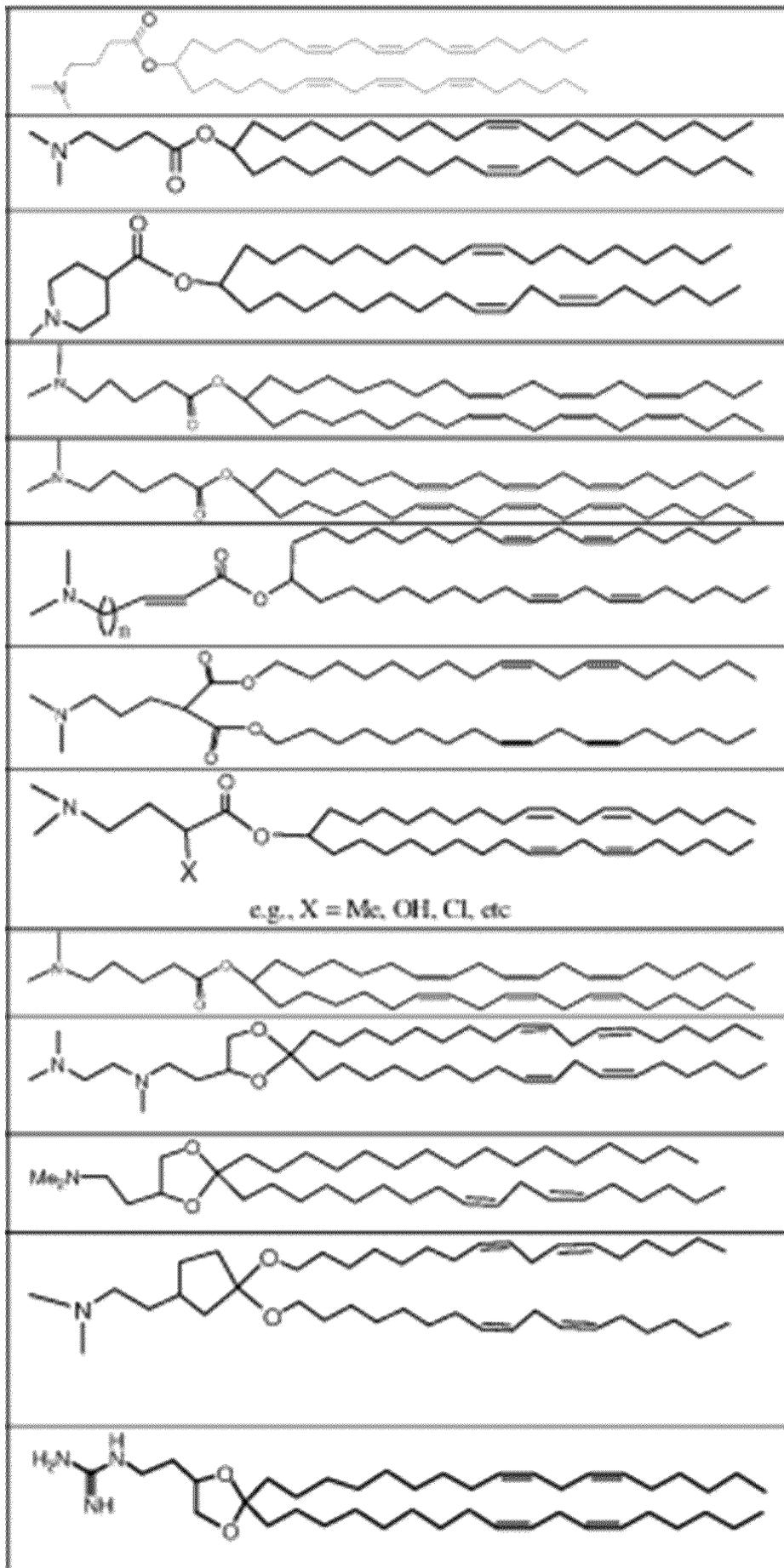


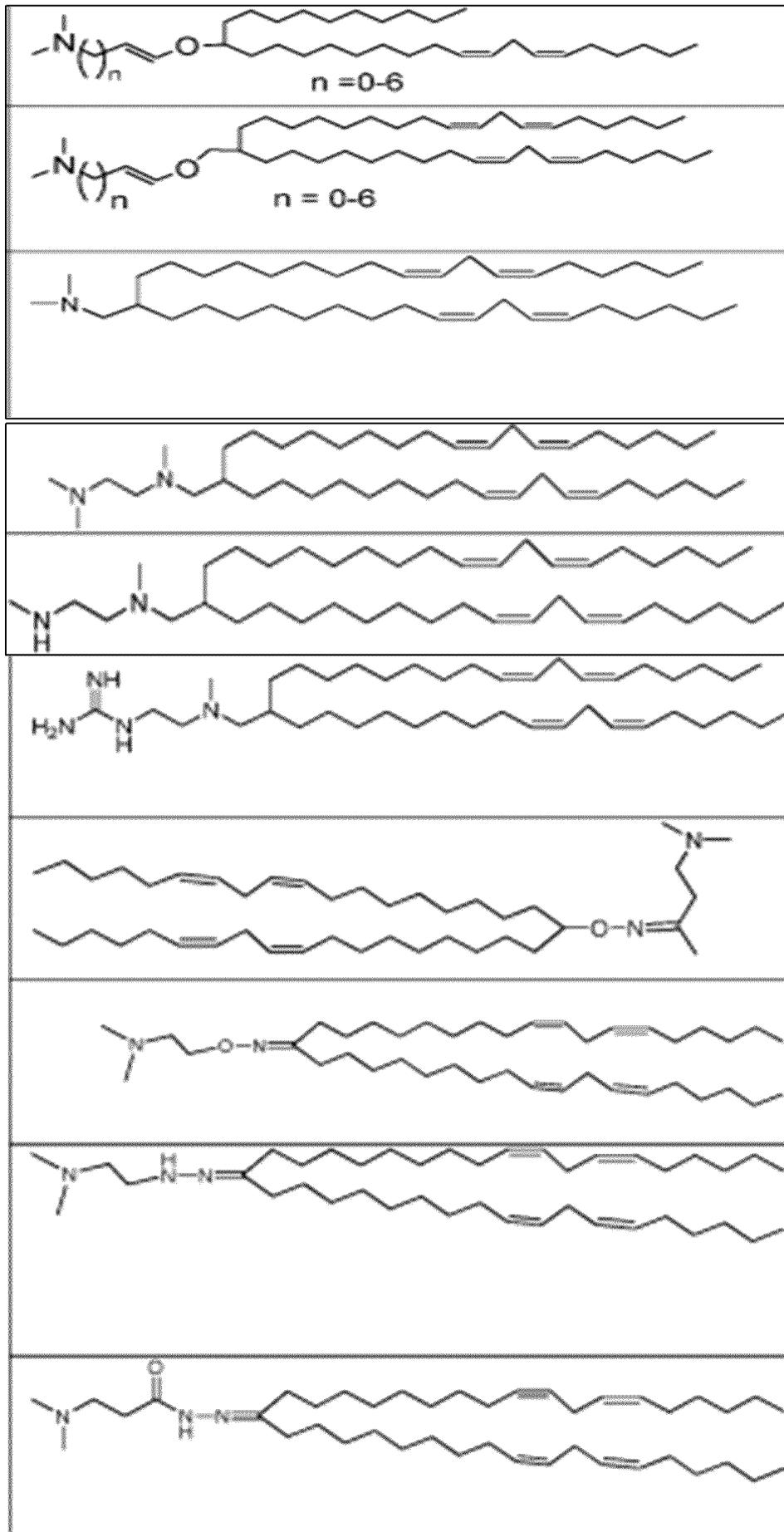


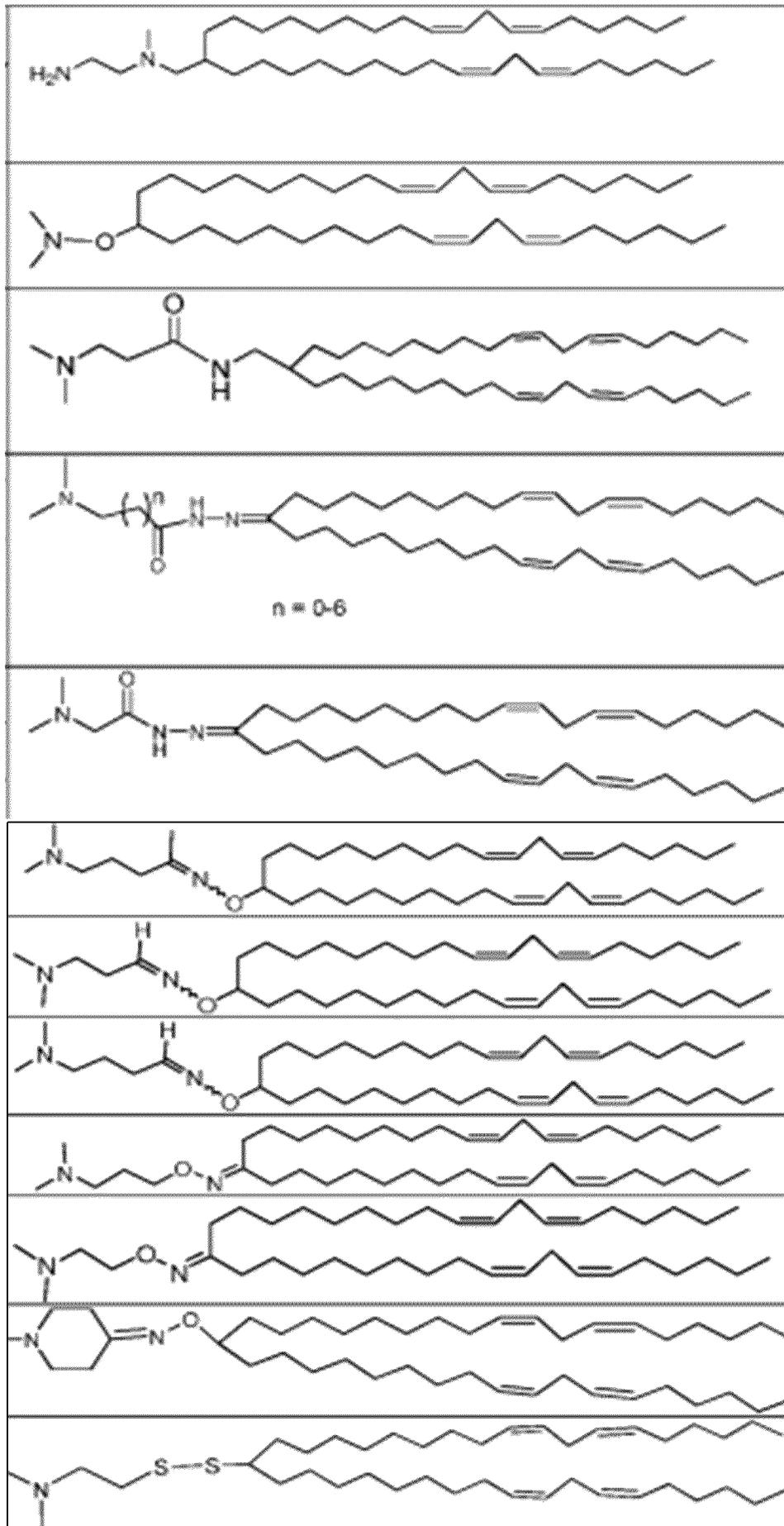


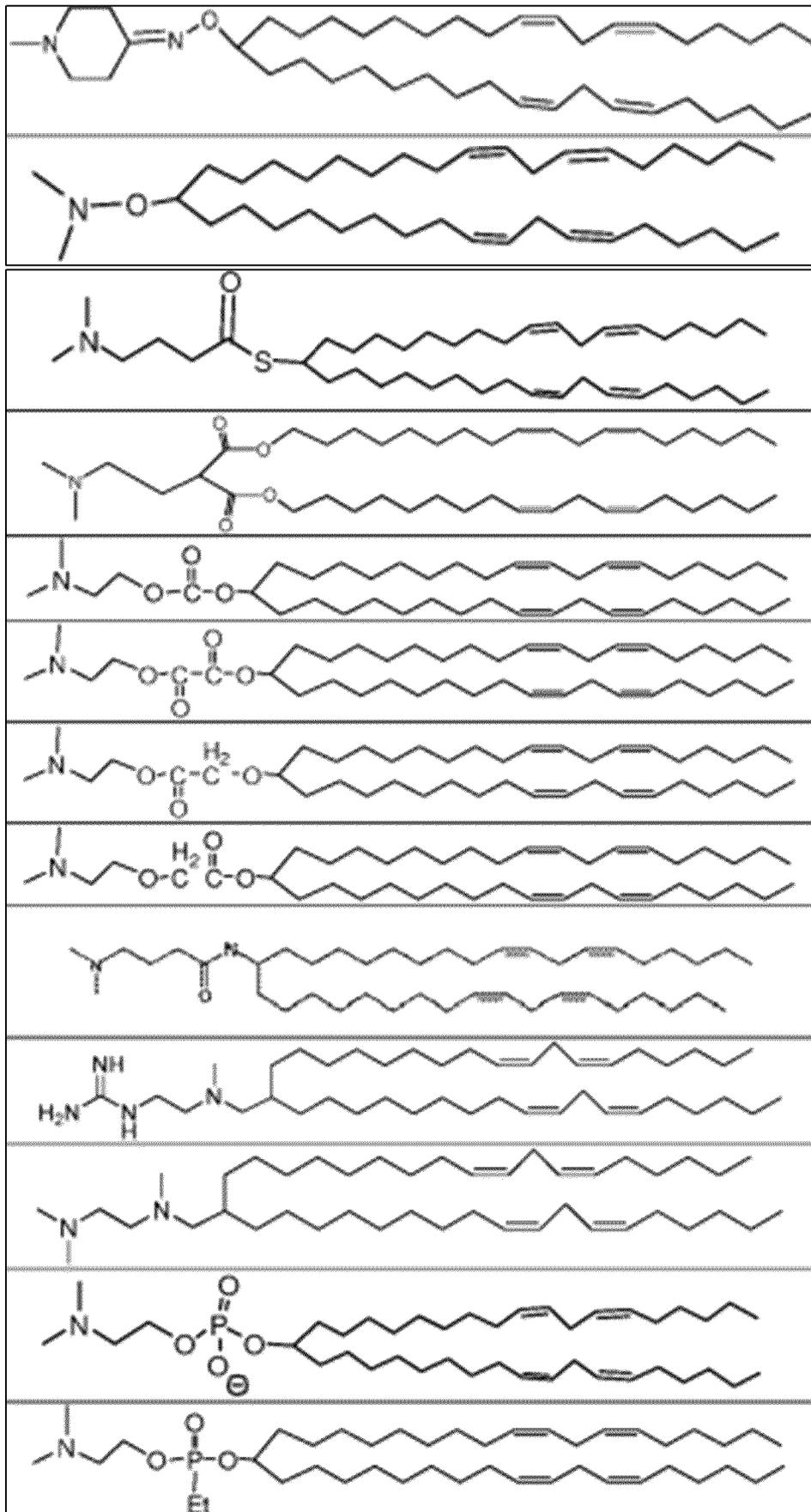


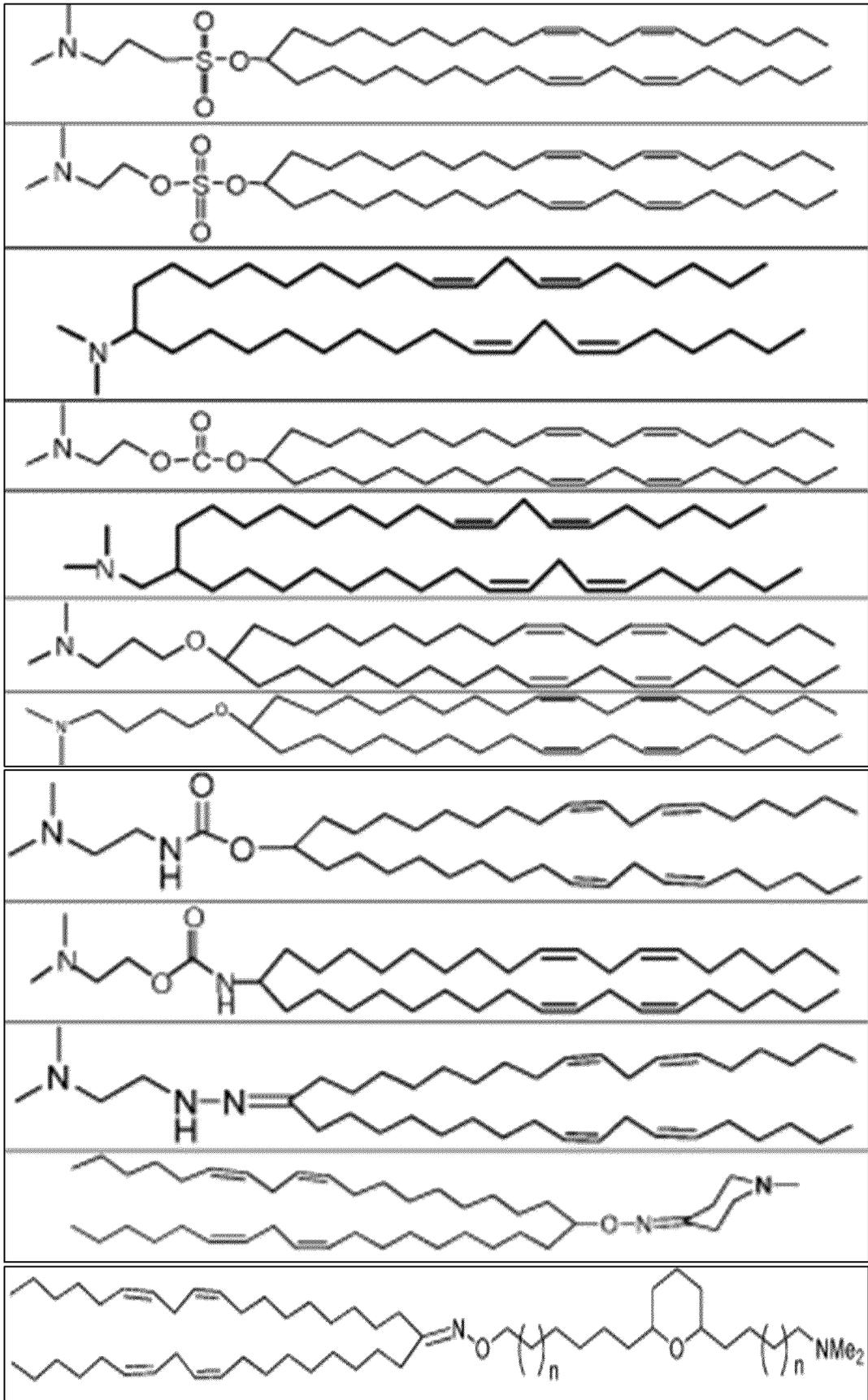


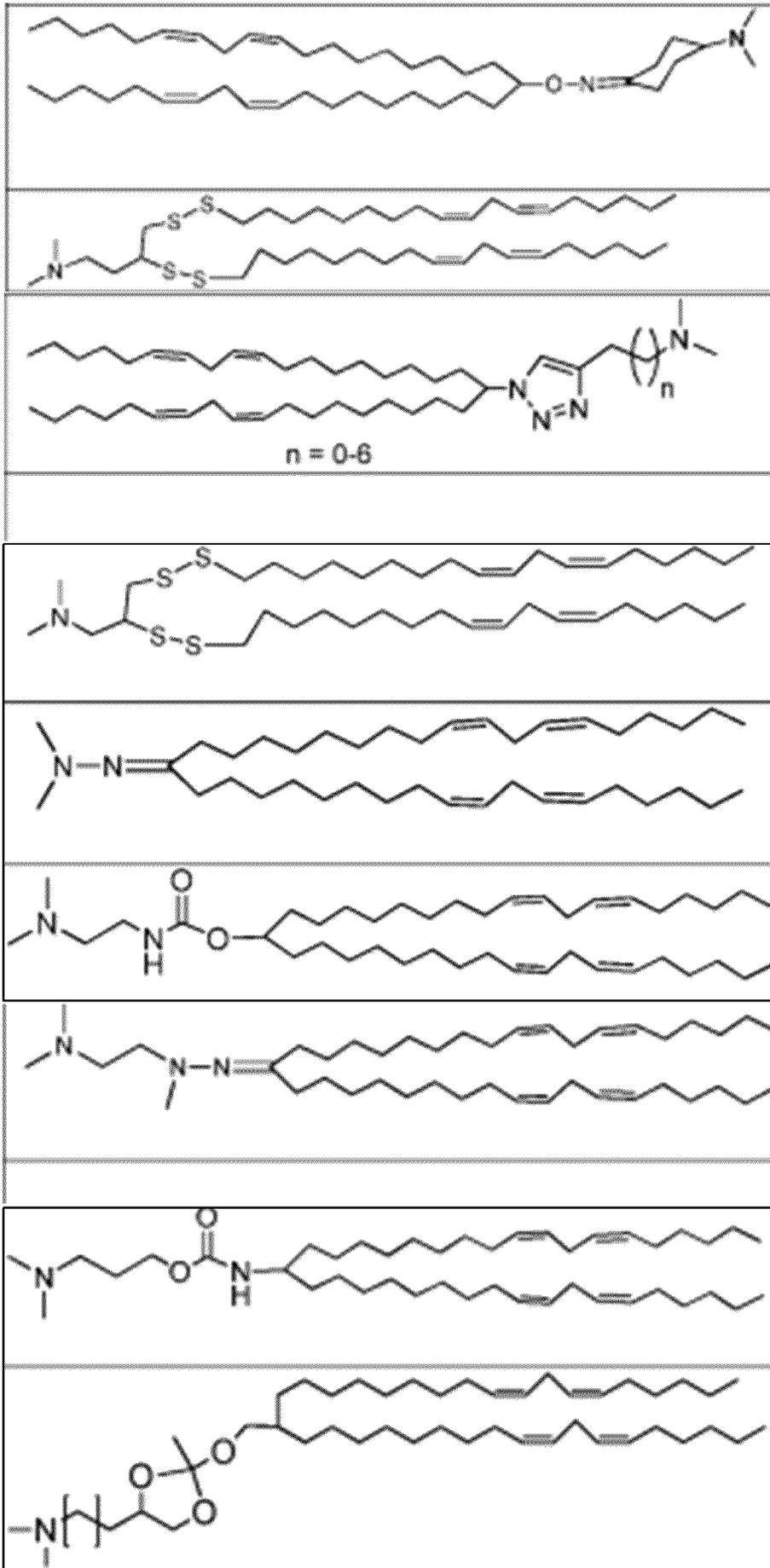


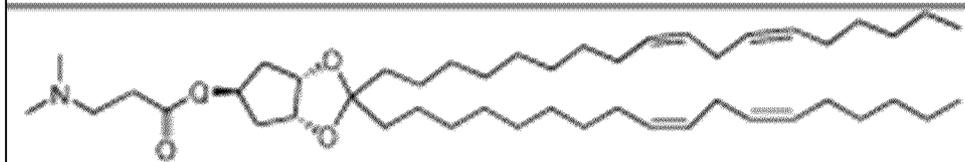
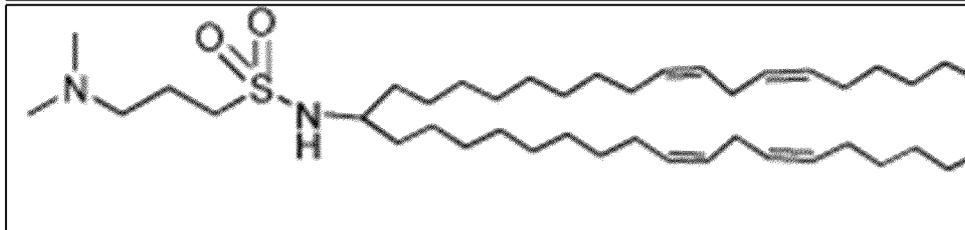
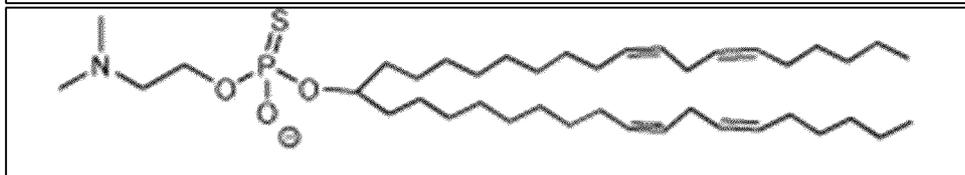
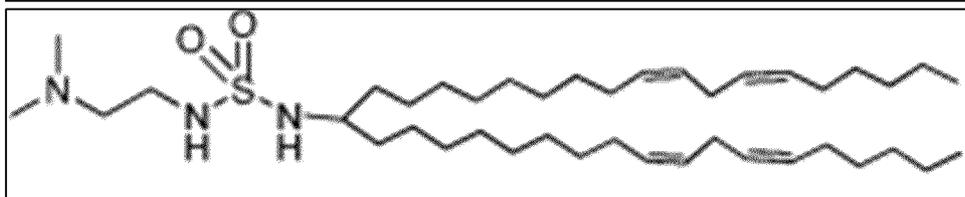
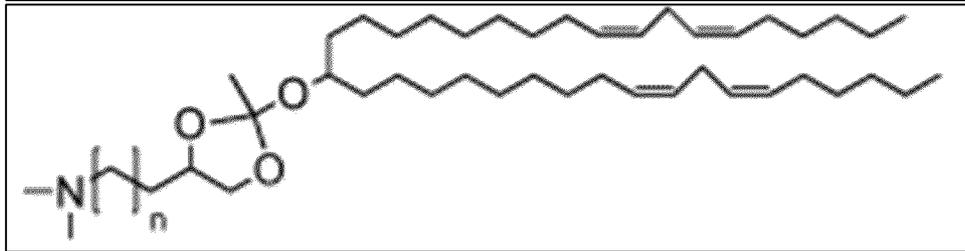
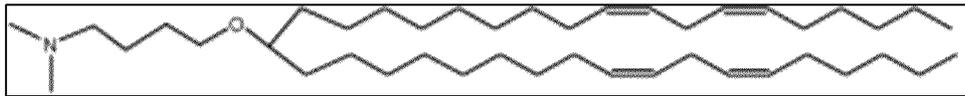








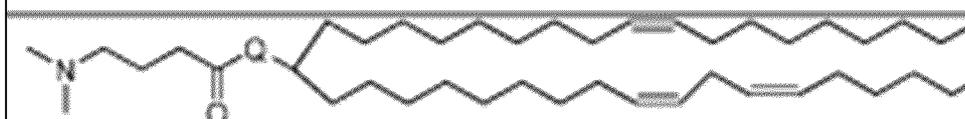




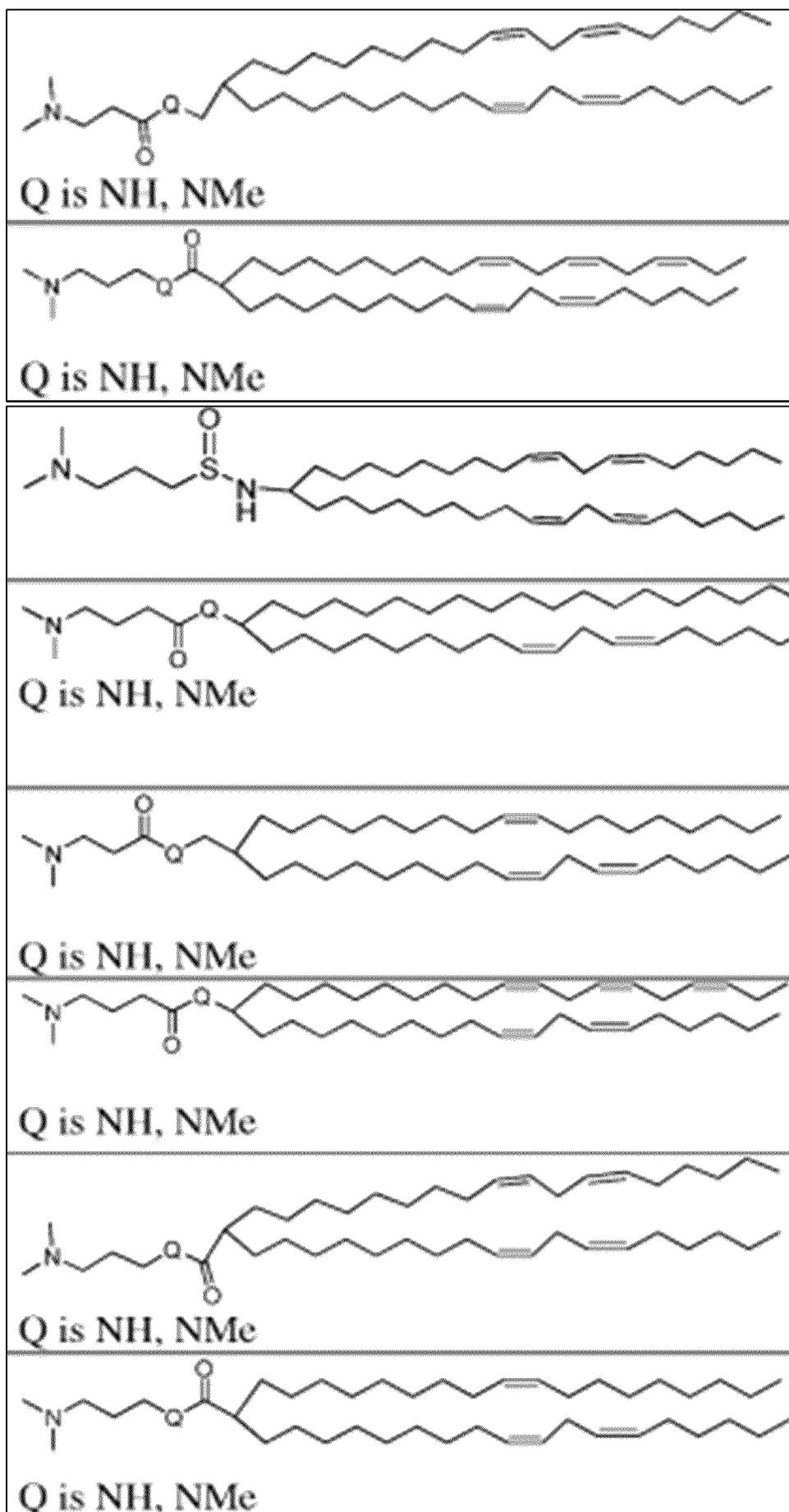
Q is NH, NMe

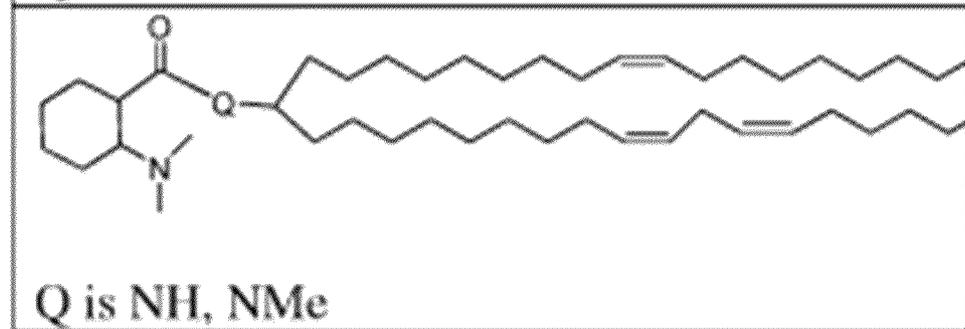
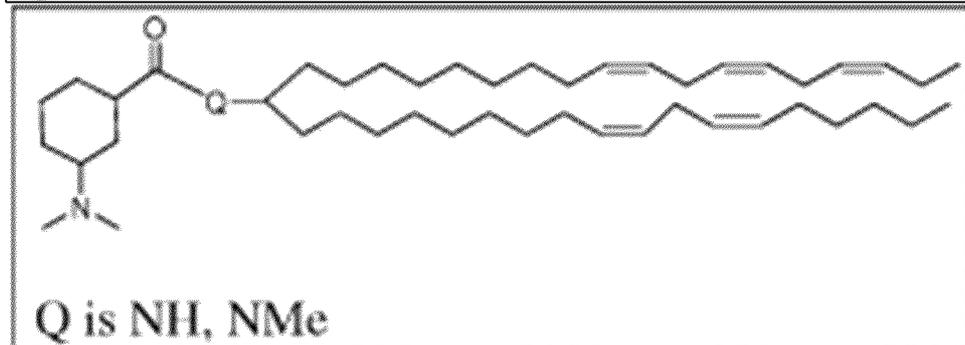
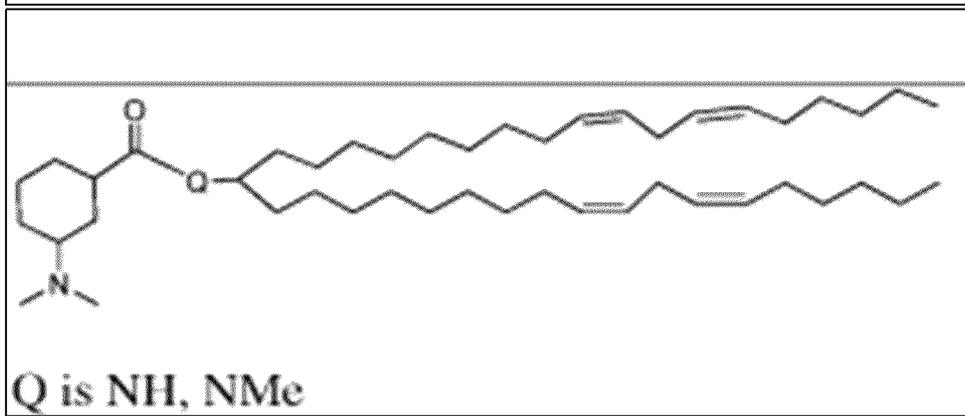
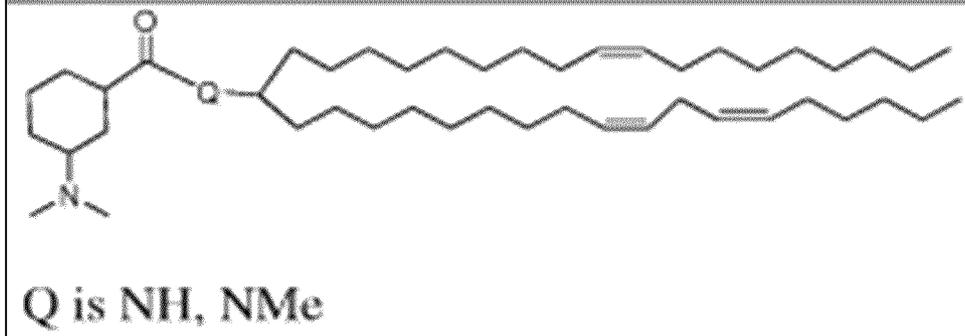
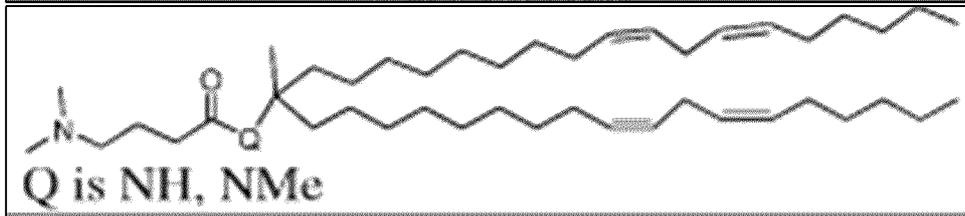
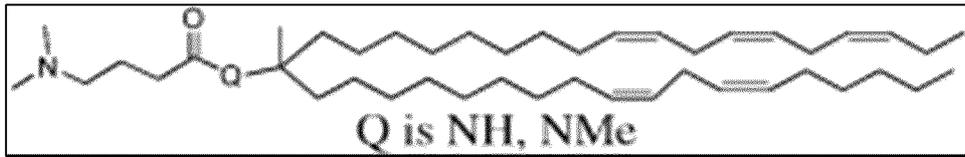


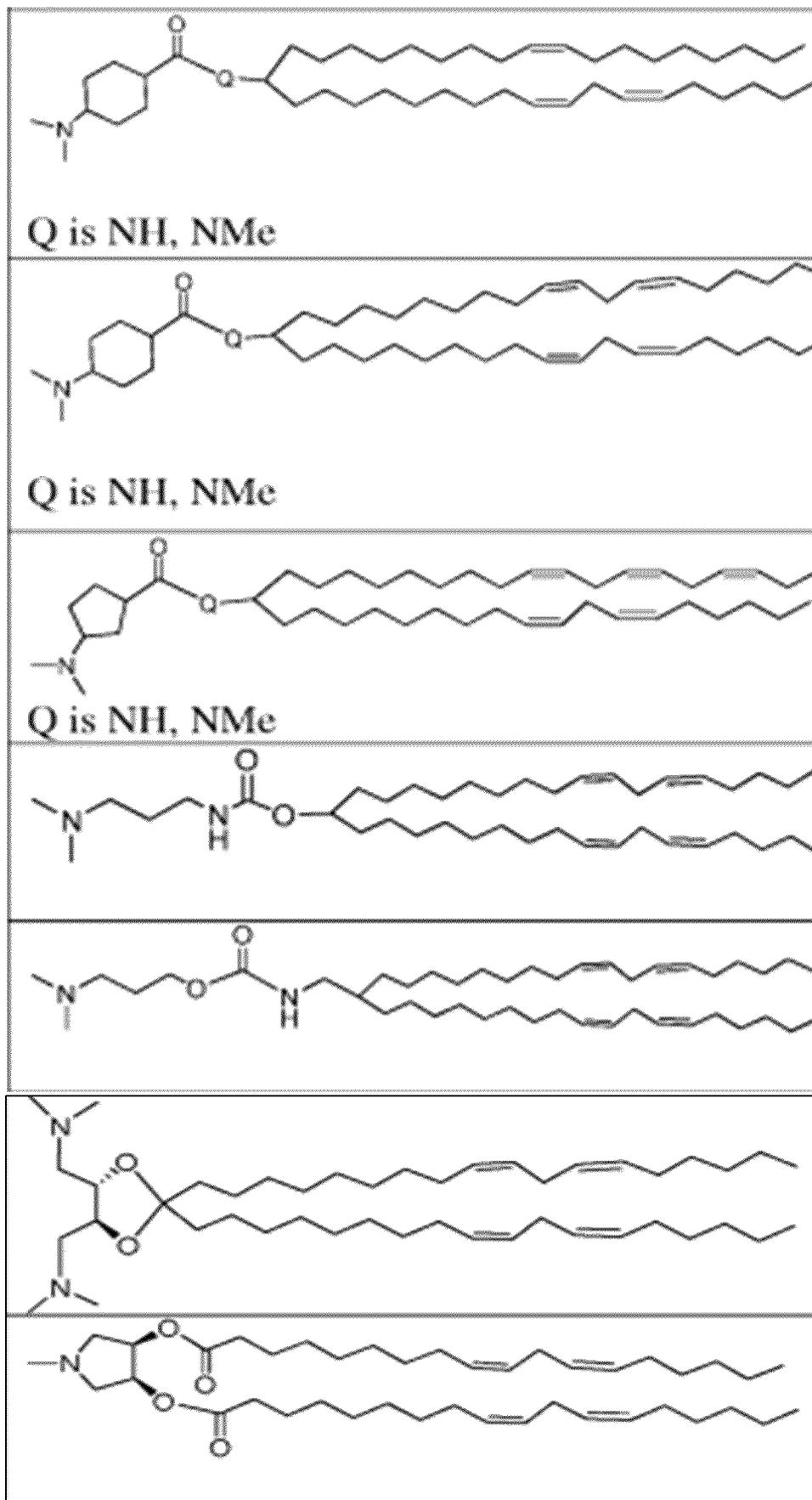
Q is NH, NMe

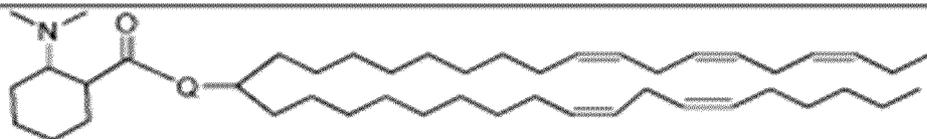


Q is NH, NMe

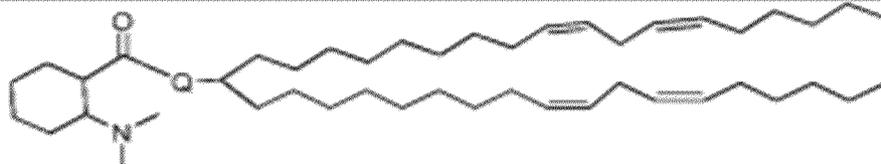




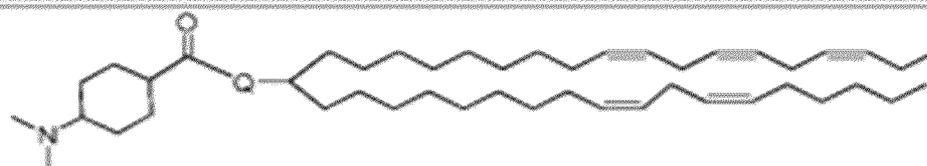




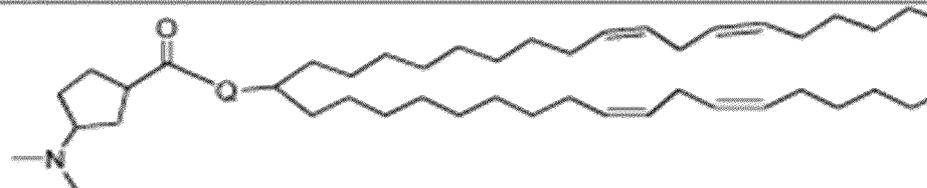
Q is NH, NMe



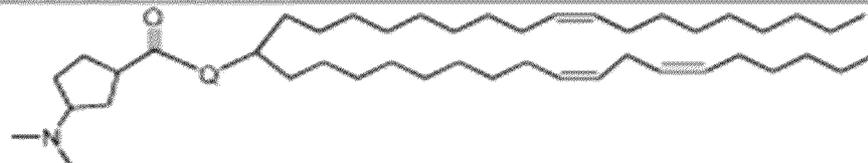
Q is NH, NMe



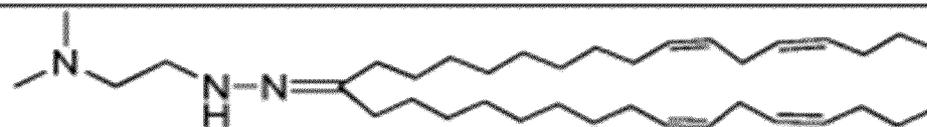
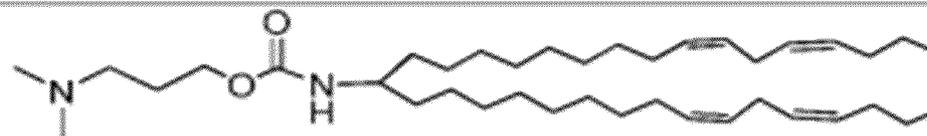
Q is NH, NMe

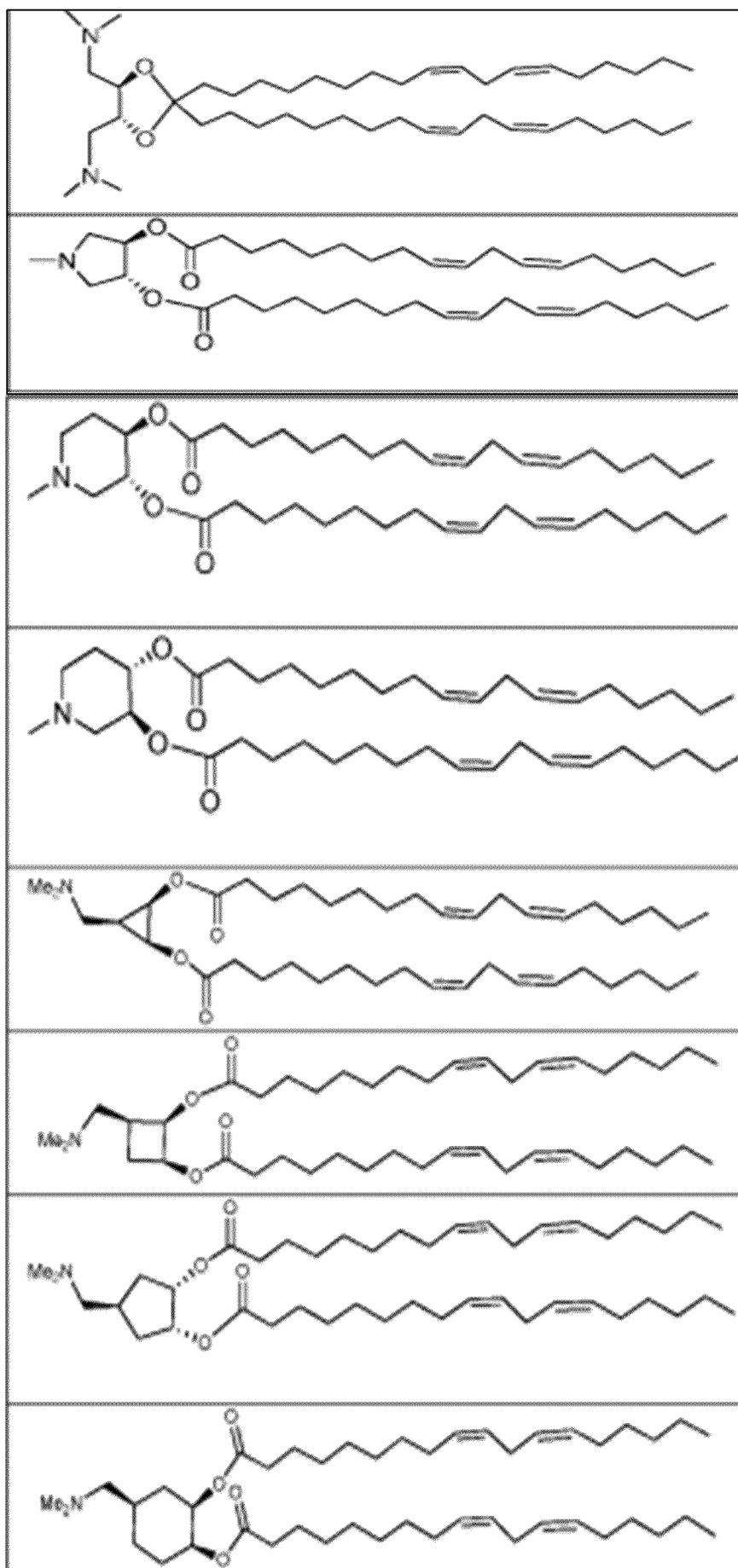


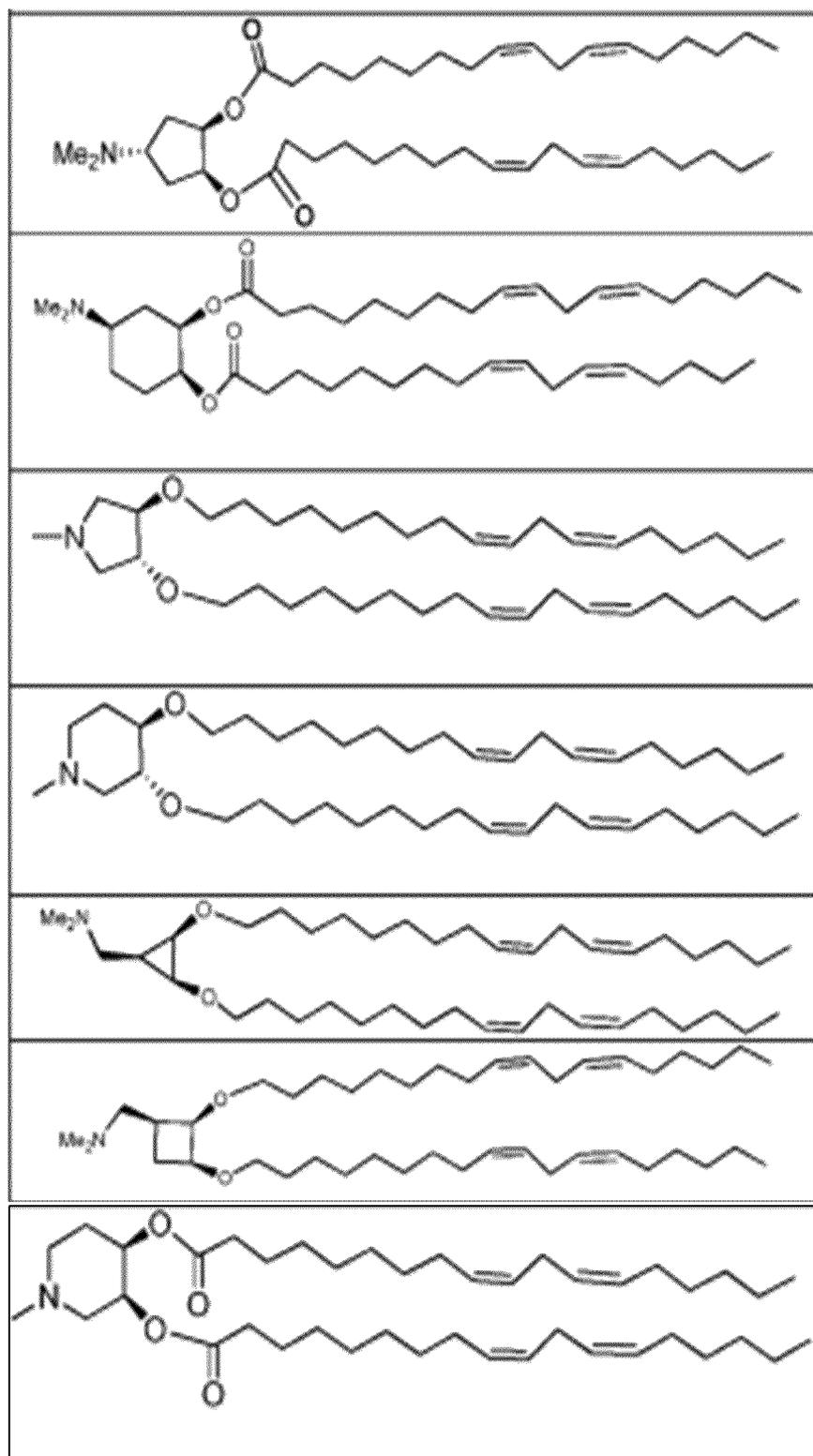
Q is NH, NMe

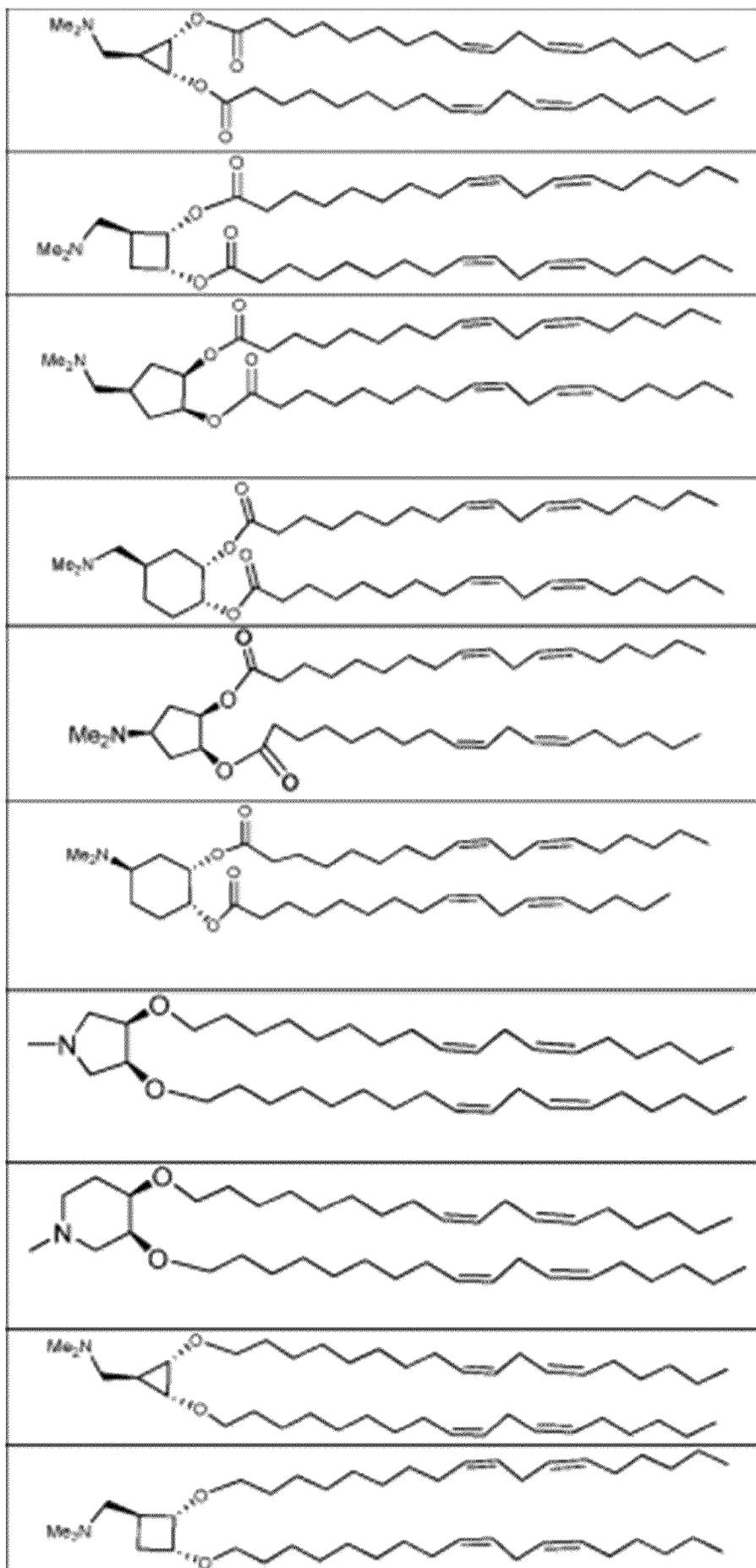


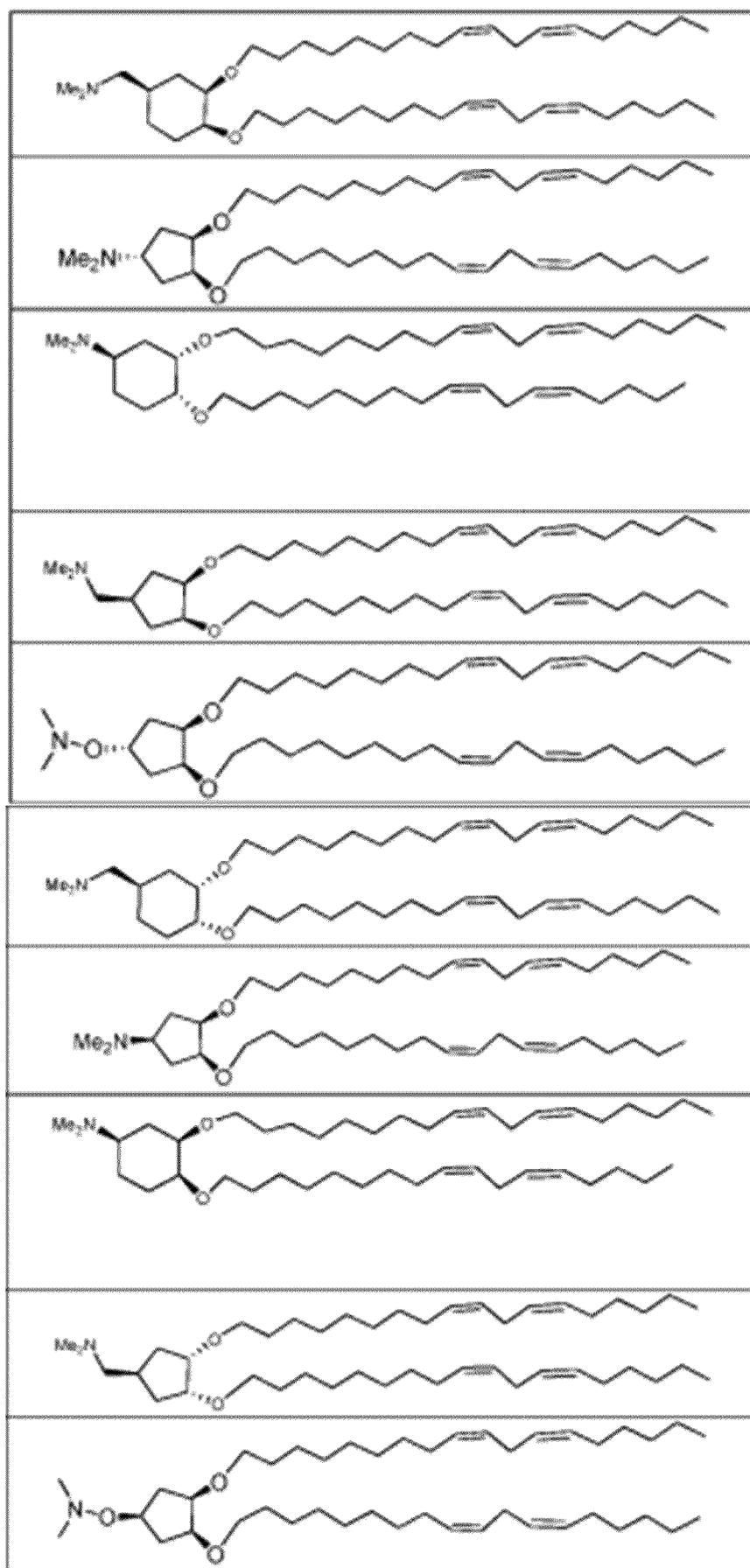
Q is NH, NMe





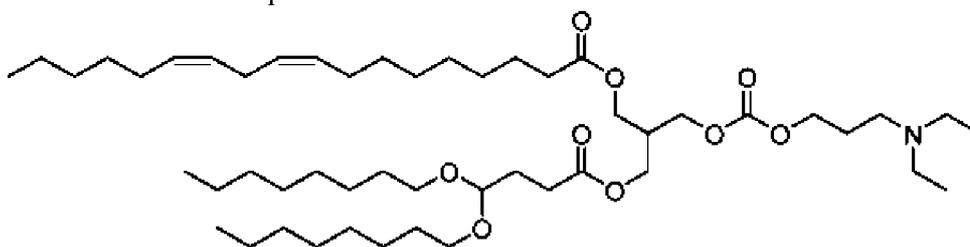






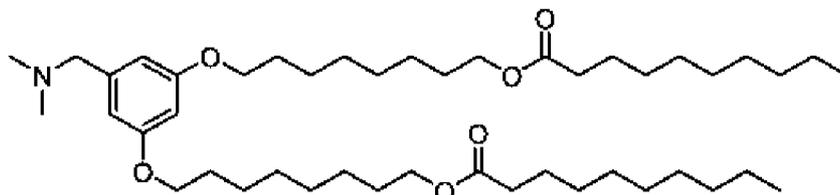
[0467] В некоторых вариантах осуществления переносчик содержит липид А, липид В, липид С и/или липид D. В некоторых вариантах осуществления включение липида А, липида В, липида С и/или липида D улучшает инкапсуляцию и/или эндосомальное высвобождение. В некоторых вариантах осуществления липид А, липид В, липид С и/или липид D описаны в международной заявке на патент PCT/US2017/028981.

[0468] В некоторых вариантах осуществления ионизируемым липидом является липид А, представляющий собой (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат. Липид А может быть изображен как:



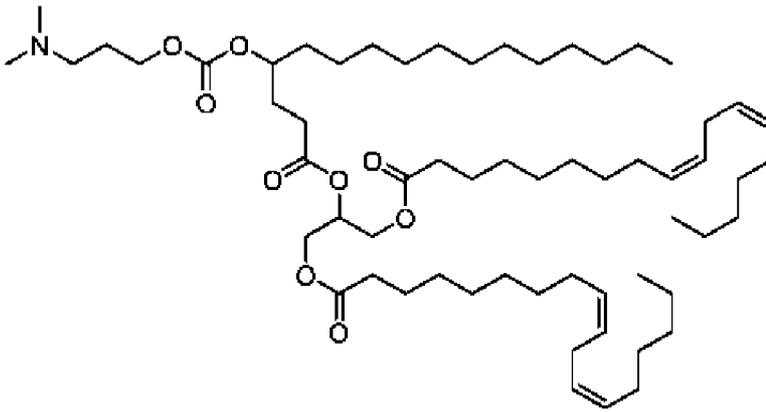
[0469] Липид А может быть синтезирован согласно WO2015/095340 (например стр. 84-86), полностью включенному в данный документ посредством ссылки.

[0470] В некоторых вариантах осуществления ионизируемым липидом является липид В, представляющий собой ((5-((диметиламино)метил)-1,3-фенилен)бис(окси))бис(октан-8,1-диил)бис(деcanoат). Липид В может быть изображен как:

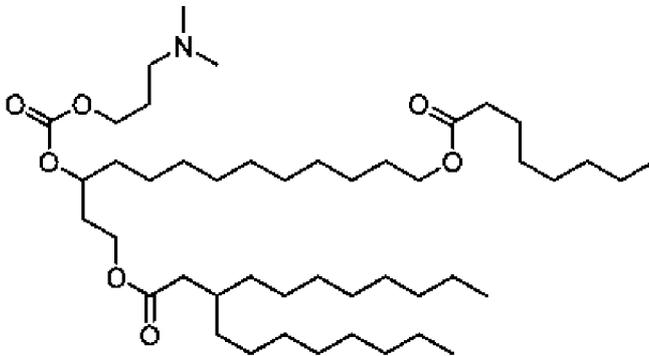


[0471] Липид В может быть синтезирован согласно WO2014/136086 (например стр. 107-09), полностью включенному в данный документ посредством ссылки.

[0472] В некоторых вариантах осуществления ионизируемым липидом является липид С, представляющий собой 2-(((4-(((3-(диметиламино)пропокси)карбонил)окси)гексадеканоил)окси)пропан-1,3-диил(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат). Липид С может быть изображен как:



[0473] В некоторых вариантах осуществления ионизируемым липидом является липид D, представляющий собой 3-(((3-(диметиламино)пропокси)карбонил)окси)-13-(октаноилокси)тридецил 3-октилундеканоат. Липид D может быть изображен как:



[0474] Липид C и Липид D могут быть синтезированы согласно WO2015/095340, полностью включенному в данный документ посредством ссылки.

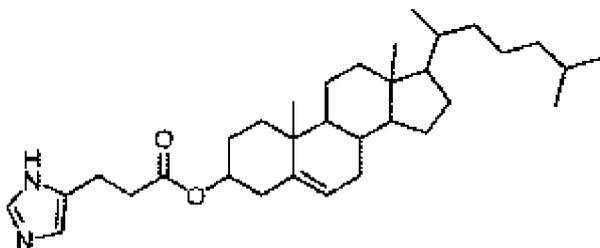
[0475] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид описан в публикации патента США № 20190321489. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид описан в международной патентной публикации WO 2010/053572, включенной в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой C12-200, описанный в абзаце [00225] WO 2010/053572.

[0476] В литературе описано несколько ионизируемых липидов, многие из которых коммерчески доступны. В некоторых вариантах осуществления такие ионизируемые липиды включены в переносчики, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления использован ионизируемый липид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N, N,N-триметиламмонийхлорид или «DOTMA». (Felgner et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); патент США № 4897355). DOTMA может быть составлен отдельно или может быть объединен с нейтральным липидом, диолеоилфосфатидилэтаноламином или «DOPE» или другими катионными или некаатионными липидами в липидную наночастицу. Другие подходящие катионные липиды включают, например, ионизируемые катионные липиды, описанные в предварительной заявке на патент США 61/617468, поданной 29 марта 2012 года (включенной в данный документ посредством ссылки), такие как, например, (15Z,18Z)-N, N-диметил-6-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-15,18-диен-1-амин

(HGT5000), (15Z,18Z)-N, N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-4,15,18-триен-1-амин (HGT5001) и (15Z,18Z)-N, N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-5,15,18-триен-1-амин (HGT5002), C12-200 (описанный в WO 2010/053572), 2-(2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-4-ил)-N, N-диметилэтанамин (DLinKC2-DMA)) (См. WO 2010/042877; Semple et al. *Nature Biotech.* 28:172-176 (2010)), 2-(2,2-ди((9Z,2Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-4-ил)-N, N-диметилэтанамин (DLin-KC2-DMA), (3S,10R,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил 3-(1H-имидазол-4-ил)пропаноат (ICE), (15Z,18Z)-N, N-диметил-6-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-15,18-диен-1-амин (HGT5000), (15Z,18Z)-N, N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-4,15,18-триен-1-амин (HGT5001), (15Z,18 Z)-N, N-диметил-6-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетракоза-5,15,18-триен-1-амин (HGT5002), 5-карбокиспермилглицин-диоктадециламид (DOGS), 2,3-диолеилокси-N-[2(спермин-карбоксамидо)этил]-N, N-диметил-1-пропанаминий (DOSPA) (Behr et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 86, 6982 (1989); патент США № 5171678; 5334761), 1,2-Диолеоил-3-Диметиламмоний-Пропан (DODAP), 1,2-Диолеоил-3-Триметиламмоний-Пропан или (DOTAP). Рассматриваемые ионизируемые липиды также включают 1,2-дисткарилокси-N, N-диметил-3-аминопропан (DSDMA), 1,2-диолеилокси-N, N-диметил-3-аминопропан (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N, N-диметил-3-аминопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N, N-диметил-3-аминопропан (DLenDMA), N-диолеил-N, N-диметиламмоний хлорид (DODAC), N, N-дистеарил-N, N-диметиламмоний бромид (DDAB), N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N, N-диметил-N-гидроксиэтиламмоний бромид (DMRIE), 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис, цис-9,12-октадекадиеноксипропан (CLinDMA), 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси]-3-диметил-1-(цис, цис-9',1-2'-октадекадиеноксипропан (CpLinDMA), N, N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин (DMOBA), 1,2-N, N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DOcarbDAP), 2,3-дилинолеилокси-N, N-диметилпропиламин (DLinDAP), 1,2-N, N'-Дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DLincarbDAP), 1,2-дилинолеоилкарбамил-3-диметиламинопропан (DLinCDAP), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-ХТС2-DMA) или GL67 или их смеси. (Heyes, J. et al. *J Controlled Release* 107: 276-287 (2005); Morrissey, D V. et al. *Nat. Biotechnol.* 23(8): 1003-1007 (2005); РСТ Публикация WO2005/121348A1). В настоящем изобретении также рассматривается использование ионизируемых липидов на основе холестерина для получения переносчиков (например липидных наночастиц). Такие ионизируемые липиды на основе холестерина можно использовать либо отдельно, либо в комбинации с другими липидами. Подходящие ионизируемые липиды на основе холестерина включают, например, DC-Холестерин (N, N-диметил-N-этилкарбоксамидохолестерин) и 1,4-бис(3-N-оллеиламино-пропил)пиперазин (Gao, et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179, 280 (1991); Wolf et al. *BioTechniques* 23, 139 (1997); патент США № 5744335).

[0477] Также рассматриваются катионные липиды, например, липиды на основе диалкиламино, на основе имидазола и на основе гуанидина. Например, также рассматривается использование ионизируемого липида (3S,10R, 13R, 17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил 3-(1H-имидазол-4-ил)пропаноат (ICE), как раскрыто в международной заявке № PCT/US2010/058457, включенной в данный документ посредством ссылки.

[0478] Также рассматриваются ионизируемые липиды, например, липиды на основе диалкиламино, на основе имидазола и на основе гуанидина. Например, некоторые варианты осуществления направлены на композицию, содержащую один или несколько ионизируемых липидов на основе имидазола, например, сложный холестеринный эфир имидазола или «ICE» липид, (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил 3-(1H-имидазол-4-ил)пропаноат, представленный структурой (XIII) ниже. В одном варианте осуществления переносчик для доставки siRNA может содержать один или несколько ионизируемых липидов на основе имидазола, например, сложный холестеринный эфир имидазола или «ICE» липид (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил 3-(1H-имидазол-4-ил)пропаноат, представленный структурой (XIII).



(XIII)

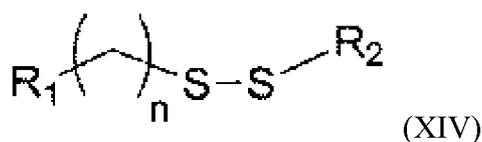
[0479] Не желая быть связанными конкретной теорией, полагают, что фузогенность катионного липида на основе имидазола ICE связана с разрушением эндосом, которому способствует имидазольная группа, которая имеет более низкую pKa по сравнению с традиционными ионизируемыми липидами. разрушение эндосом, в свою очередь, способствует осмотическому набуханию и разрушению липосомальной мембраны с последующей трансфекцией или внутриклеточным высвобождением в клетку-мишень содержимого загруженной в нее нуклеиновой кислоты (кислот).

[0480] Ионизируемые липиды на основе имидазола также характеризуются пониженной токсичностью по сравнению с другими ионизируемыми липидами.

[0481] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид описан в публикации патента США № 20190314284. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид описан структурой 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (например HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 и/или HGT4005). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько расщепляемых функциональных групп (например дисульфид)

обеспечивают диссоциацию, например, гидрофильной функциональной головной группы от липофильной функциональной хвостовой группы соединения (например под воздействием окислительных, восстановительных или кислых состояний), таким образом облегчая фазовый переход в липидном бислое одной или нескольких клеток-мишеней. Например, когда переносчик (например липидная наночастица) содержит один или несколько липидов структур 3-10, фазовый переход в липидном бислое одной или нескольких клеток-мишеней облегчает доставку circRNA в одну или несколько клеток-мишеней.

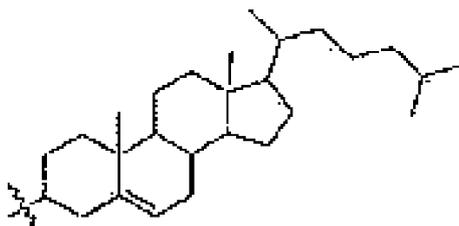
[0482] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид описан структурой (XIV),



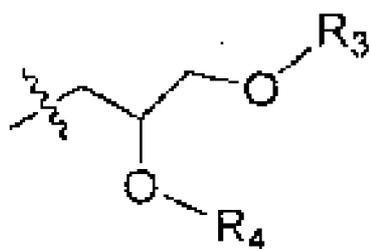
где:

R_1 выбирают из группы, состоящей из имидазола, гуанидина, amino, имина, енамина, необязательно замещенного алкиламино (например такого алкиламино, как диметиламино) и пиридила;

R_2 выбирают из группы, состоящей из структуры XV и структуры XVI;



XV



XVI

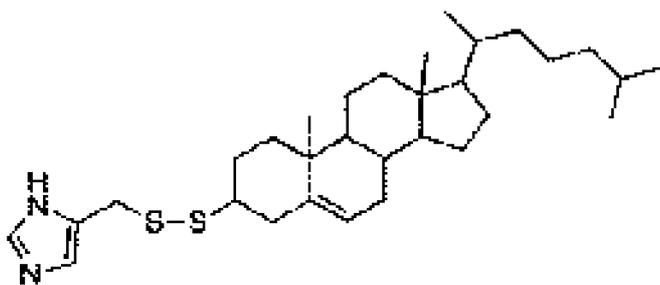
где R_3 и R_4 каждый независимо выбирают из группы, состоящей из необязательно замещенного, насыщенного в разной степени или ненасыщенного C_6 - C_{20} алкила и необязательно замещенного, насыщенного в разной степени или ненасыщенного C_6 - C_{20} ацила; и где n составляет ноль или любое положительное целое число (например один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или более). В некоторых вариантах осуществления R_3 и R_4 каждый представляет собой необязательно замещенный, полиненасыщенный C_{18} алкил, тогда как в других вариантах осуществления R_3 и R_4 каждый представляет незамещенный, полиненасыщенный C_{18} алкил. В некоторых вариантах осуществления один или несколько

элементов из R₃ и R₄ представляют (9Z,12Z)-октадека-9,12-диен.

[0483] Также, в данном документе раскрыты фармацевтические композиции, которые содержат соединение со структурой XIV, где R₁ выбирают из группы, состоящей из имидазола, гуанидина, амина, имида, енамина, необязательно замещенного алкиламино (например такого алкиламино, как диметиламино) и пиридила; где R₂ имеет структуру XV; и где n составляет ноль или любое положительное целое число. Кроме того, в данном документе раскрыты фармацевтические композиции, содержащие соединение со структурой XIV, где R₁ выбирают из группы, состоящей из имидазола, гуанидина, амина, имида, енамина, необязательно замещенного алкиламино (например такого алкиламино, как диметиламино) и пиридила; где R₂ имеет структуру XVI; где R₃ и R₄ каждый независимо выбирают из группы, состоящей из необязательно замещенного, насыщенного в разной степени или ненасыщенного C₆-C₂₀ алкила и необязательно замещенного, насыщенного в разной степени или ненасыщенного C₆-C₂₀ ацилк; и где n составляет ноль или любое положительное целое число. В некоторых вариантах осуществления. R₃ и R₄ каждый представляет собой необязательно замещенный, полиненасыщенный C₁₈ алкил, тогда как в других вариантах осуществления R₃ и R₄ каждый представляет незамещенный, полиненасыщенный C₁₈ алкил (например октадека-9,12-диен).

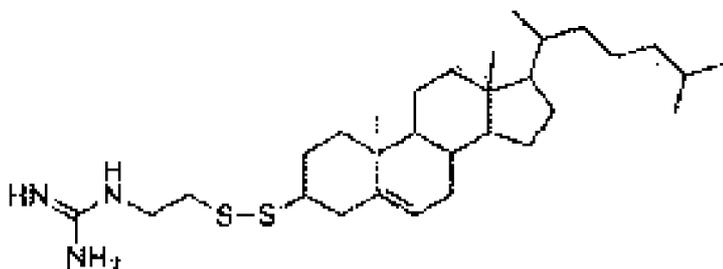
[0484] В некоторых вариантах осуществления группа или головная группа R₁ представляет собой полярную или гидрофильную группу (например одну или несколько групп из имидазола, гуанидина и амина) и связана с липидной группой R₂ с помощью дисульфидной (S-S) расщепляемой линкерной группой, например, как показано в структуре XIV. Другие рассматриваемые расщепляемые линкерные группы могут включать композиции, которые содержат одну или несколько дисульфидных (S-S) линкерных групп, связанных (например ковалентно связанных), например, с алкильной группой (например с C₁-C₁₀ алкилом). В некоторых вариантах осуществления группа R₁ ковалентно связана с расщепляемой линкерной группой с помощью C₁-C₂₀ алкильной группой (например где n составляет от одного до двадцати) или, альтернативно, может быть непосредственно связана с расщепляемой линкерной группой (например где n составляет ноль). В некоторых вариантах осуществления дисульфидная линкерная группа может расщепляться *in vitro* и/или *in vivo* (например ферментативно расщепляться или расщепляться под воздействием кислотных или восстановительных условий).

[0485] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к соединению 5-(((10,13-диметил-17-(6-метилгептан-2-ил)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)дисульфанил)метил)-1H-имидазол, имеющему структуру XVII (называемому в данном документе «HGT4001»).



XVII

[0486] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к соединению 1-(2-(((3S,10R,13R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)дисульфанил)этил)гуанидин, имеющему структуру XVIII (называемую в данном документе «HGT4002»).



XVIII

[0487] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к соединению 2-(((2,3-Бис((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси)пропил)дисульфанил)-N,N-диметиламин, имеющему структуру XIX (называемую в данном документе «HGT4003»).



XIX

[0488] В других вариантах осуществления изобретение относится к соединению 5-(((2,3-бис((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси)пропил)дисульфанил)метил)-1H-имидазол, имеющему структуру XX (называемому в данном документе «HGT4004»).



XX

[0489] В других вариантах осуществления изобретение относится к соединению 1-(((2,3-бис((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси)пропил)дисульфанил)метил)гуанидин, имеющему структуру XXI (называемому в данном документе «HGT4005»).

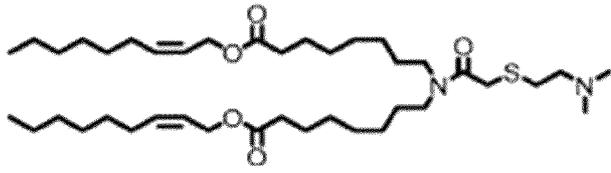
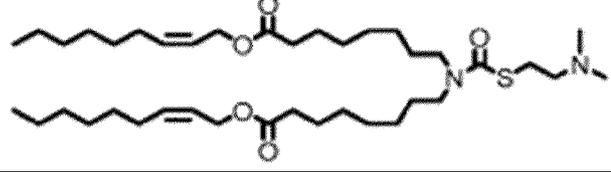
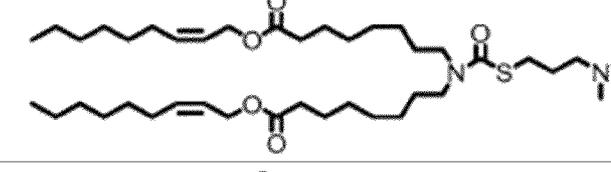
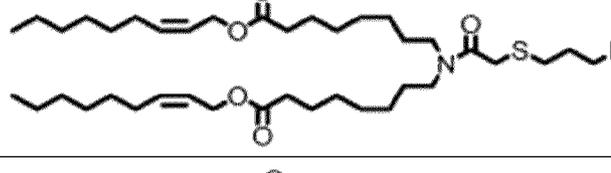
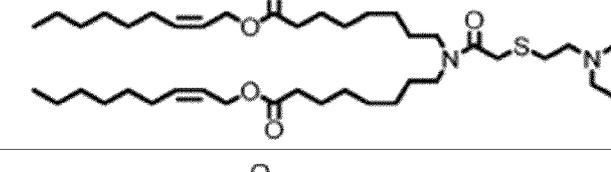
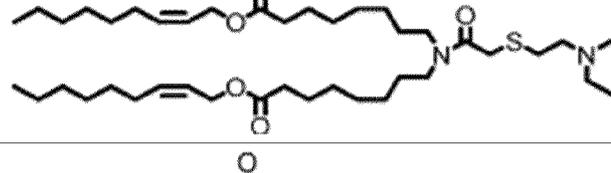
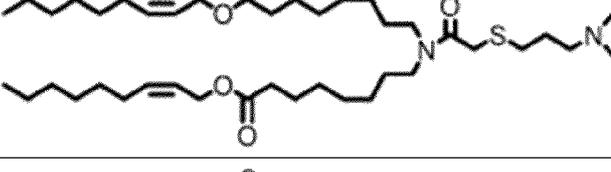
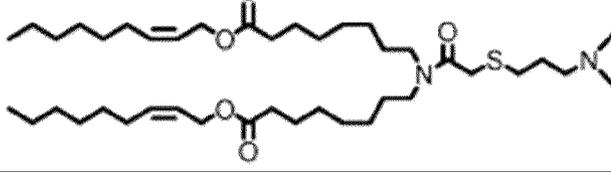
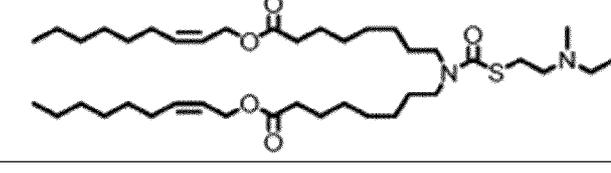


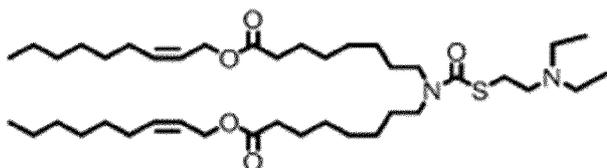
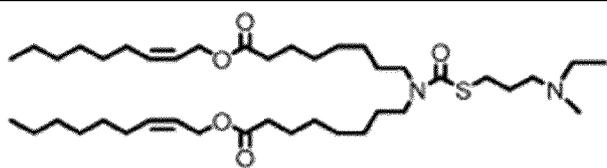
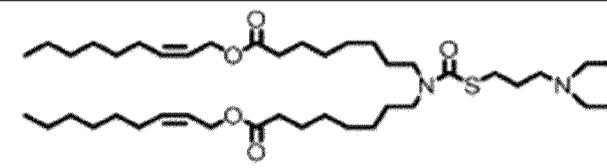
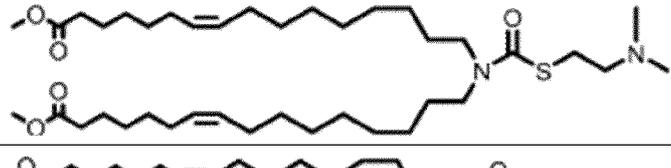
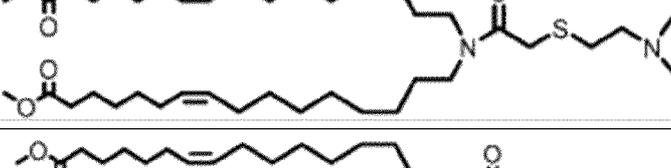
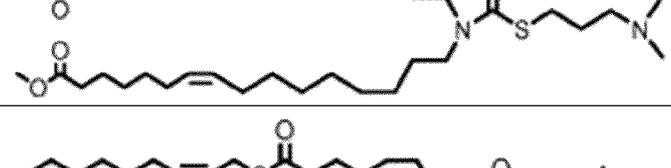
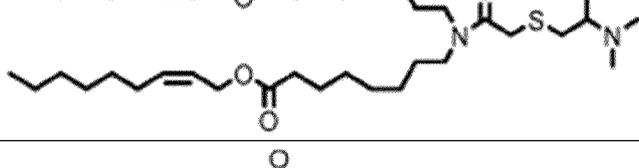
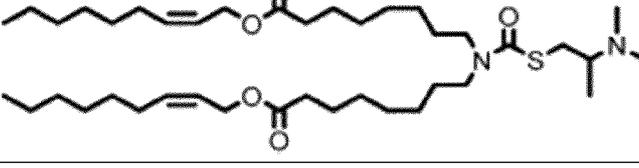
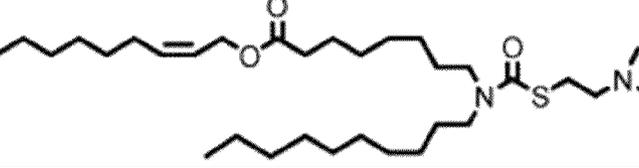
XXI

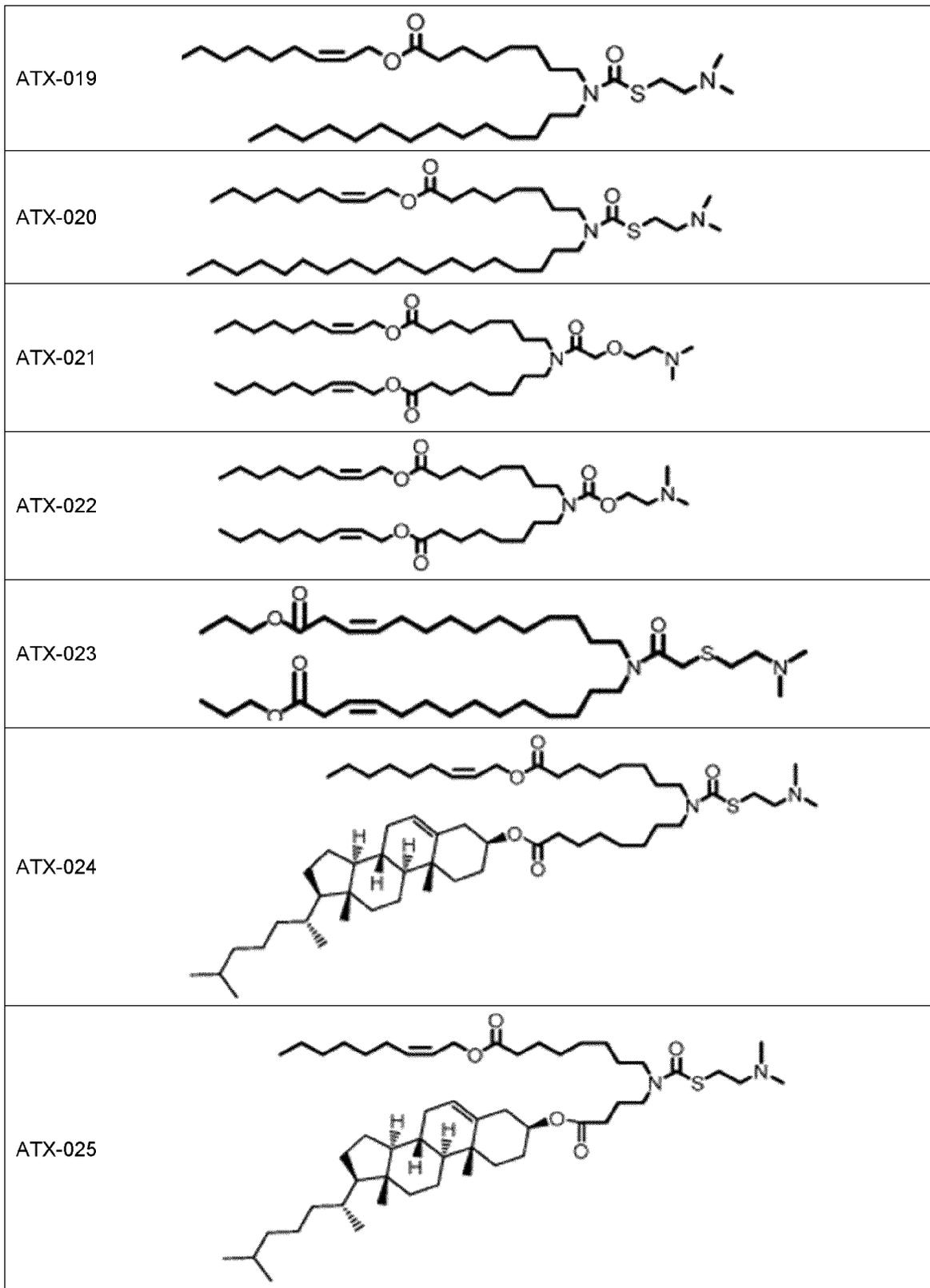
[0490] В некоторых вариантах осуществления соединения, описанные в виде структур 3-10, представляют собой ионизируемые липиды.

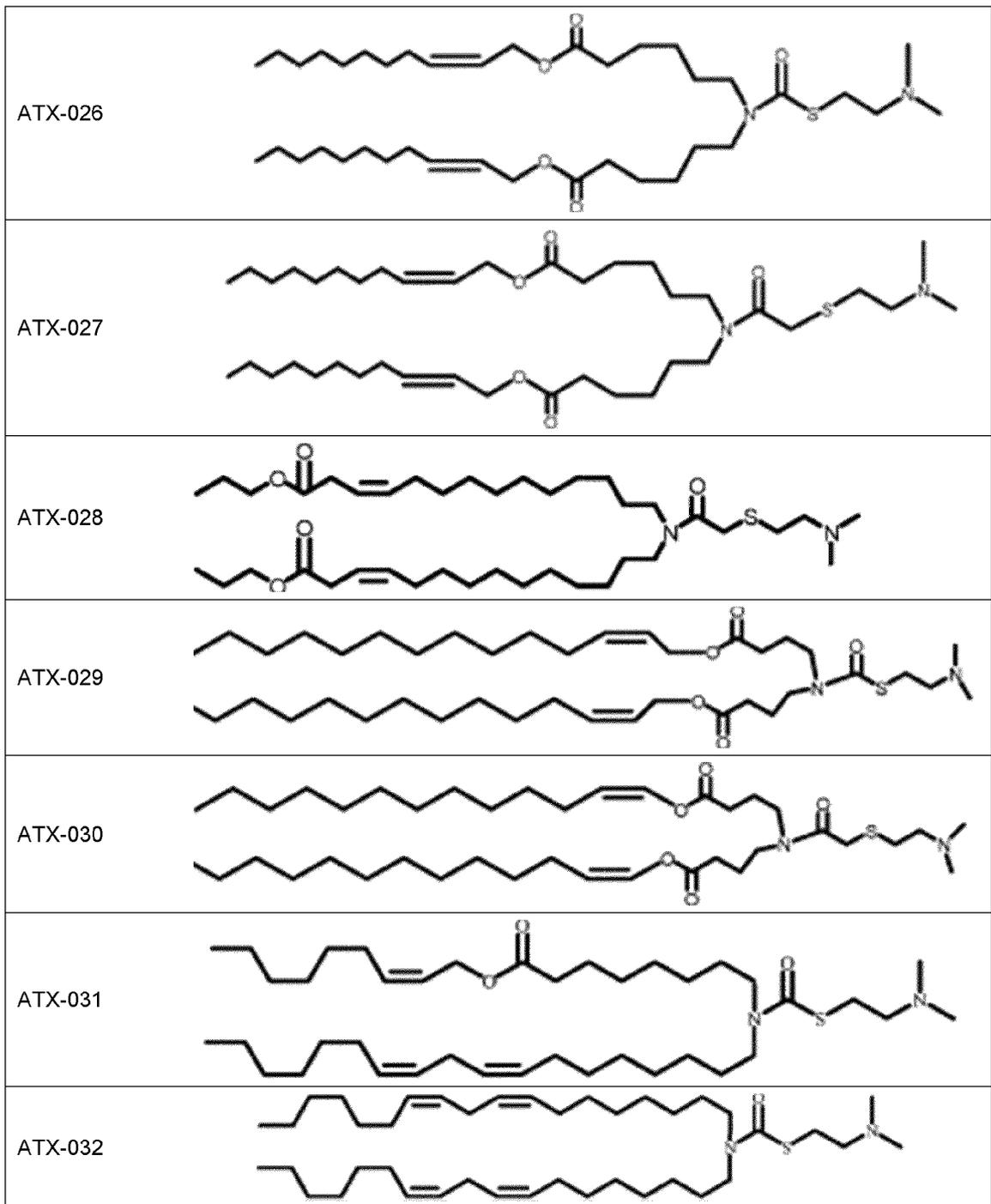
[0491] Соединения, и в частности соединения на основе имидазола, описанные в виде структур 3-8 (например HGT4001 и HGT4004), характеризуются пониженной токсичностью, в частности по сравнению с традиционными ионизируемыми липидами. В некоторых вариантах осуществления переносчики, описанные в данном документе, содержат одно или несколько соединений ионизируемых липидов на основе имидазола, чтобы можно было понизить или иным образом ограничить относительную концентрацию других более токсичных ионизируемых липидов в таких фармацевтических или липосомальных композициях.

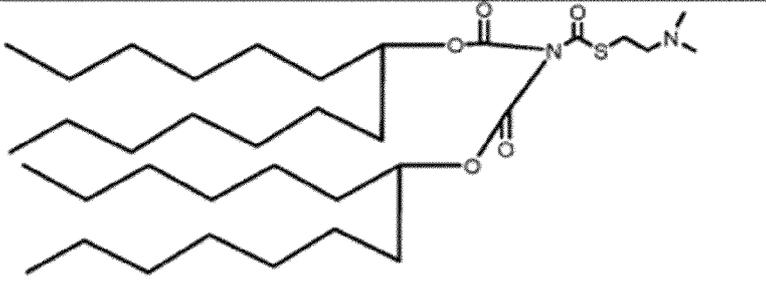
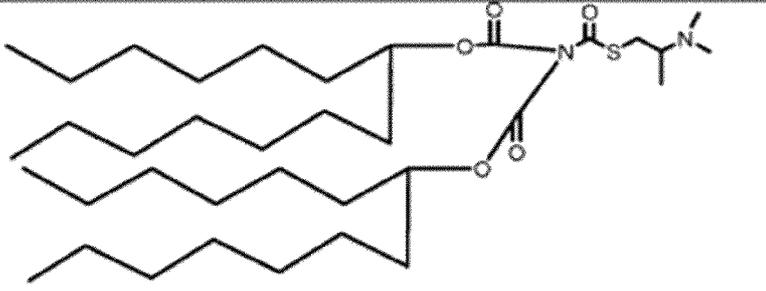
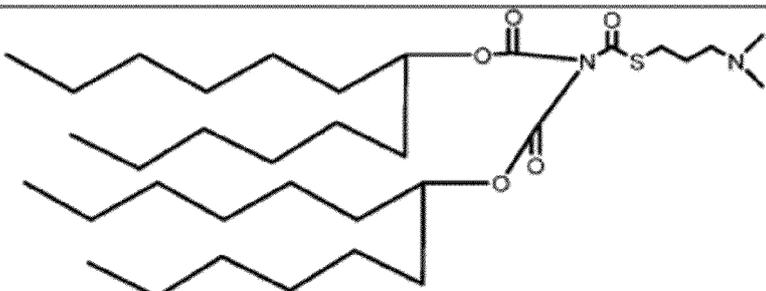
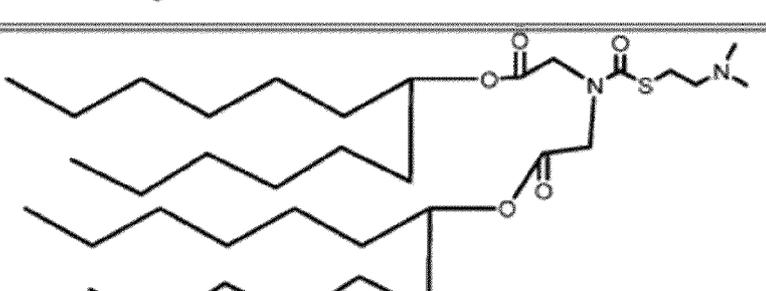
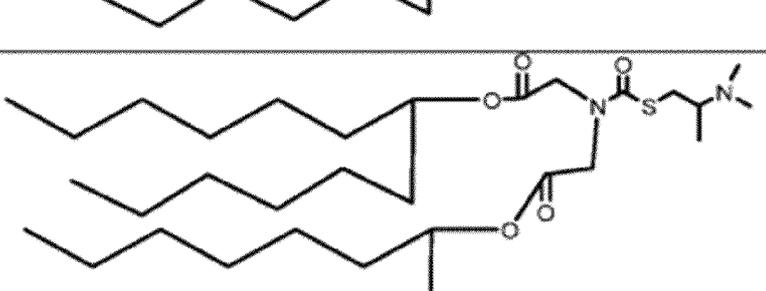
[0492] Ионизируемые липиды включают липиды, раскрытые в международной заявке на патент PCT/US2019/025246 и публикации патента США 2017/0190661 и 2017/0114010, полностью включенных в данный документ посредством ссылки. Ионизируемые липиды могут включать липид, выбранный из следующих таблиц 12, 13, 14 или 15.

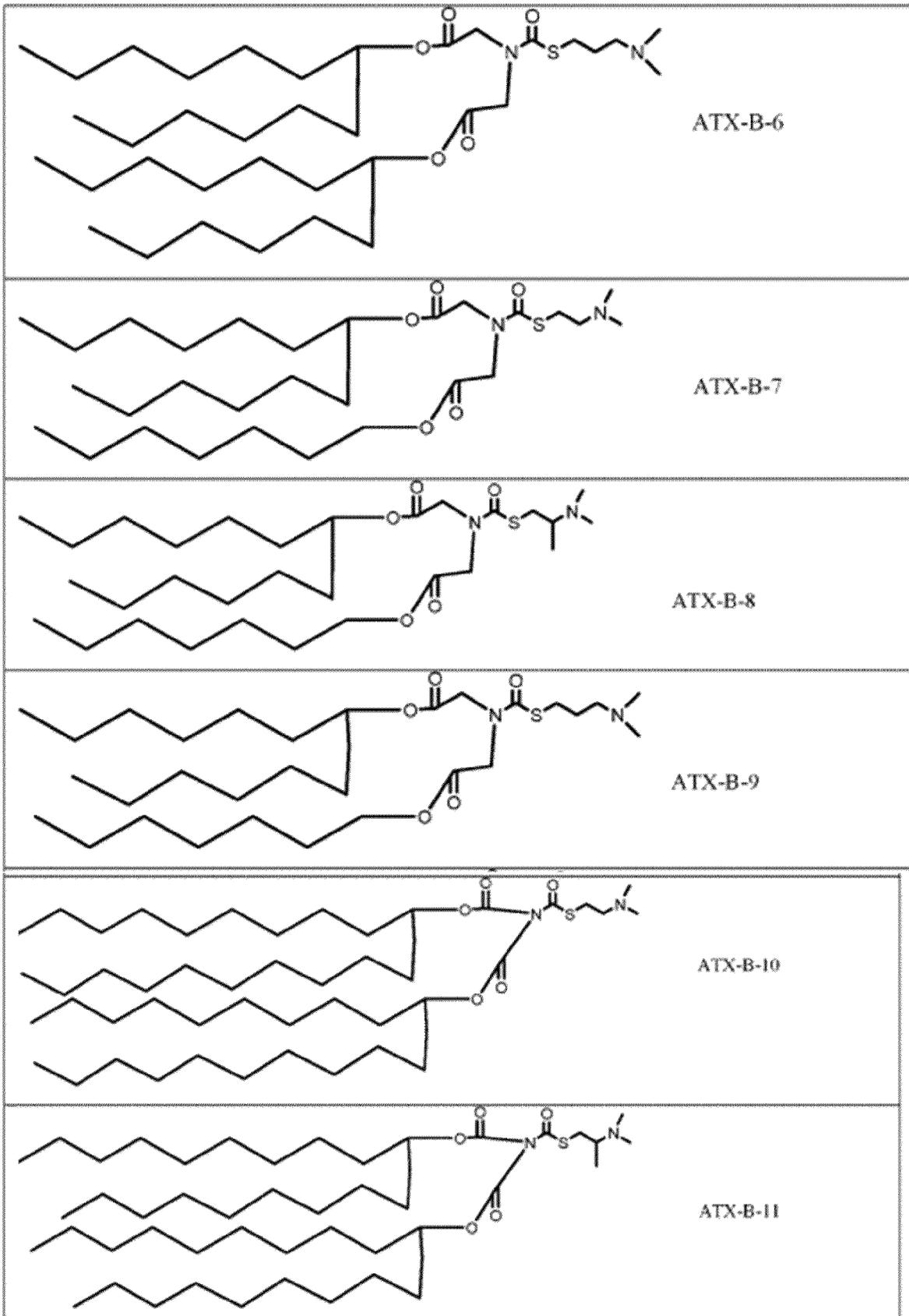
ATX-001	
ATX-002	
ATX-003	
ATX-004	
ATX-005	
ATX-006	
ATX-007	
ATX-008	
ATX-009	

ATX-010	
ATX-011	
ATX-012	
ATX-013	
ATX-014	
ATX-015	
ATX-016	
ATX-017	
ATX-018	





	ATX-B-1
	ATX-B-2
	ATX-B-3
	ATX-B-4
	ATX-B-5



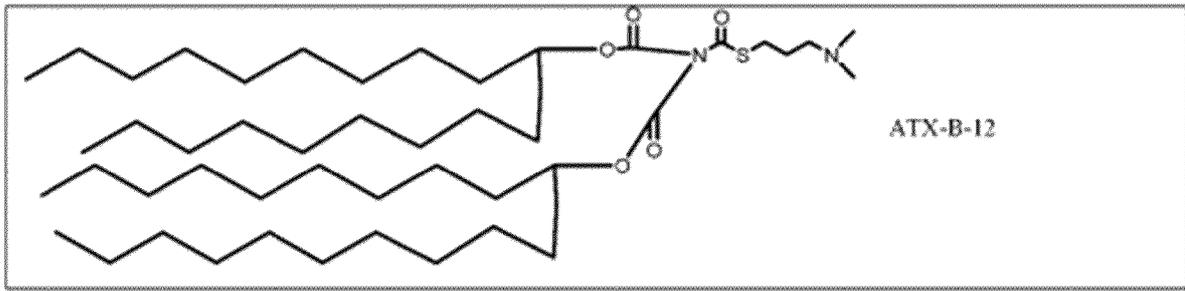
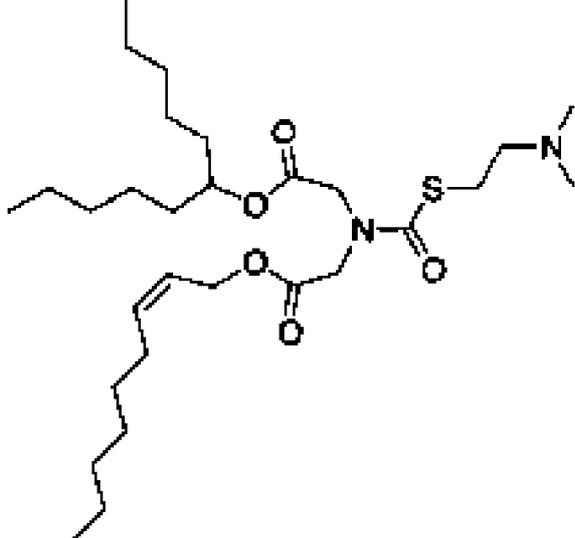
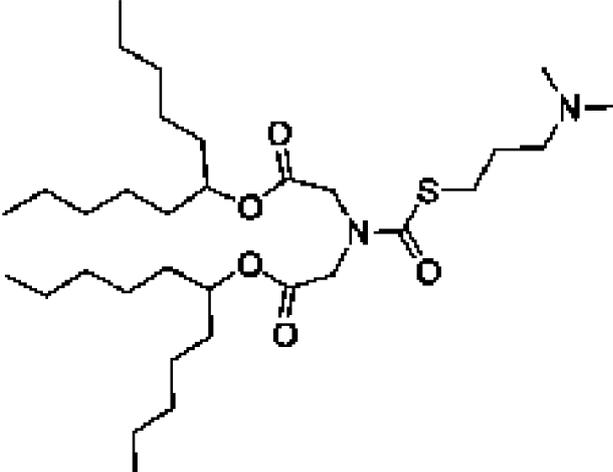
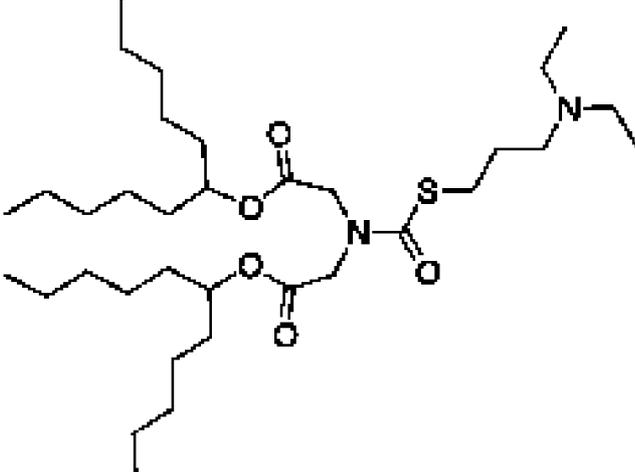
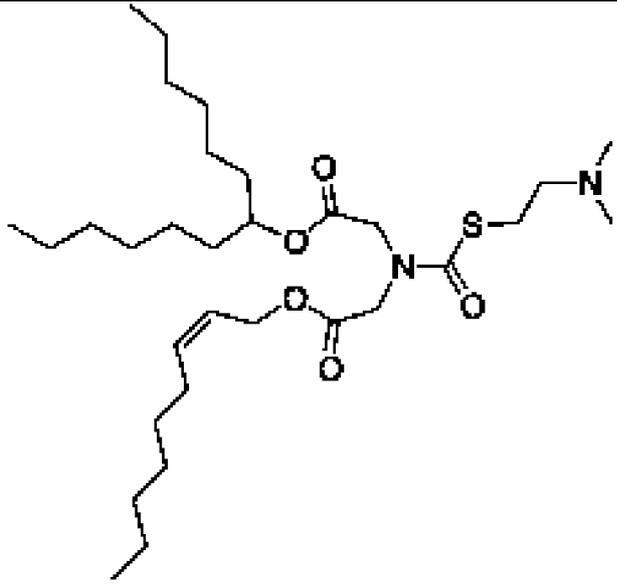
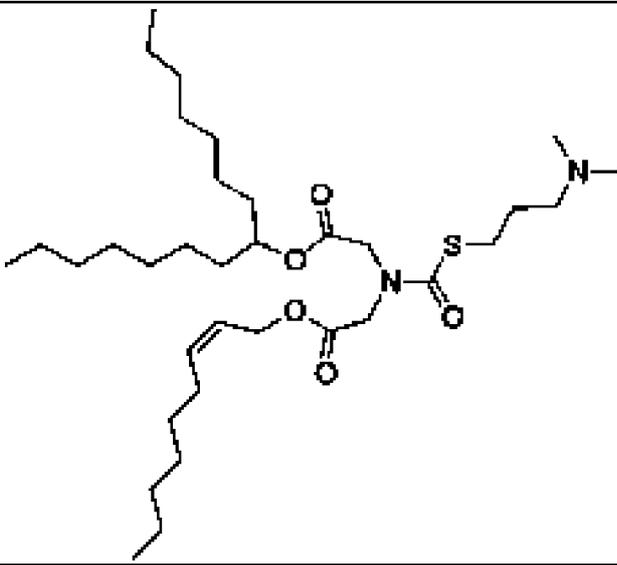
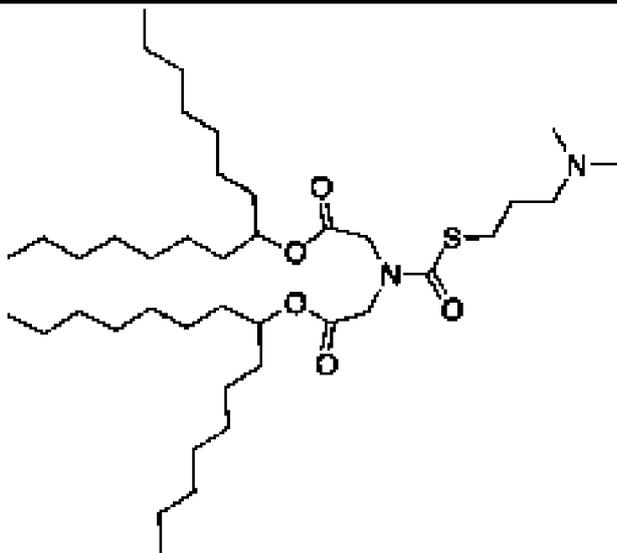
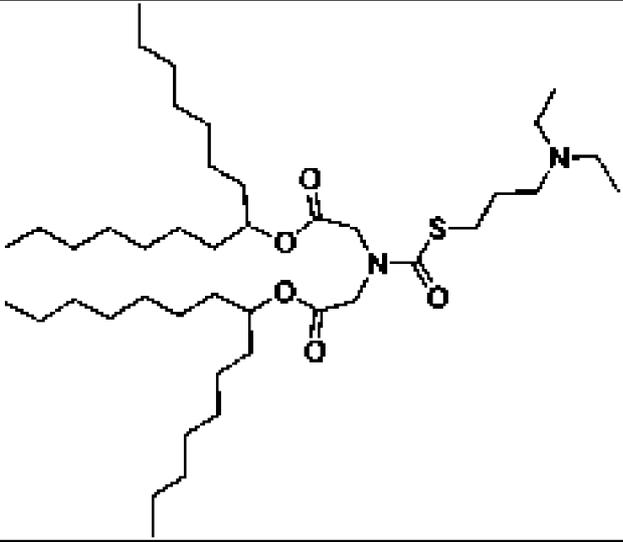
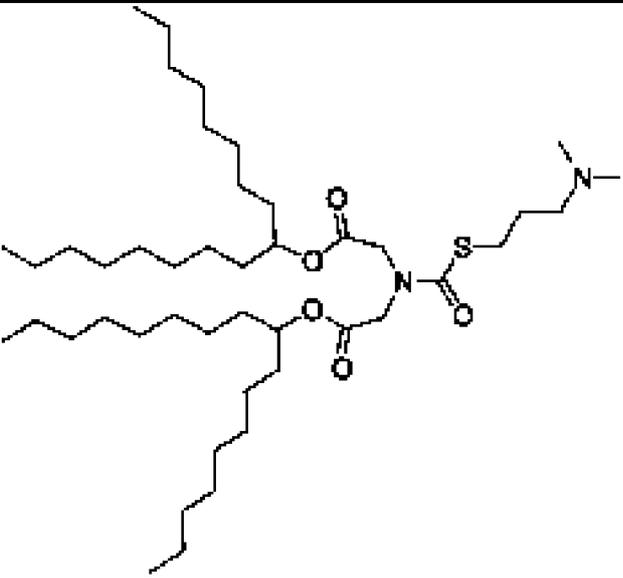
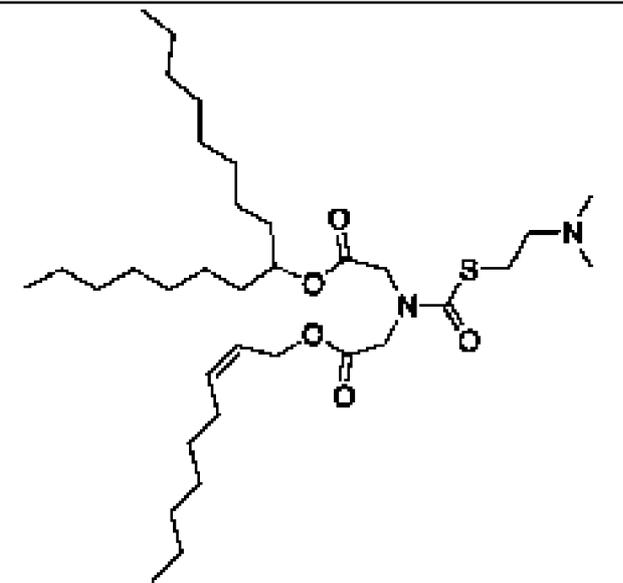
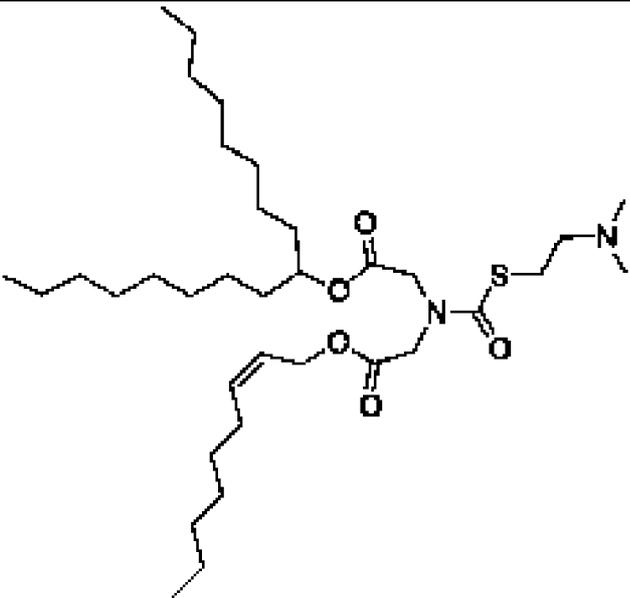
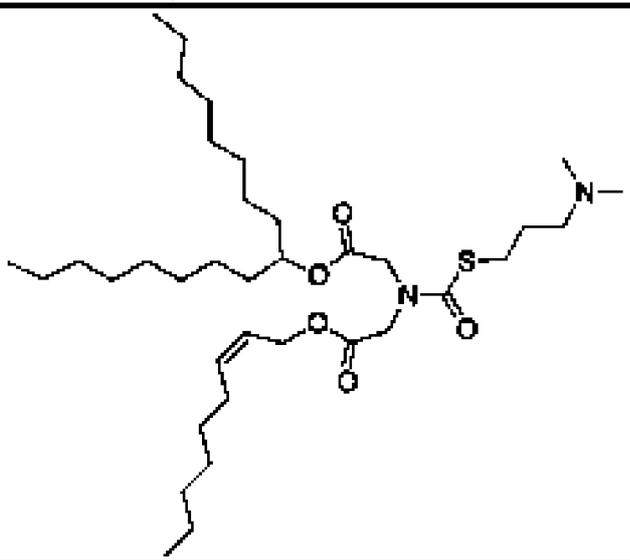
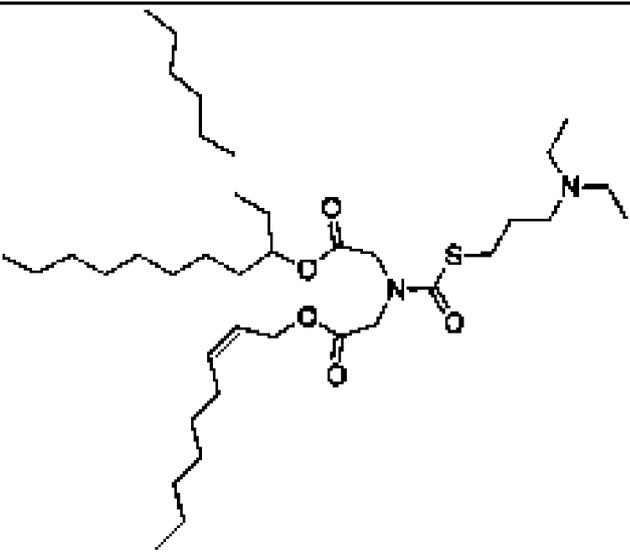


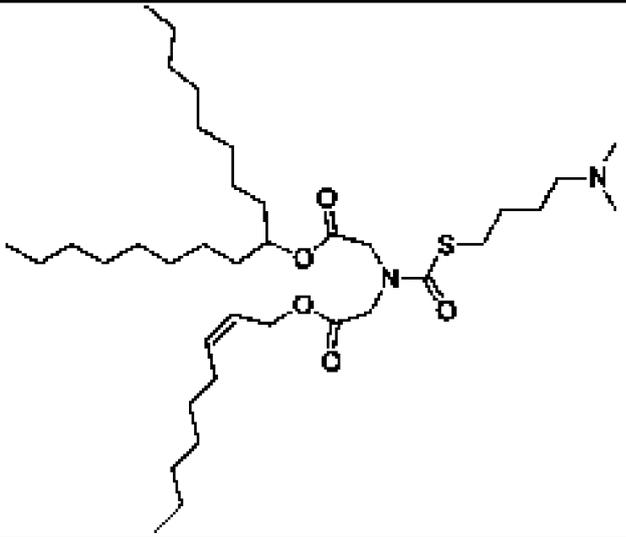
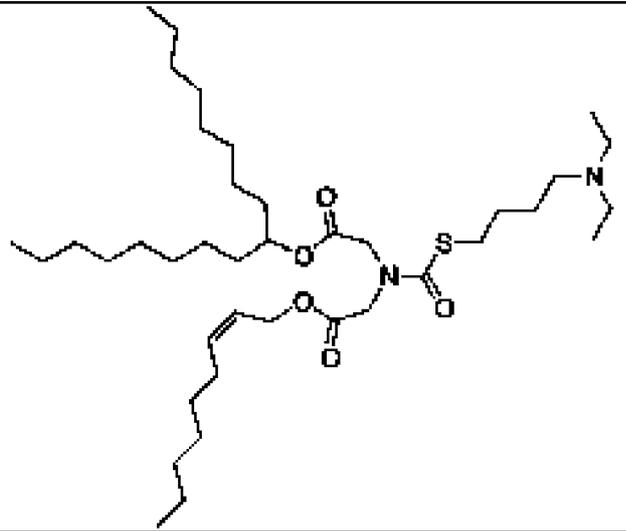
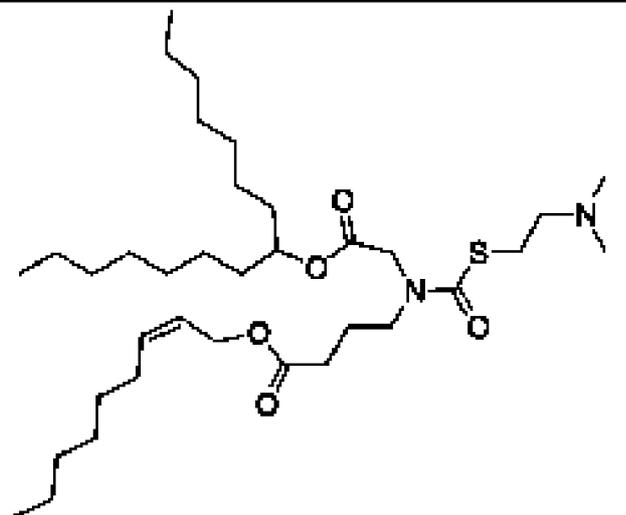
Таблица 14

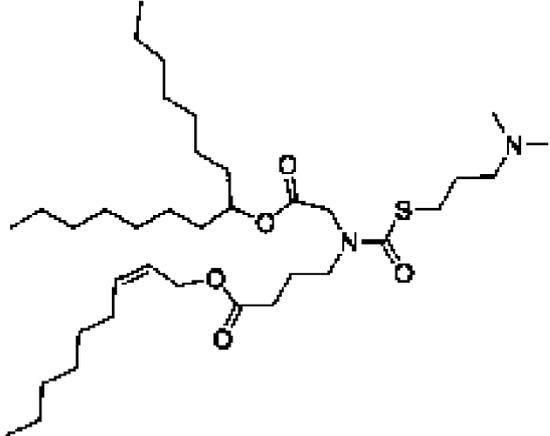
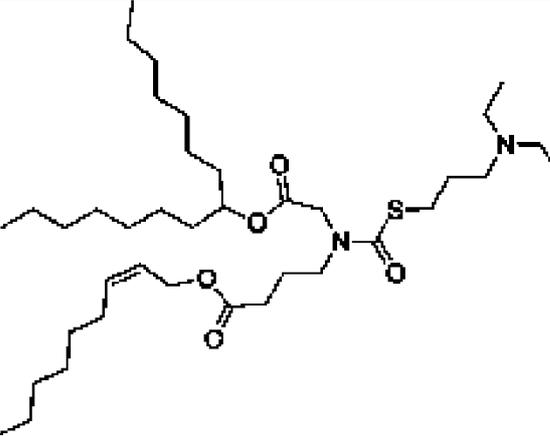
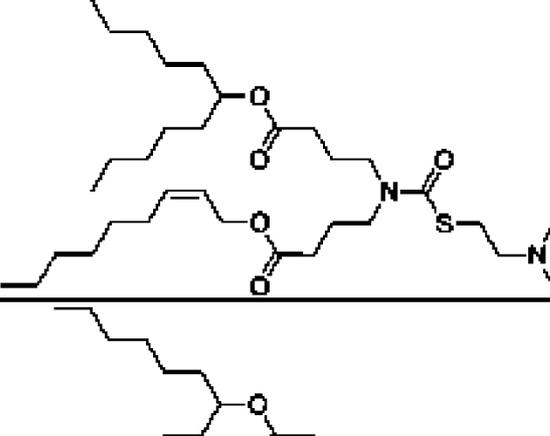
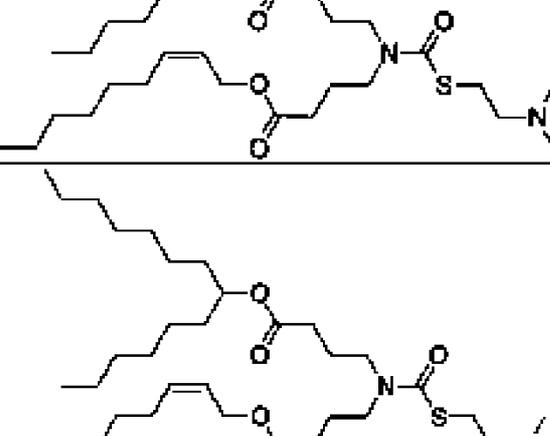
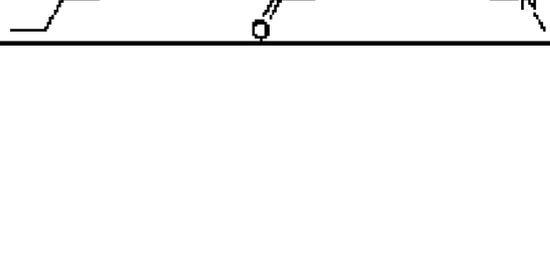
Compound	ATX-#
	0063
	0130
	0131

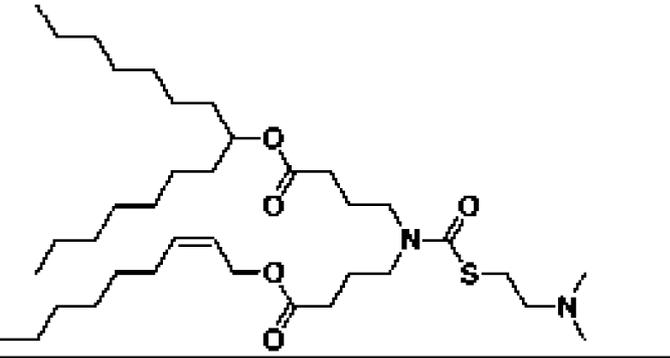
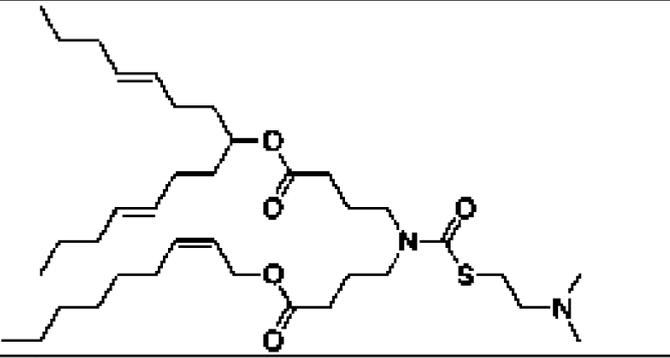
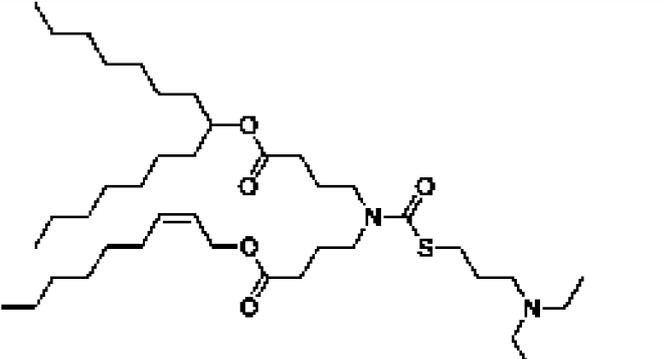
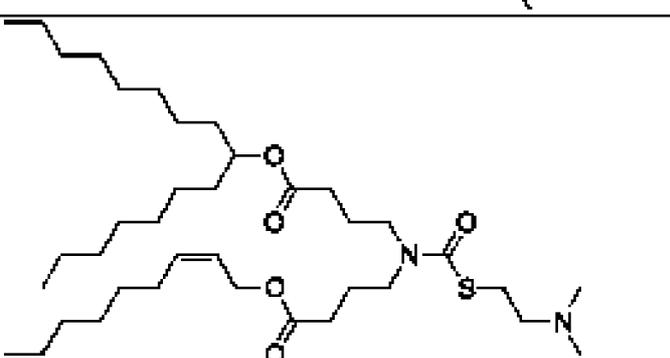
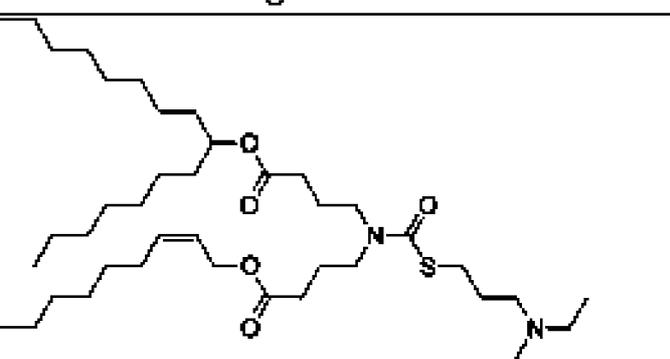
	0044
	0111
	0132

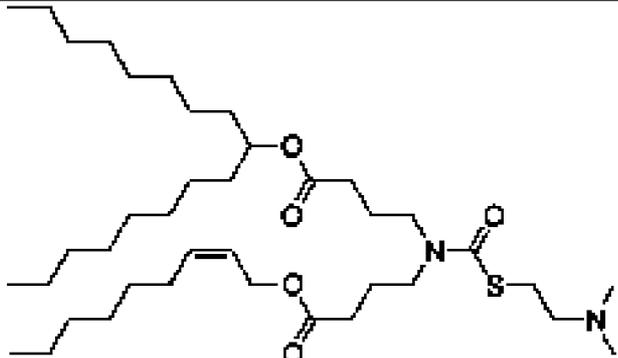
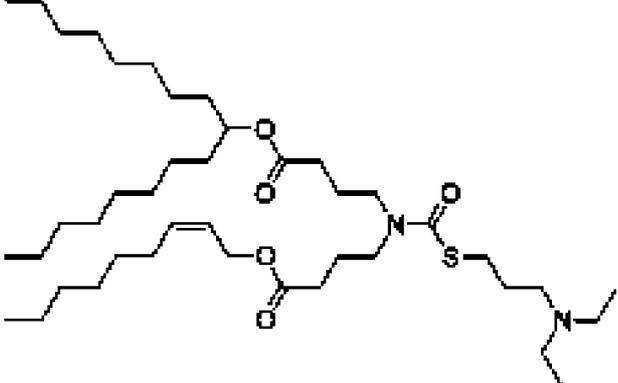
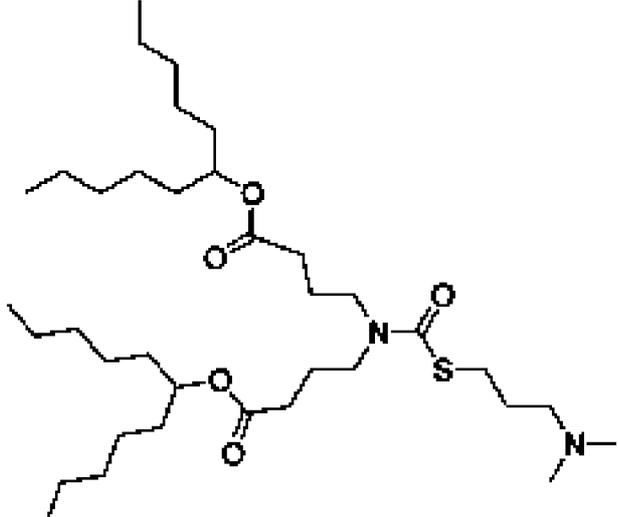
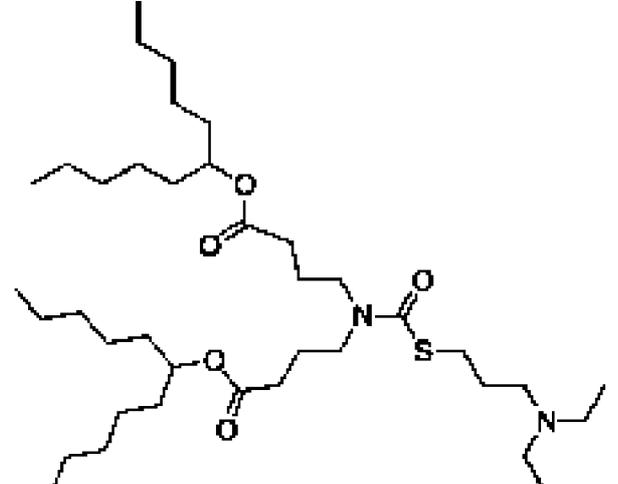
	0134
	0133
	0064

 <p>Chemical structure 0061: A 12-membered cyclic urea derivative. The ring contains two carbonyl groups and a nitrogen atom. One carbon is substituted with a long alkyl chain (approximately 12 carbons). Another carbon is substituted with a vinyl group. The nitrogen atom is substituted with a dimethylaminoethyl group (-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂).</p>	0061
 <p>Chemical structure 0100: A 12-membered cyclic urea derivative. The ring contains two carbonyl groups and a nitrogen atom. One carbon is substituted with a long alkyl chain (approximately 12 carbons). Another carbon is substituted with a vinyl group. The nitrogen atom is substituted with a dimethylaminoethyl group (-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂).</p>	0100
 <p>Chemical structure 0117: A 12-membered cyclic urea derivative. The ring contains two carbonyl groups and a nitrogen atom. One carbon is substituted with a long alkyl chain (approximately 12 carbons). Another carbon is substituted with a vinyl group. The nitrogen atom is substituted with a diethylaminoethyl group (-CH₂-CH₂-N(CH₂CH₃)₂).</p>	0117

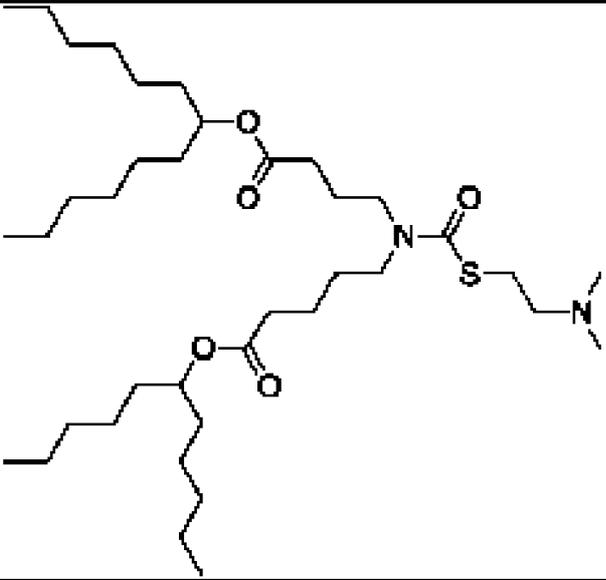
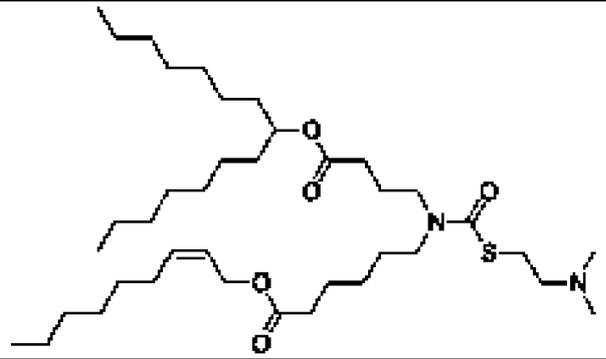
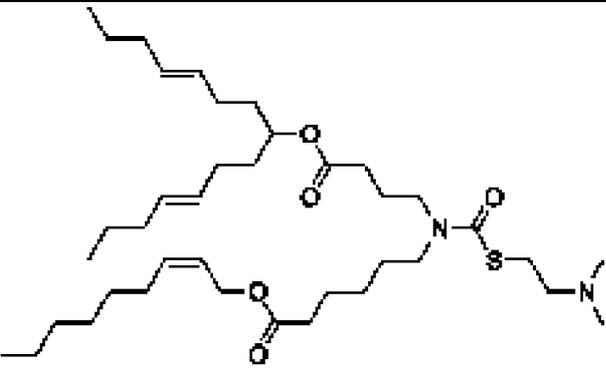
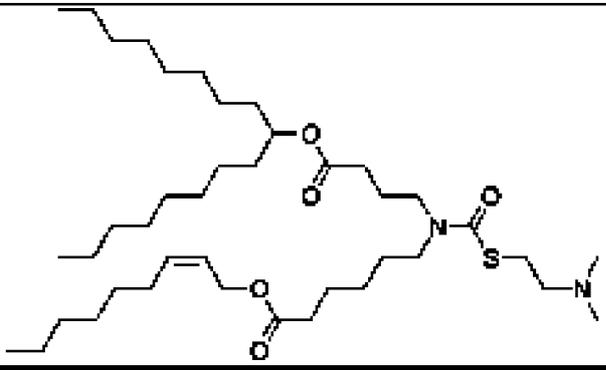
 <p>Chemical structure 0114: A 10-membered cyclic urea derivative. The ring contains two carbonyl groups and one nitrogen atom. One carbon of the ring is substituted with a long alkyl chain. Another carbon is substituted with a vinyl group. The nitrogen atom is substituted with a side chain consisting of a methylene group, a sulfur atom, a carbonyl group, and a secondary amine group.</p>	0114
 <p>Chemical structure 0115: A 10-membered cyclic urea derivative. The ring contains two carbonyl groups and one nitrogen atom. One carbon of the ring is substituted with a long alkyl chain. Another carbon is substituted with a vinyl group. The nitrogen atom is substituted with a side chain consisting of a methylene group, a sulfur atom, a carbonyl group, and a secondary amine group.</p>	0115
 <p>Chemical structure 0101: A 10-membered cyclic urea derivative. The ring contains two carbonyl groups and one nitrogen atom. One carbon of the ring is substituted with a long alkyl chain. Another carbon is substituted with a vinyl group. The nitrogen atom is substituted with a side chain consisting of a methylene group, a sulfur atom, a carbonyl group, and a secondary amine group.</p>	0101

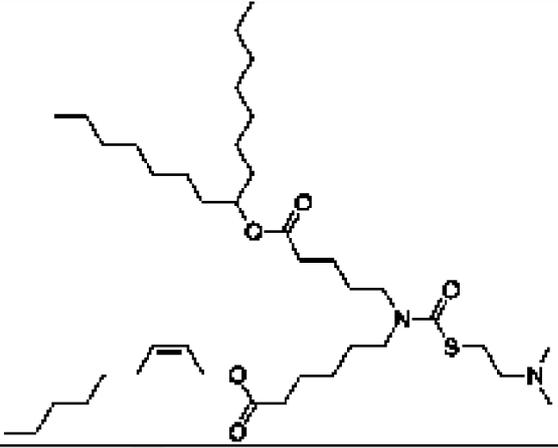
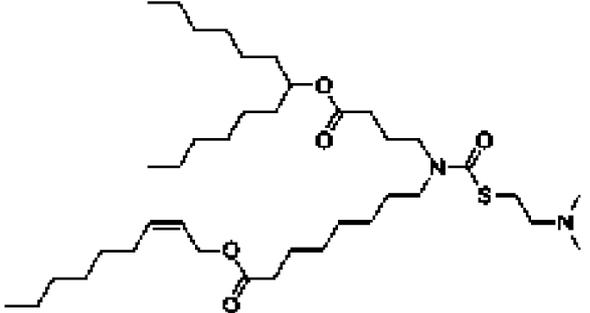
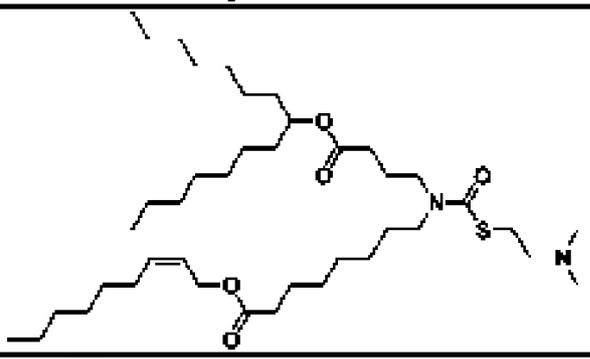
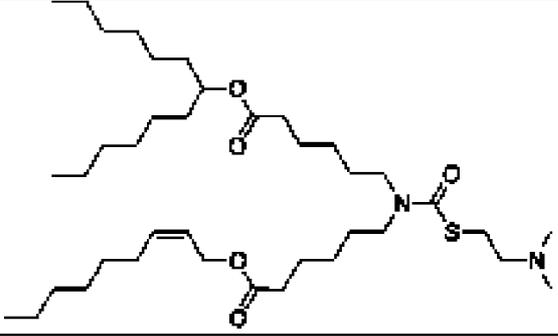
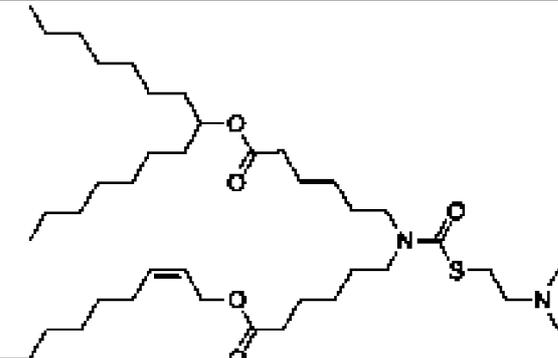
	0106
	0116
	0043
	0086
	0058

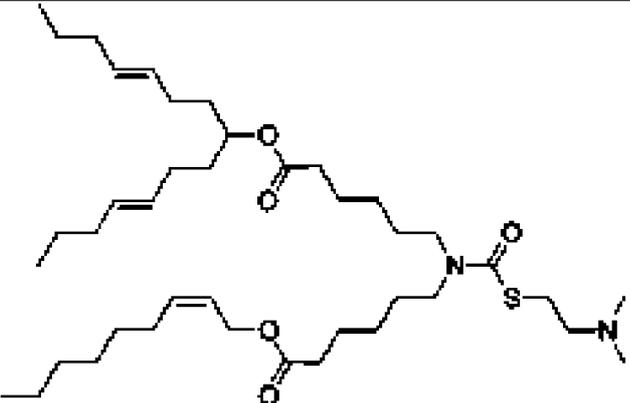
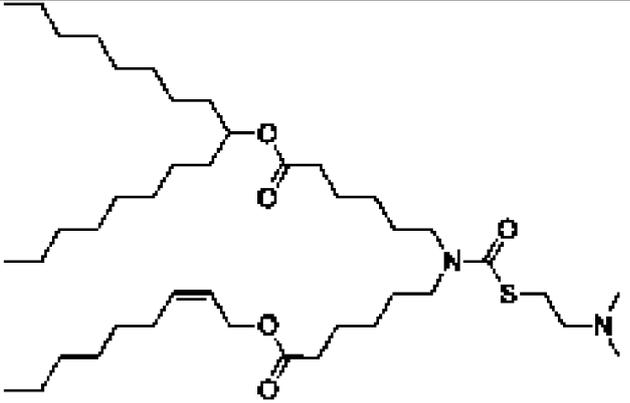
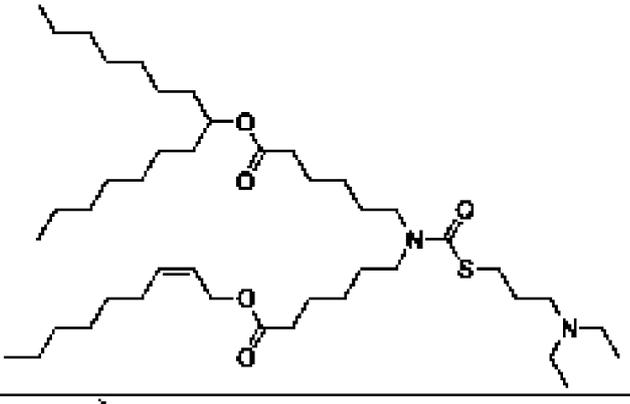
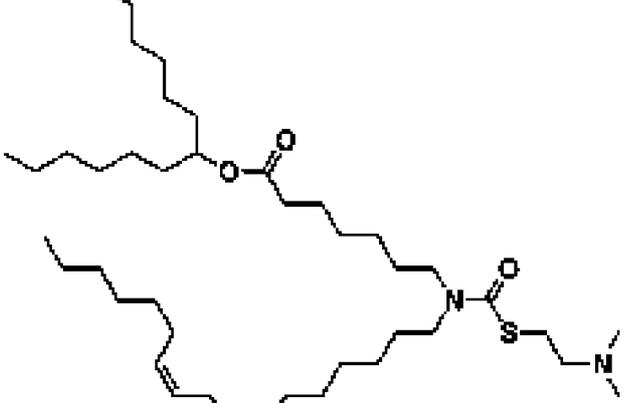
	0081
	0123
	0122
	0057
	0088

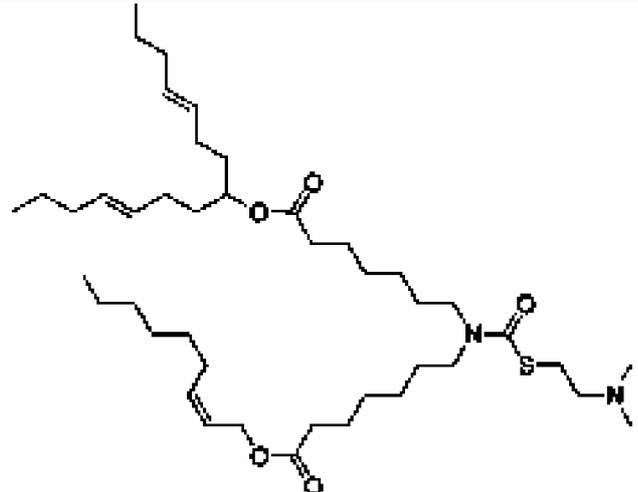
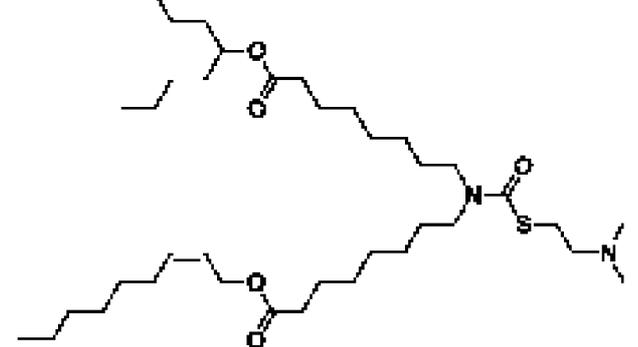
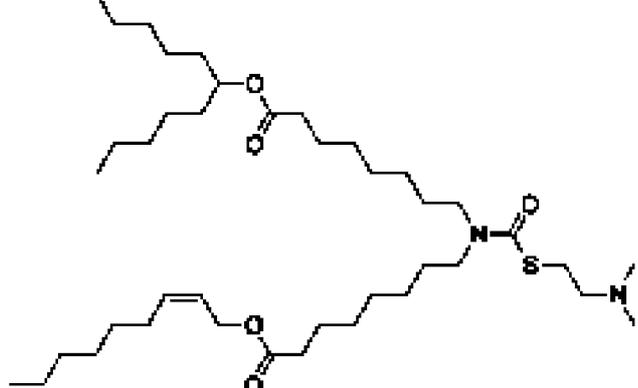
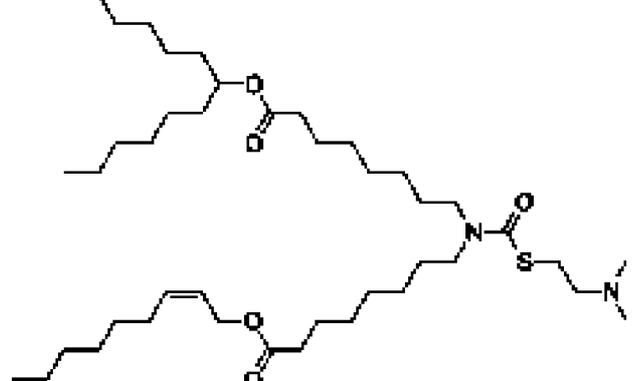
	0087
	0124
	0128
	0127

	0126
	0129
	0082

	0085
	0083
	0121
	0091

	0102
	0098
	0092
	0084
	0095

	0125
	0094
	0109
	0110

	0118
	0108
	0107
	0093

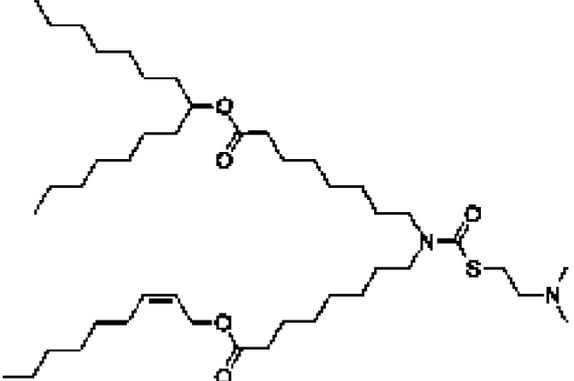
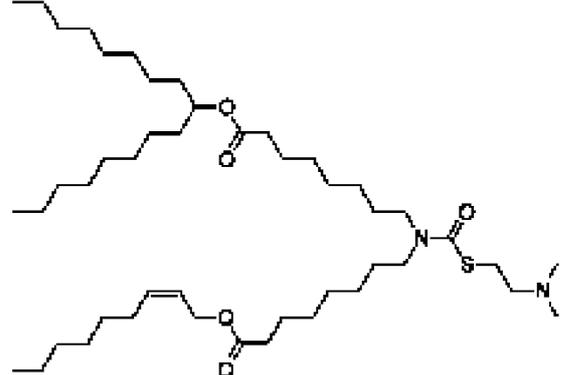
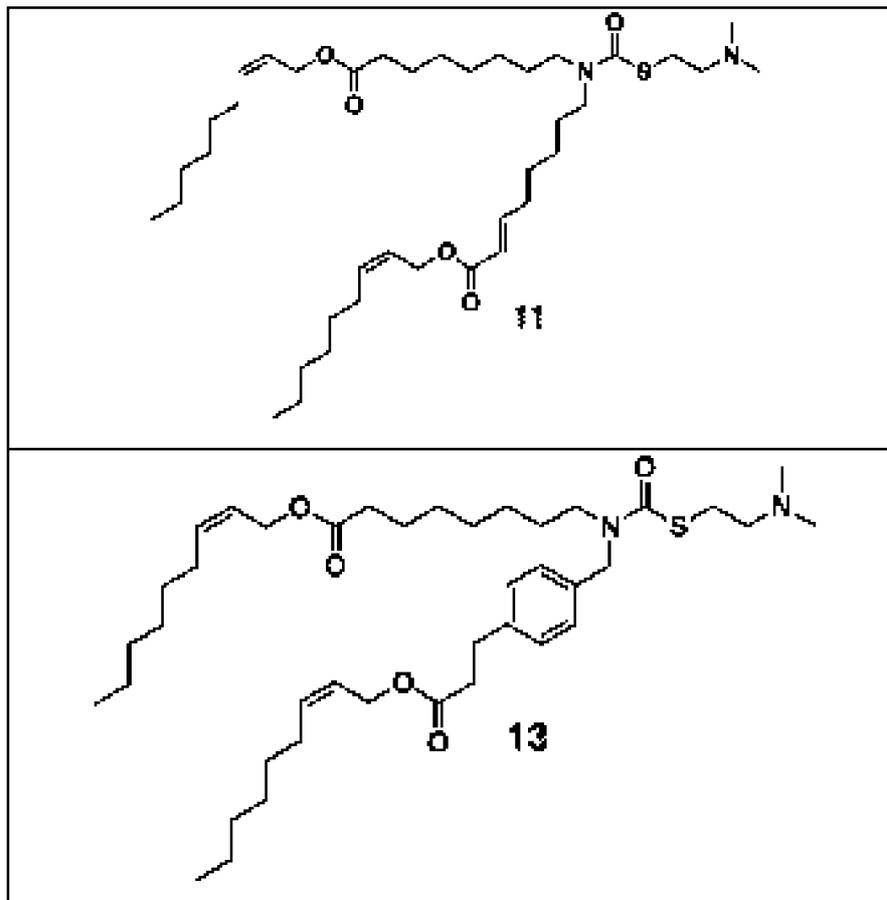
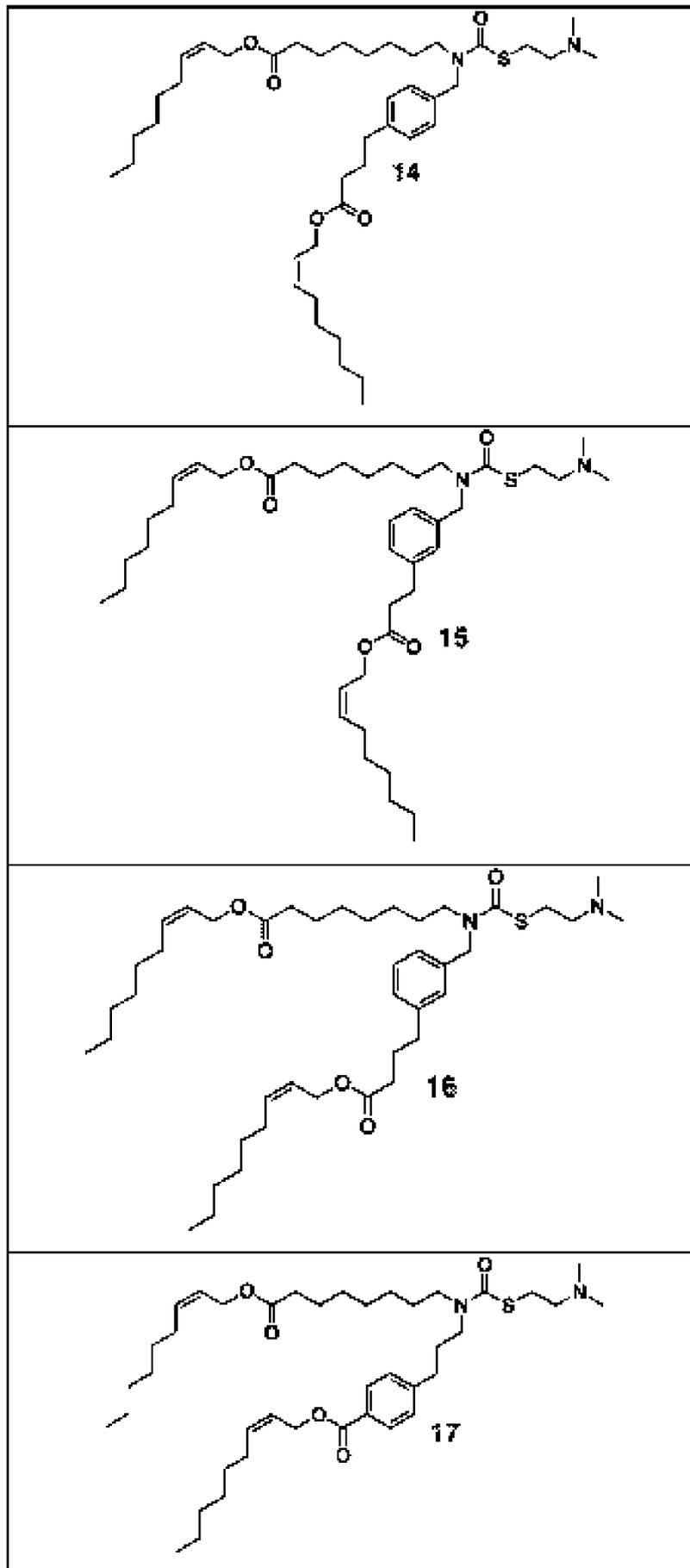
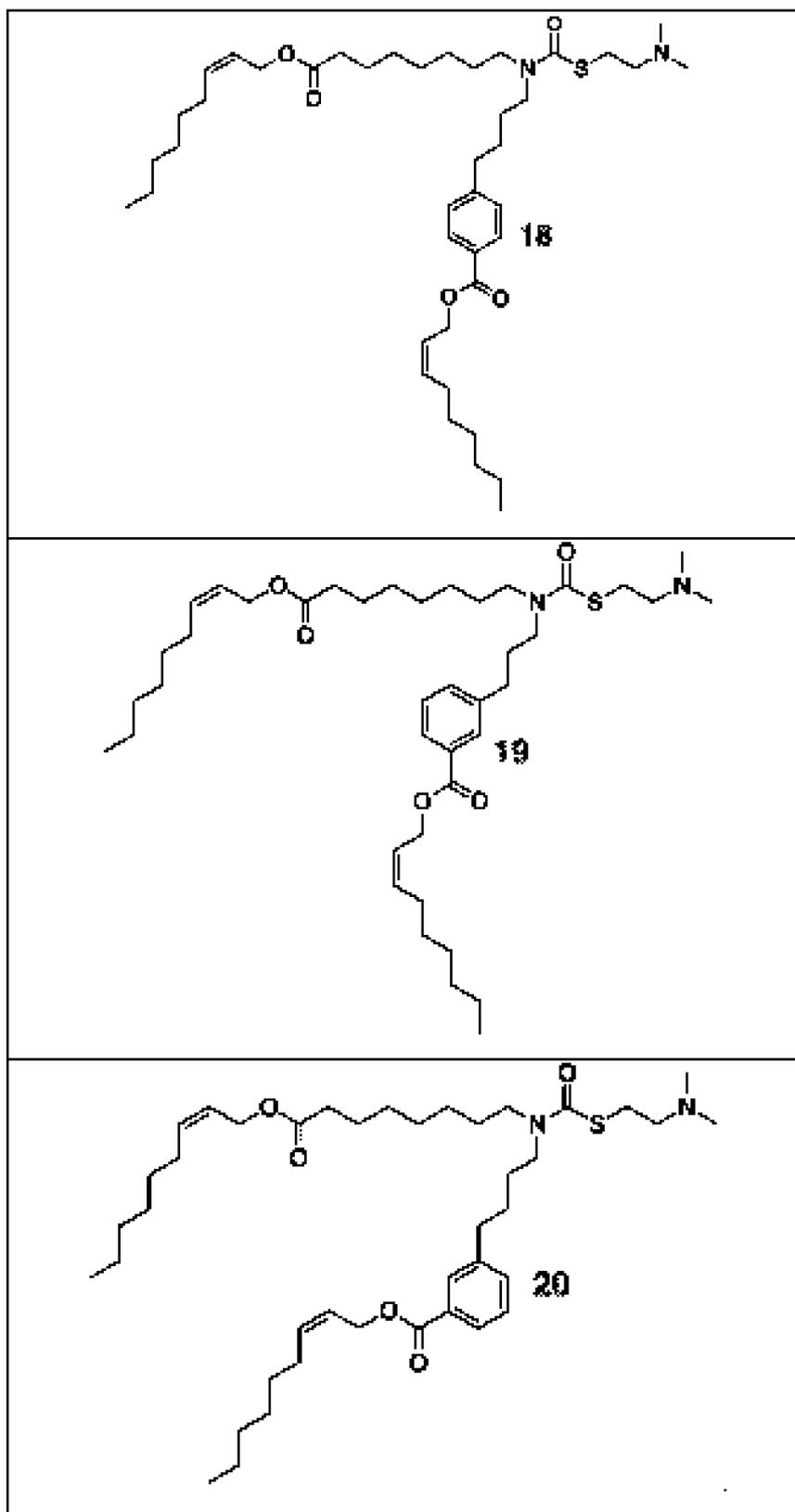
	0097
	0096

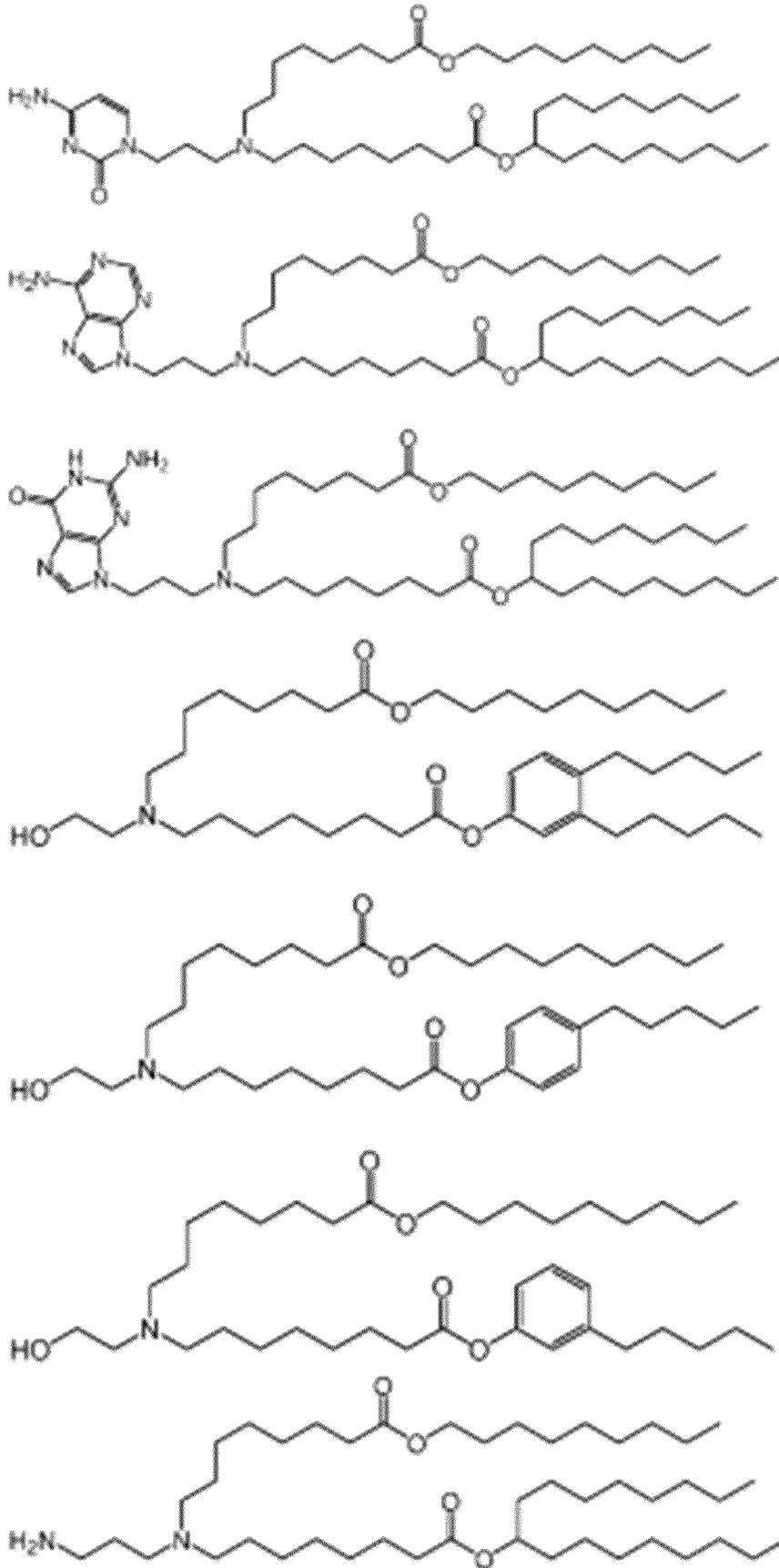
Таблица 15

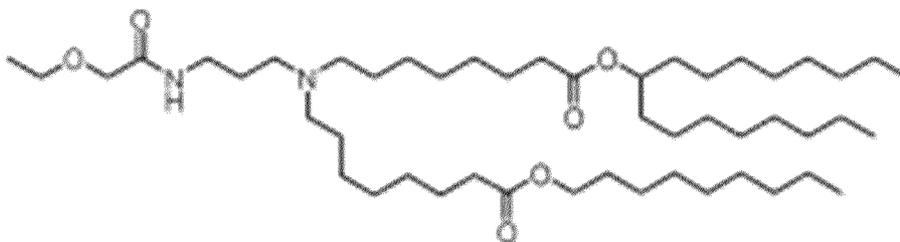
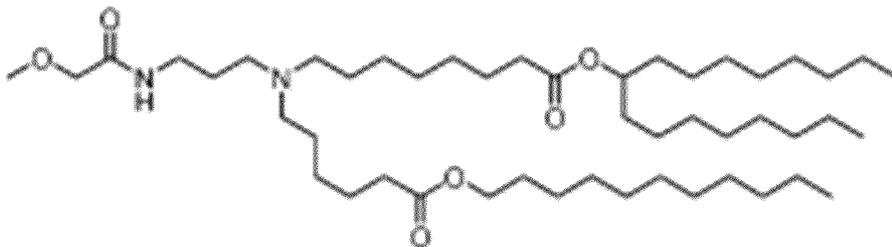
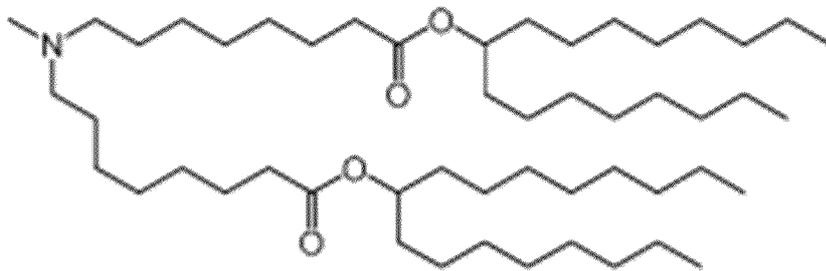
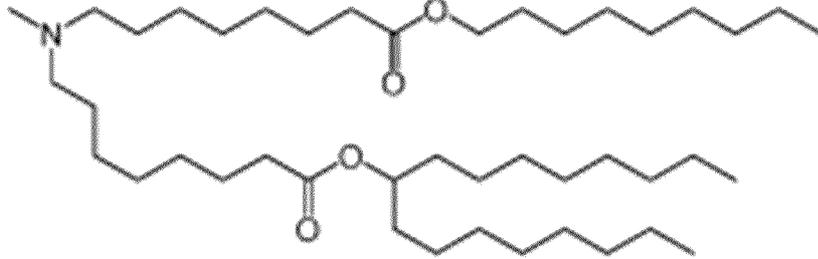
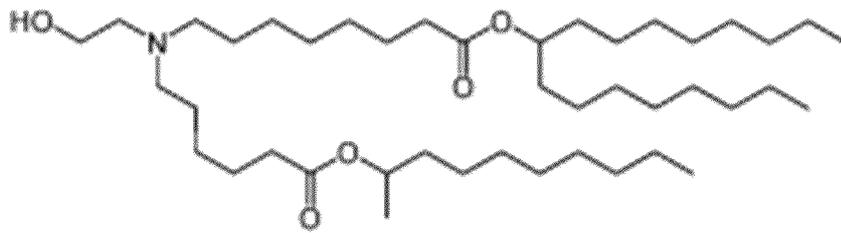


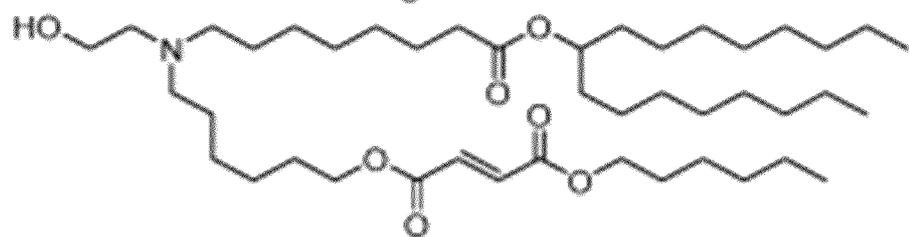
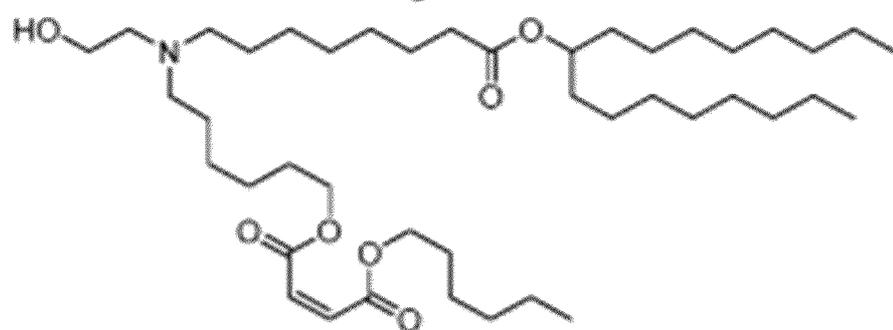
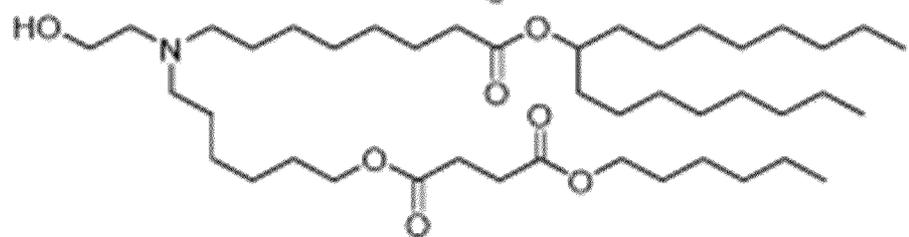
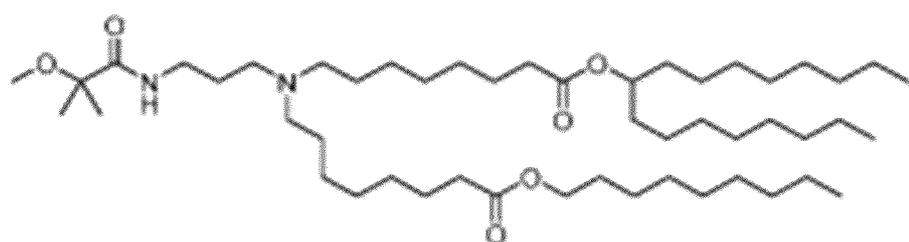
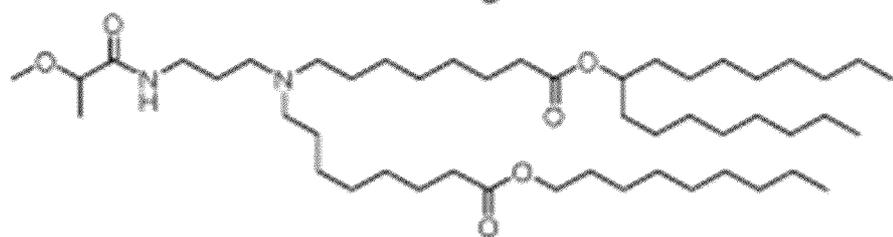
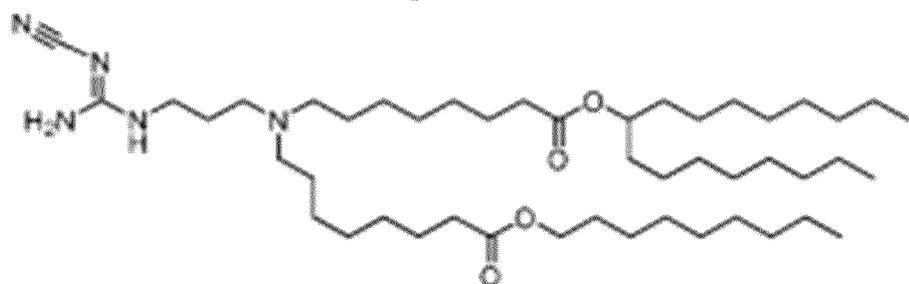
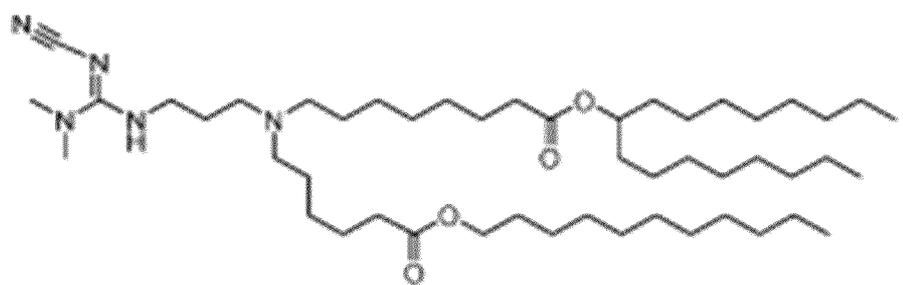


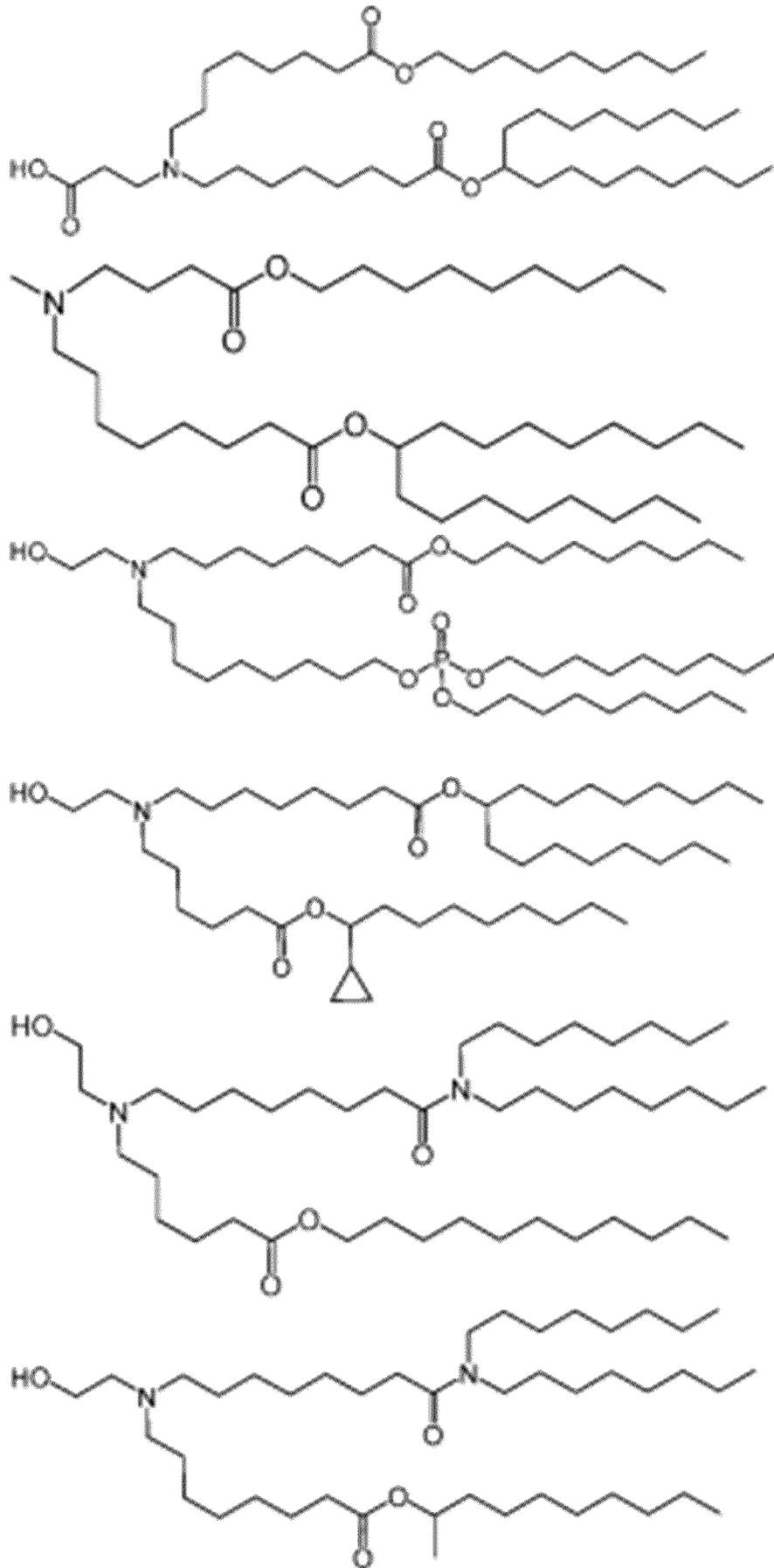


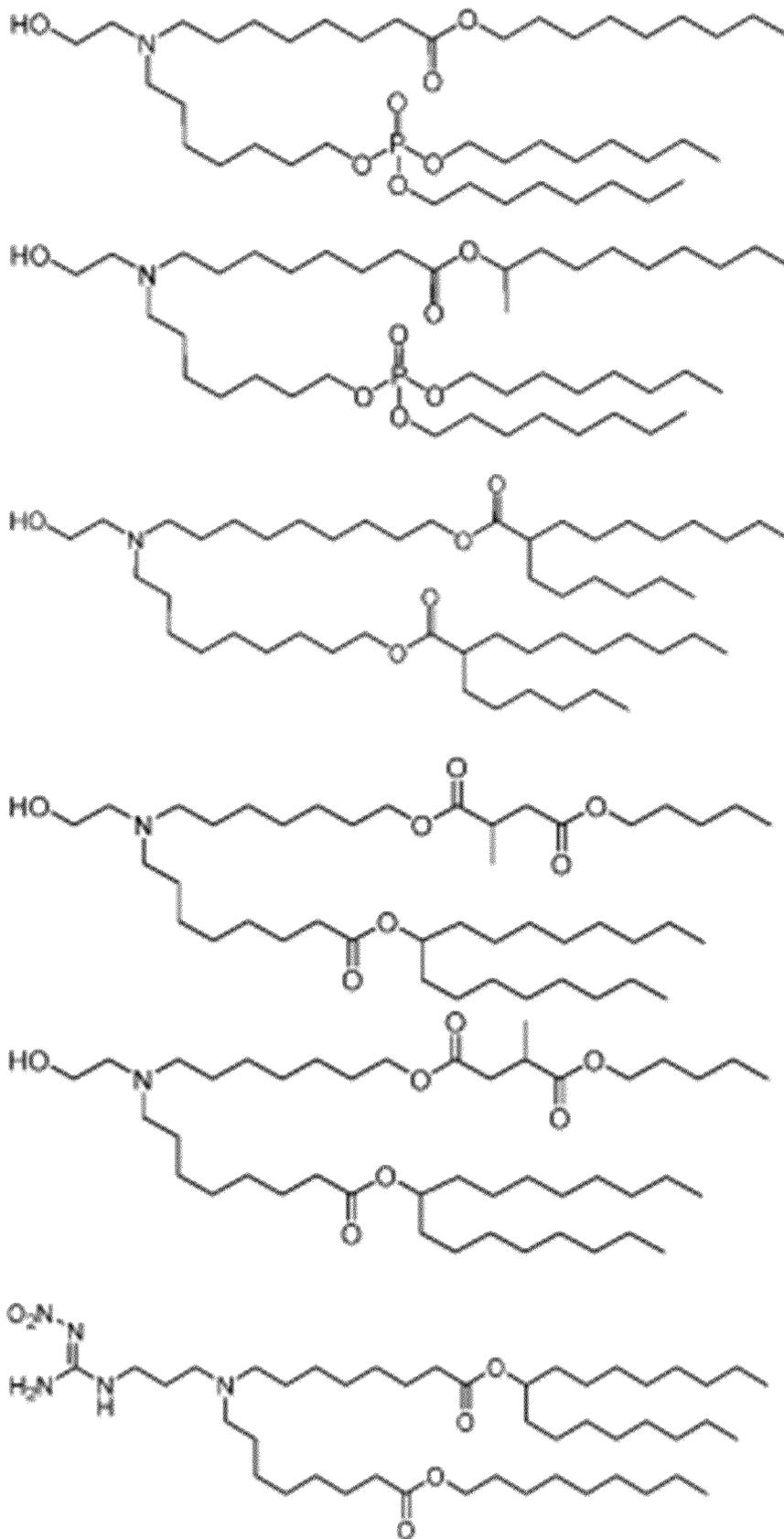
[0493] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид описан в международной заявке на патент PCT/US2019/015913. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид выбирают из следующего:

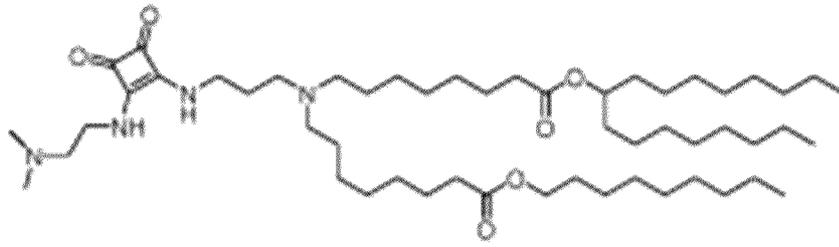
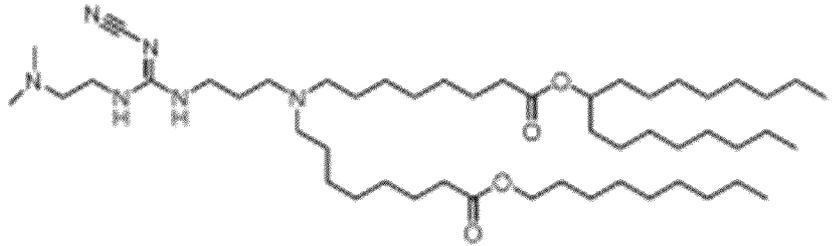
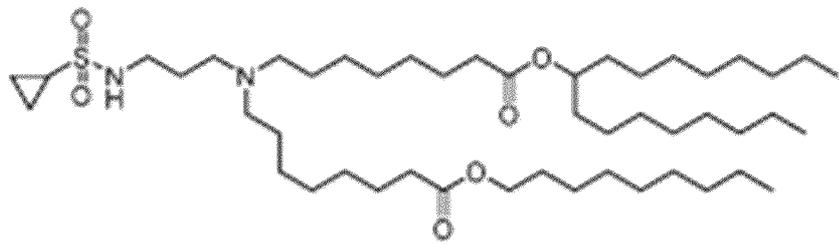
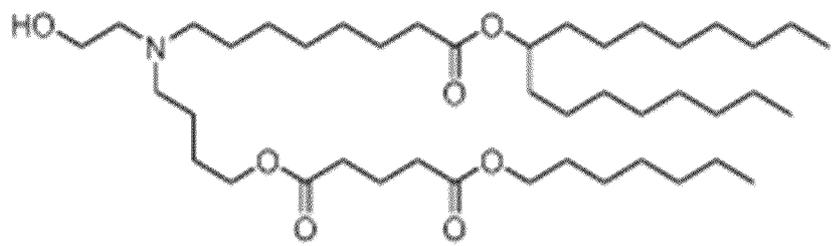
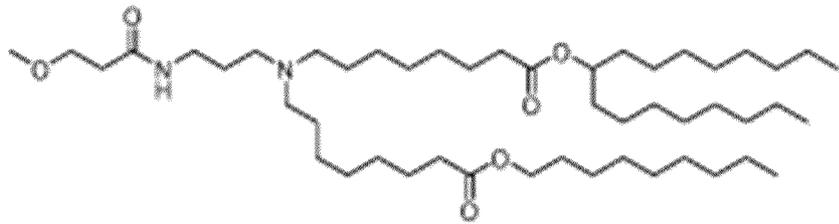
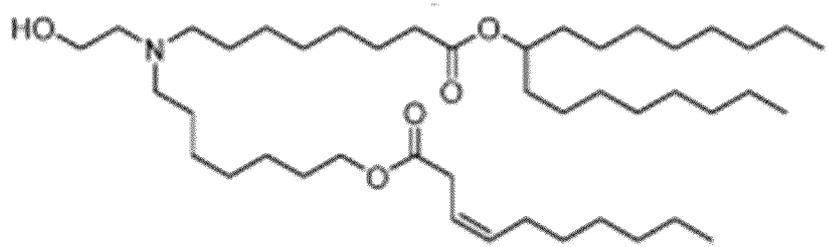


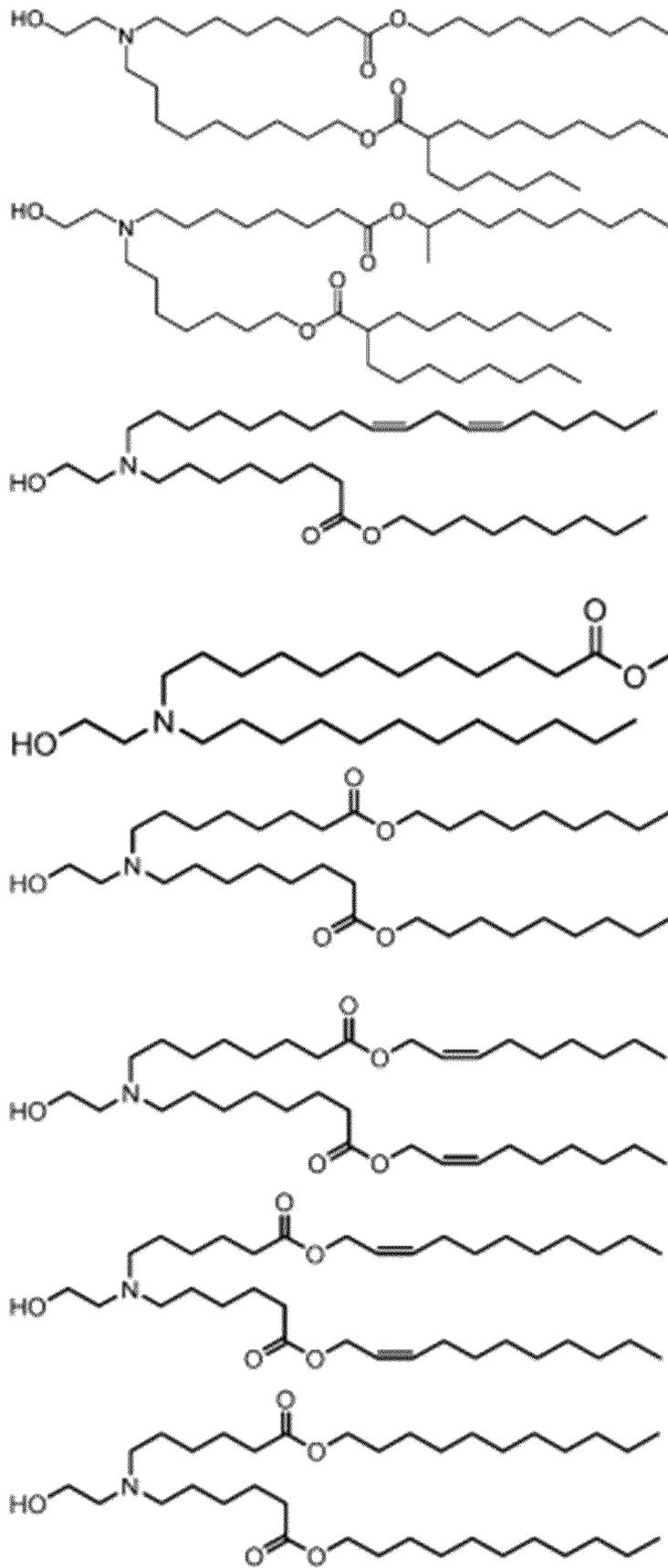


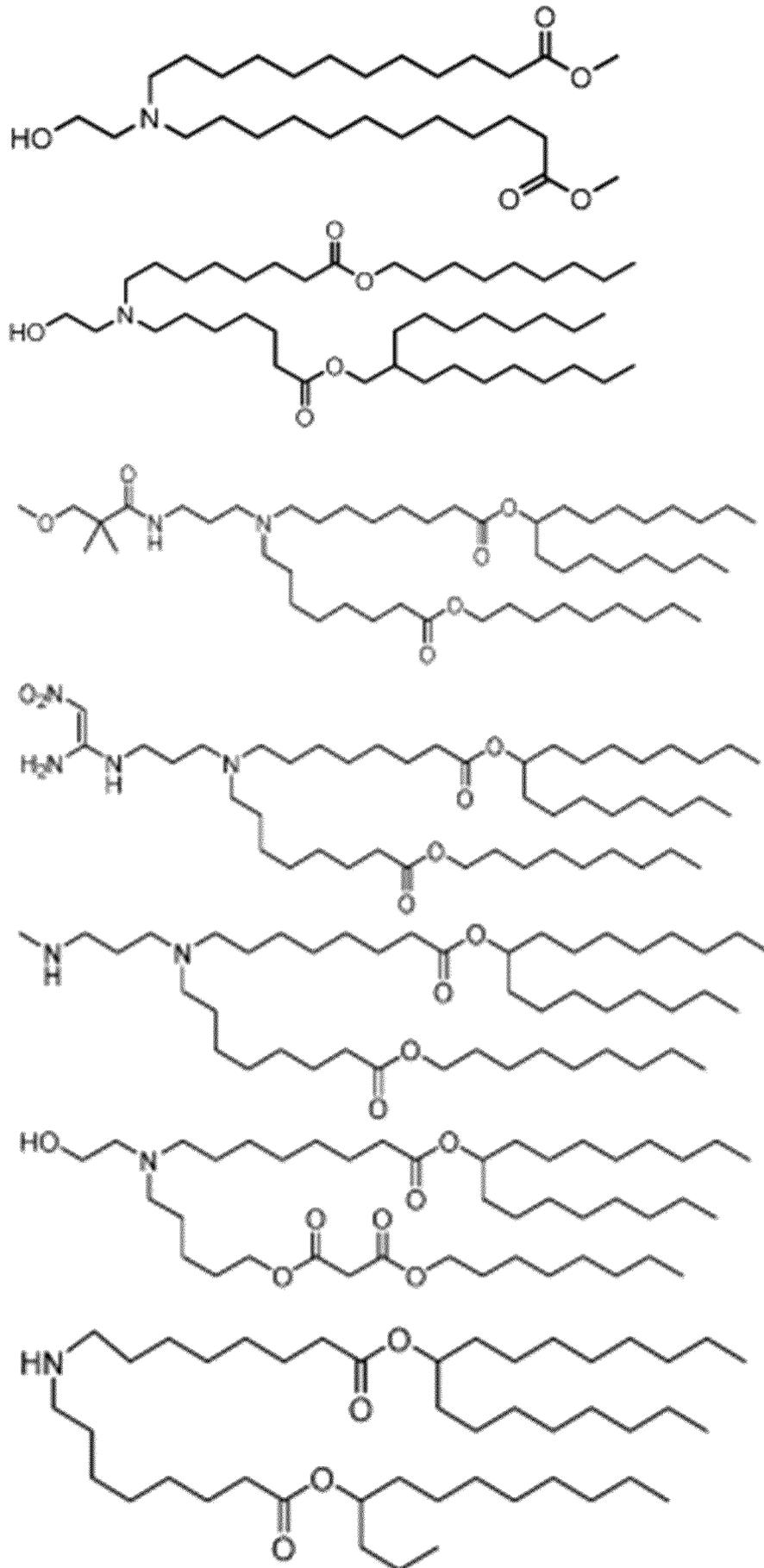


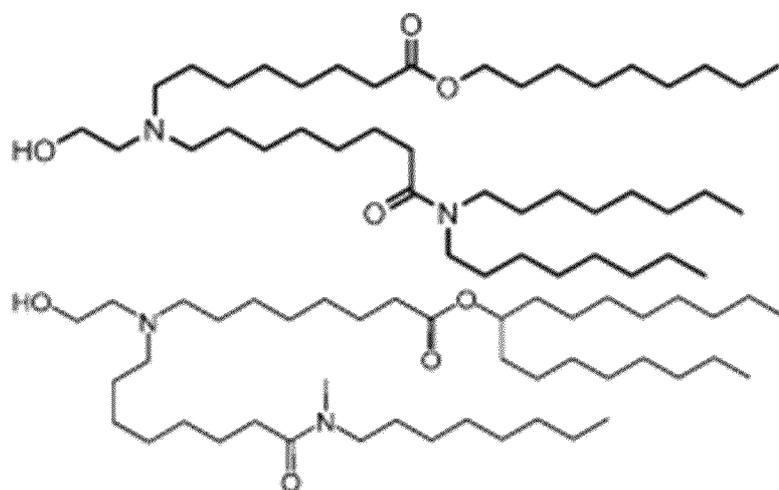
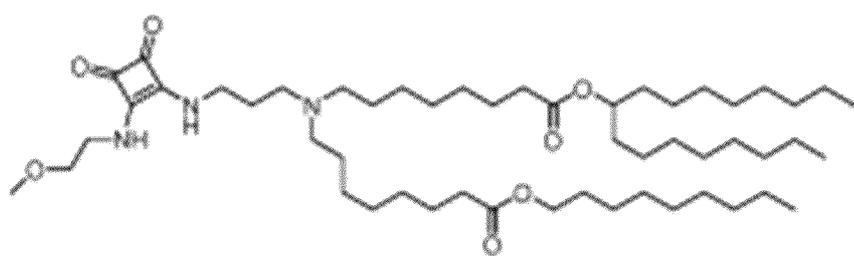
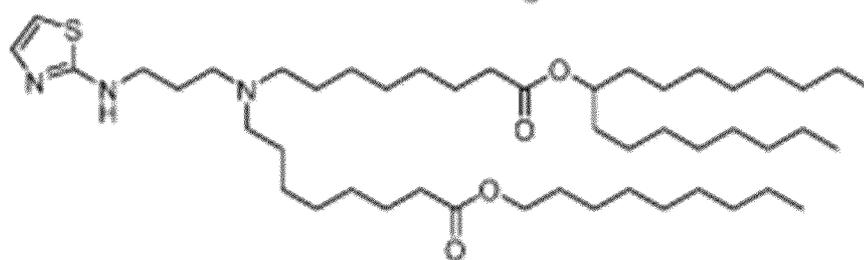
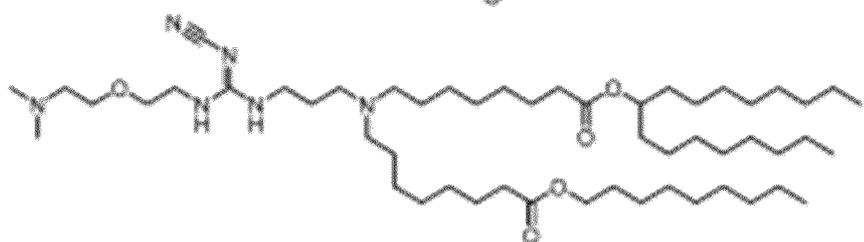
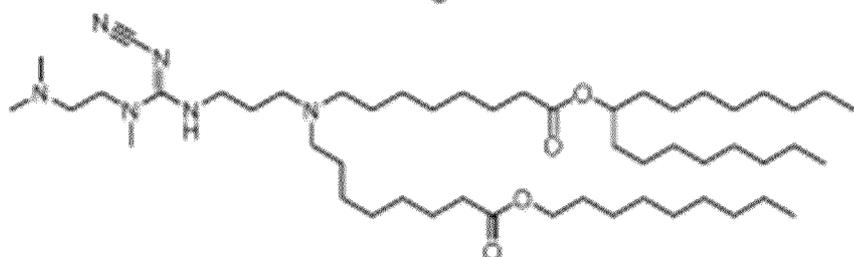
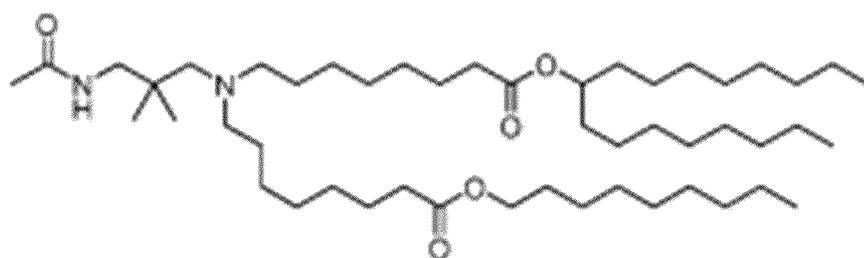


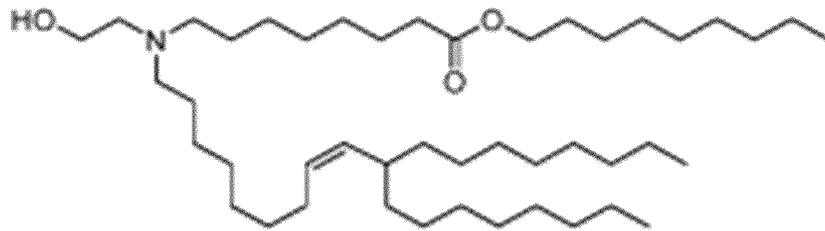
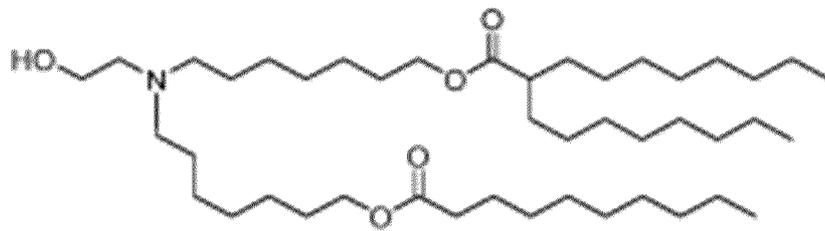
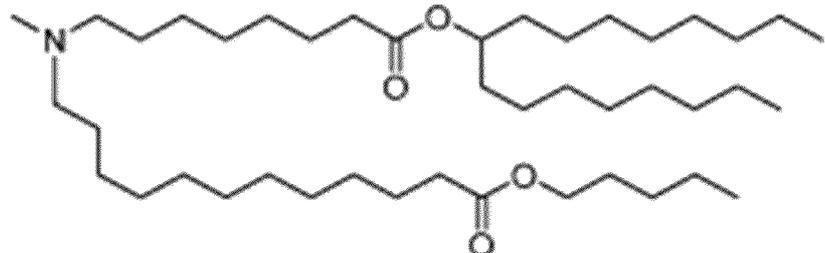
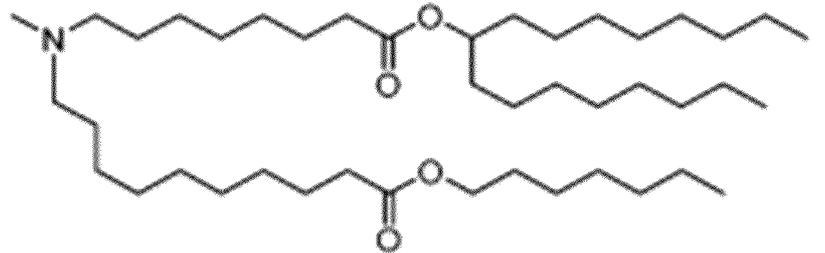
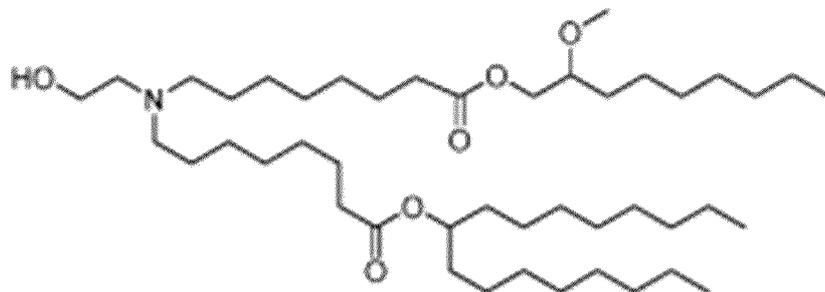
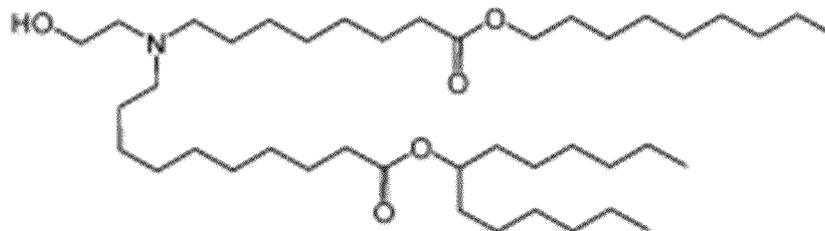
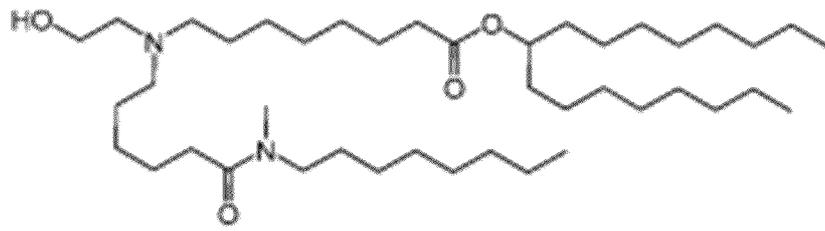


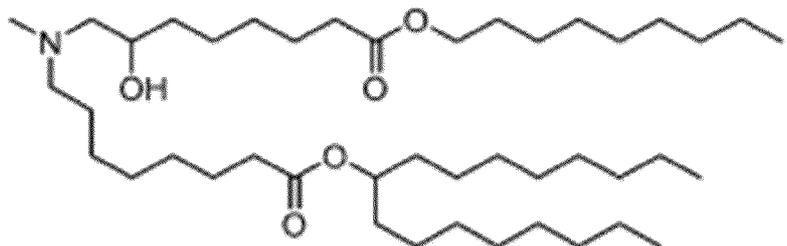
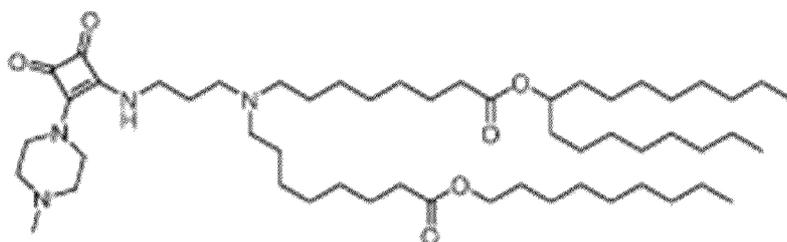
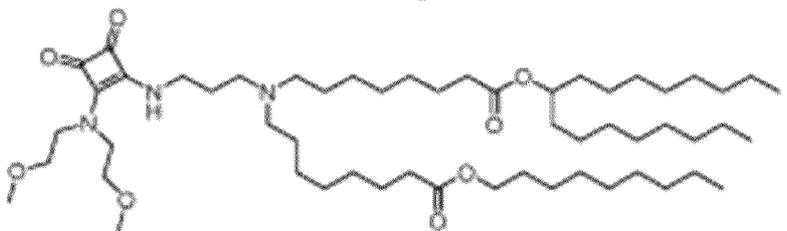
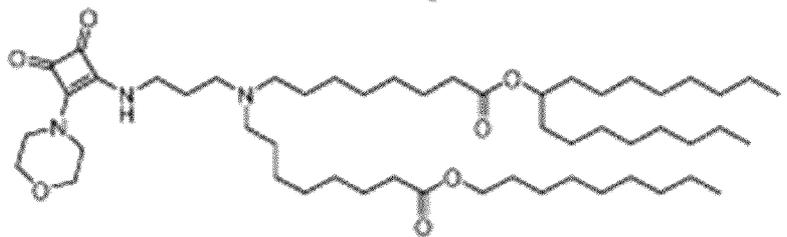
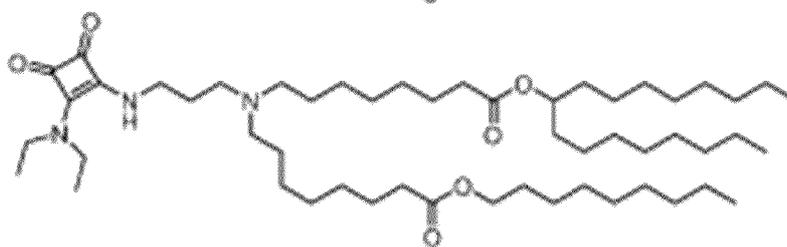
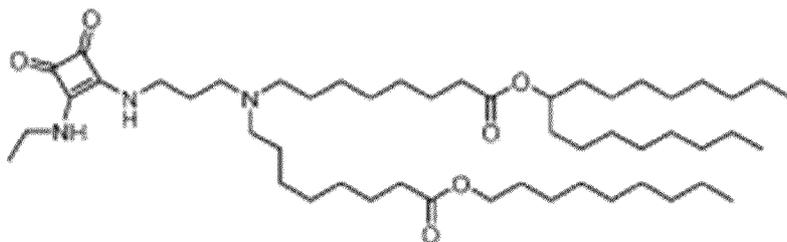
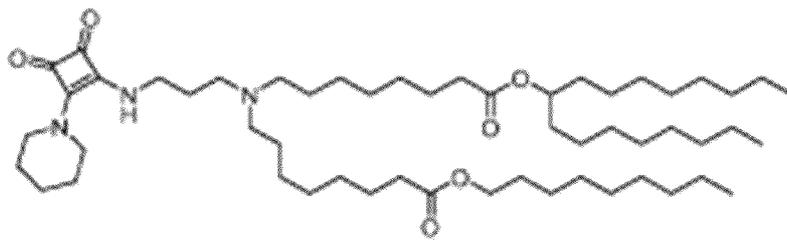


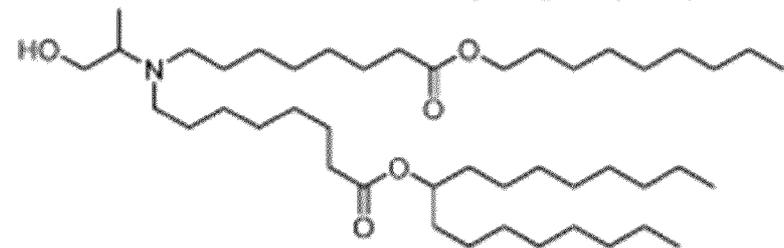
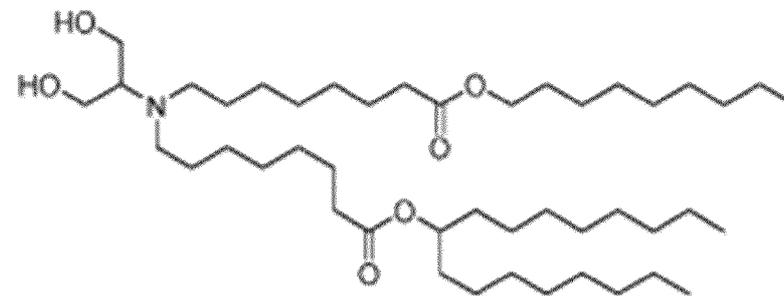
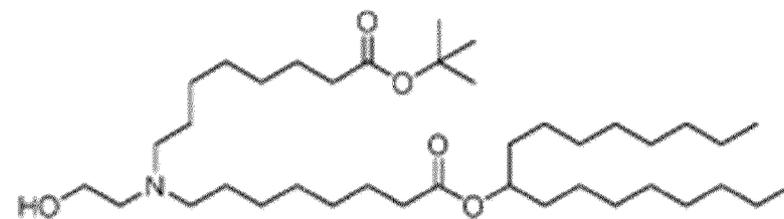
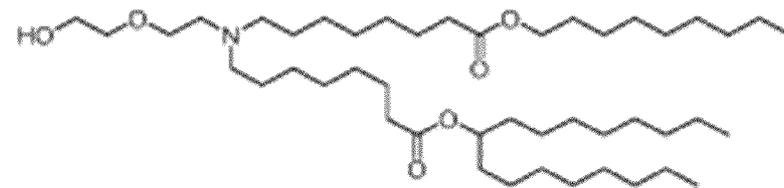
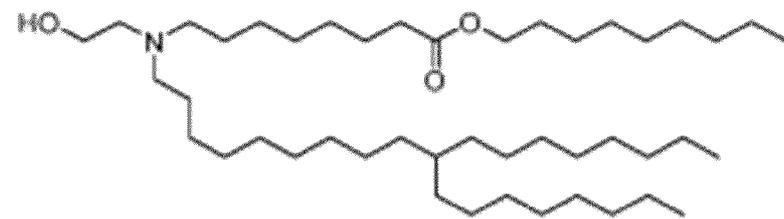
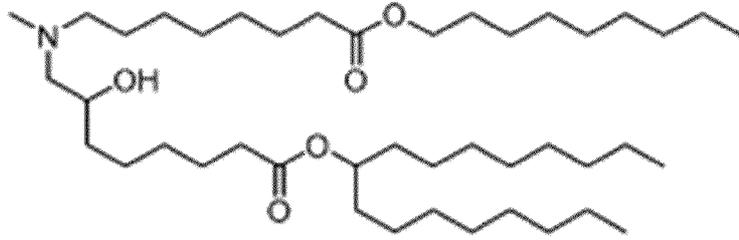
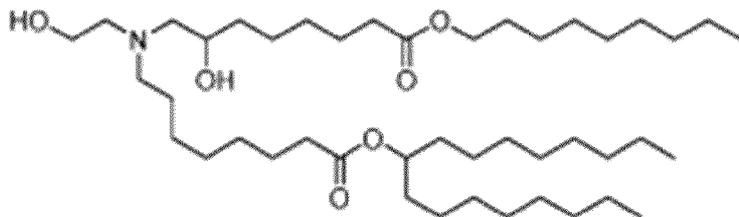


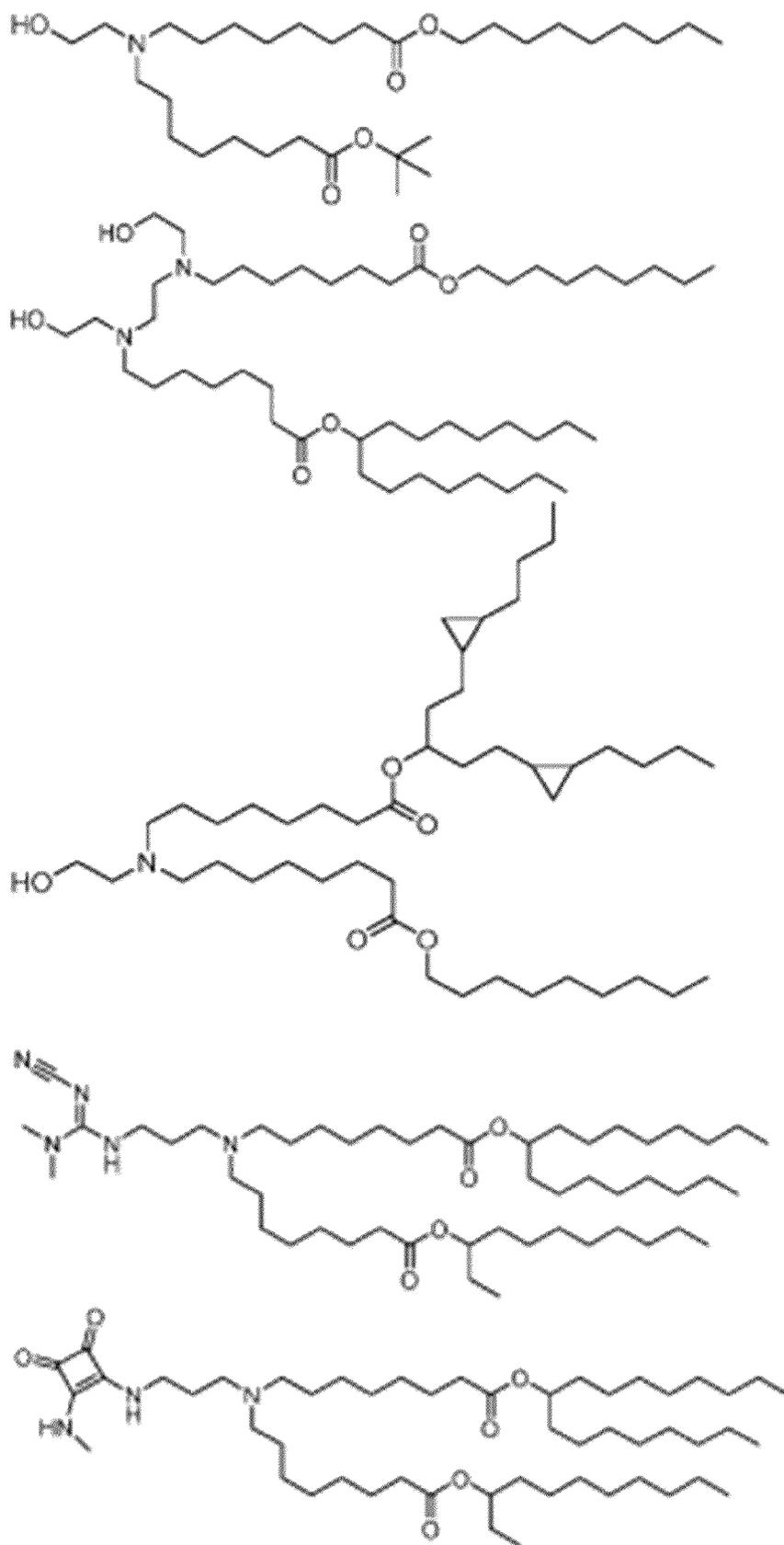


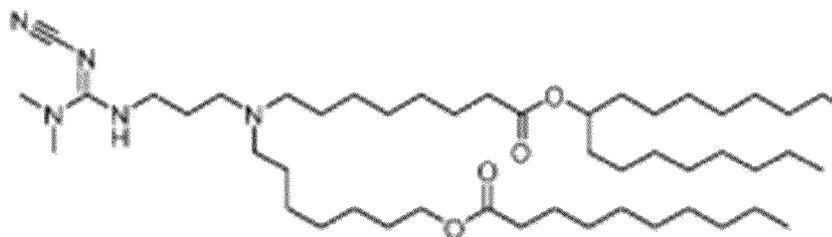
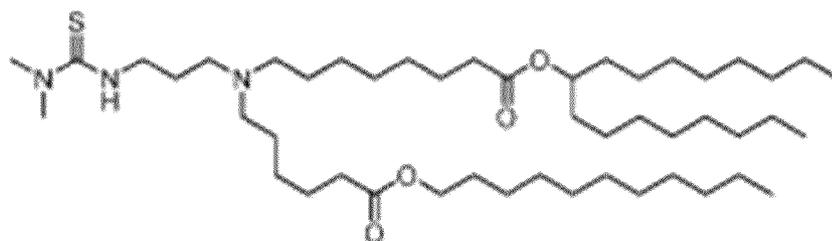
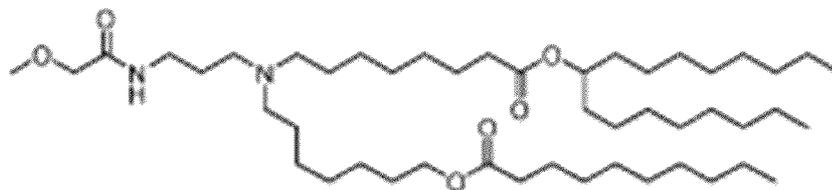
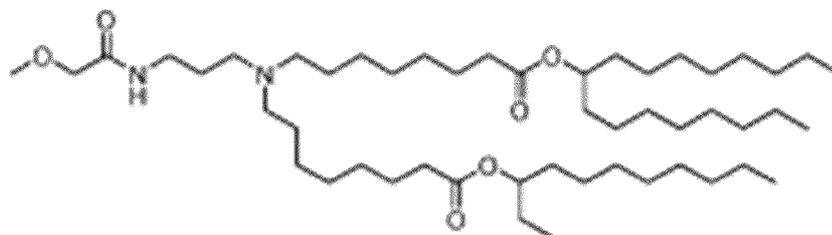
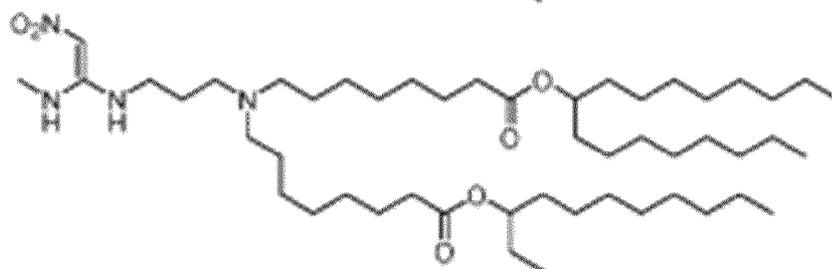
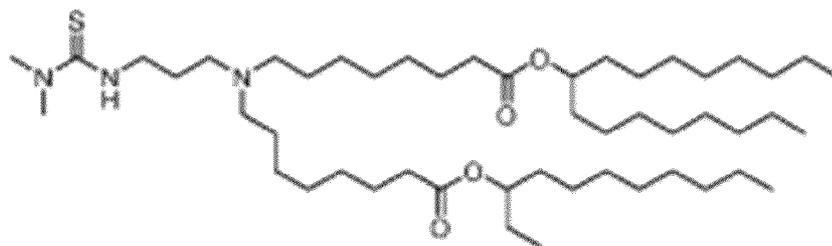


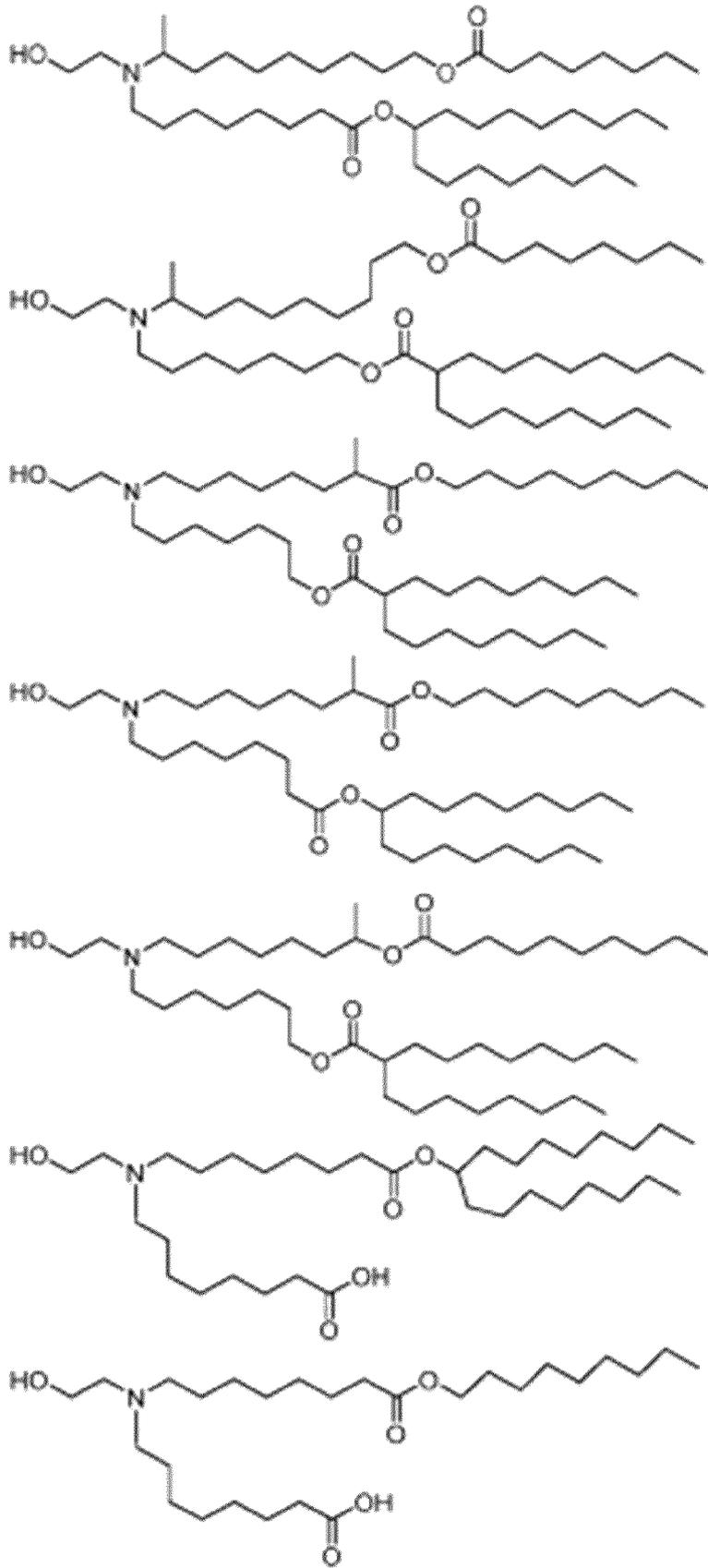


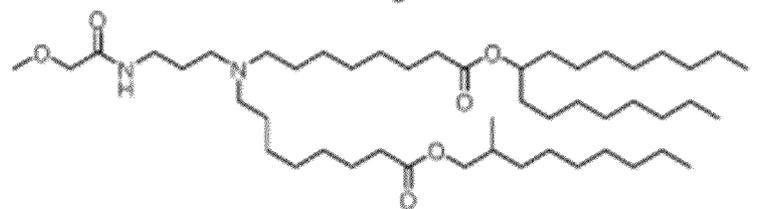
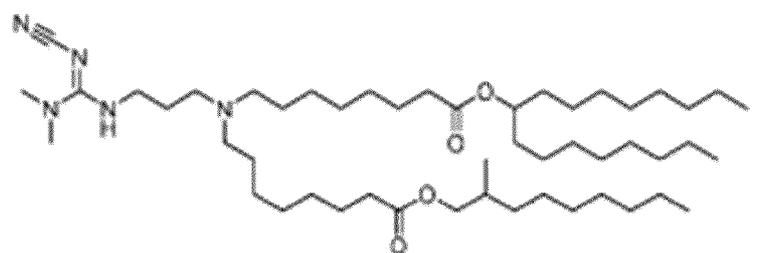
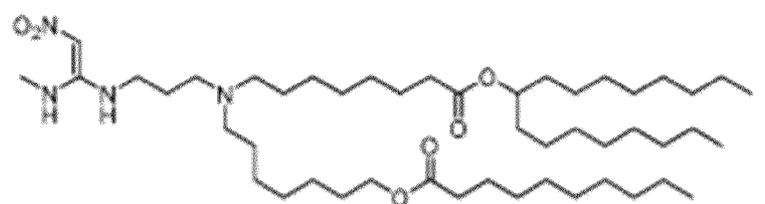
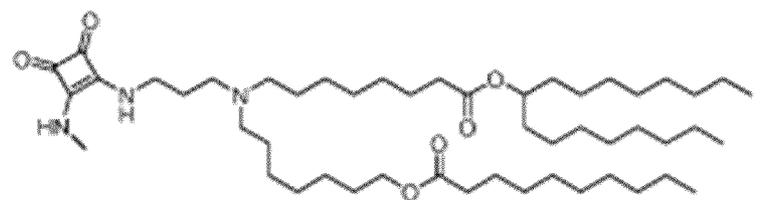
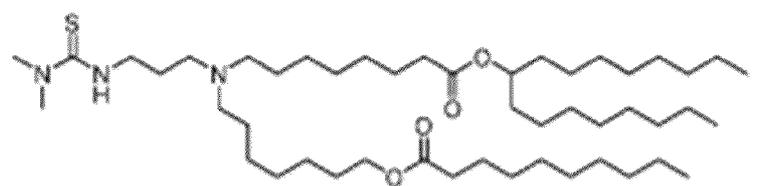
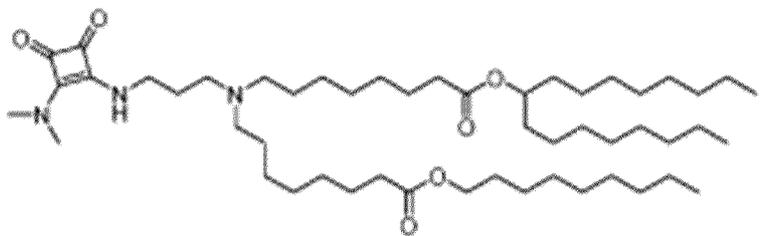
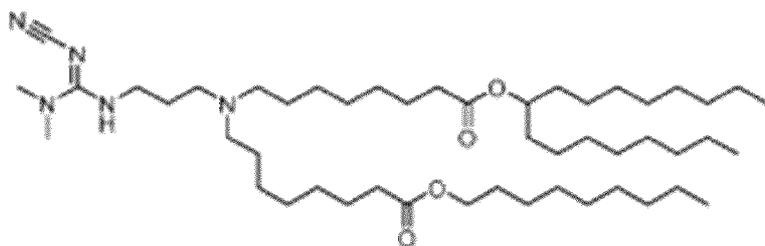


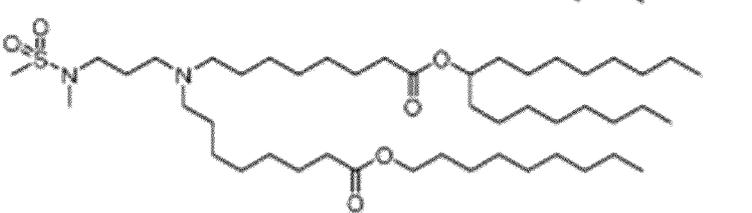
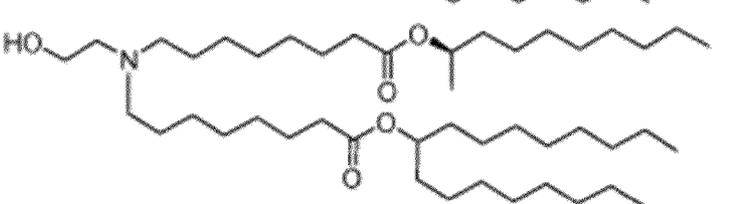
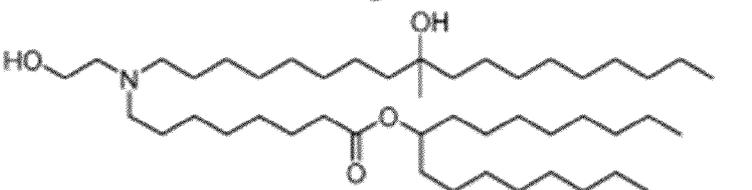
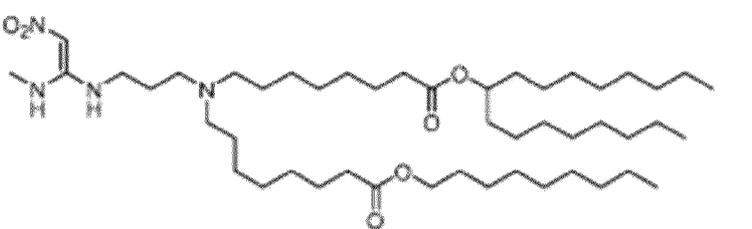
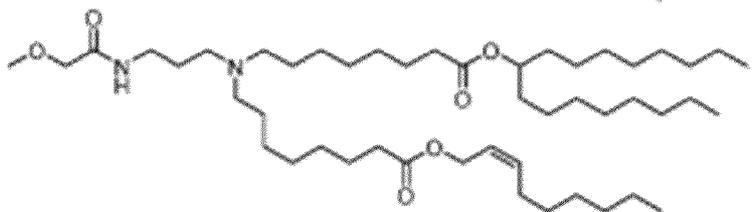
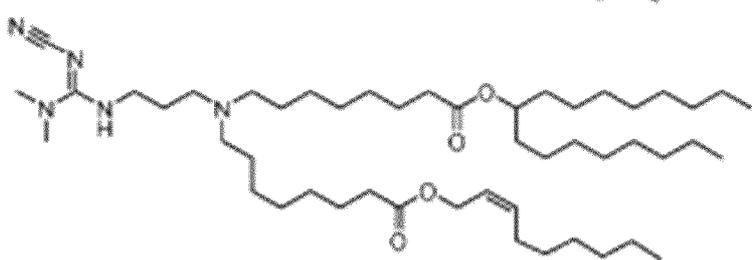
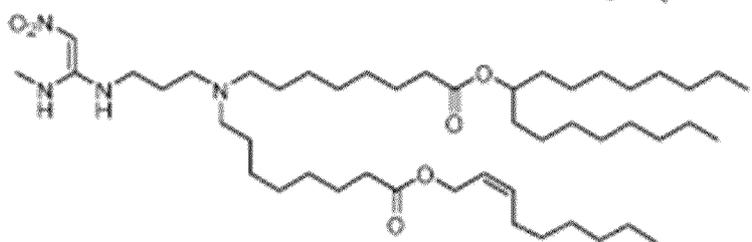
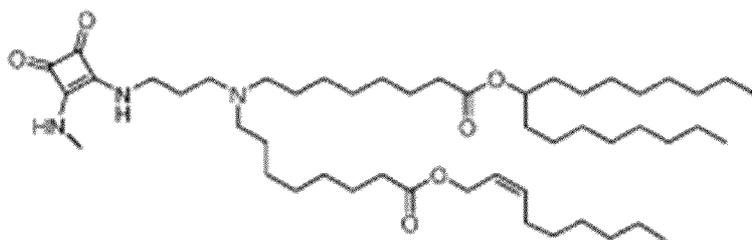


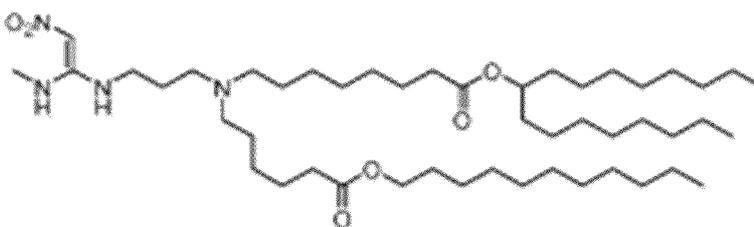
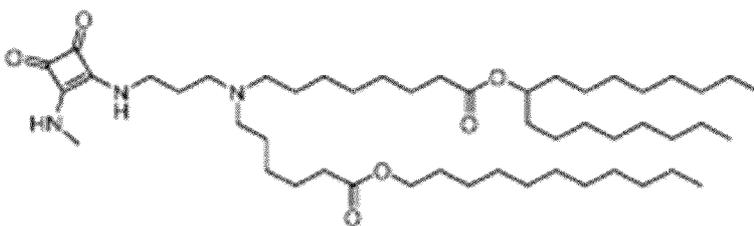
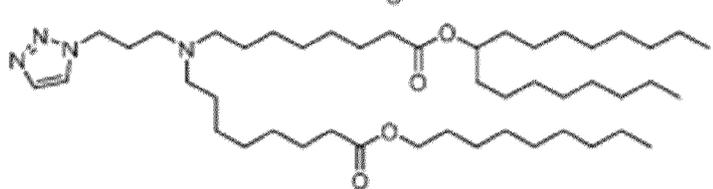
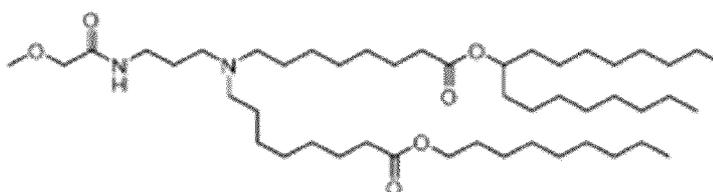
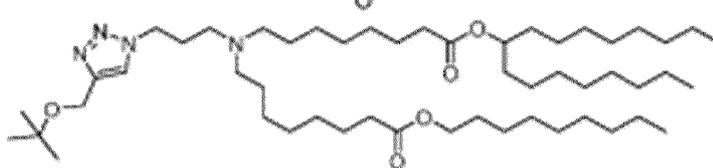
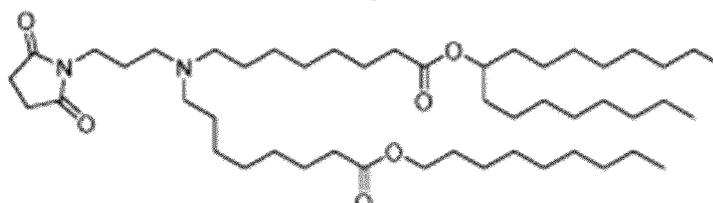
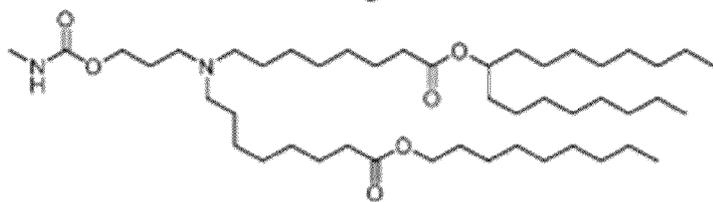
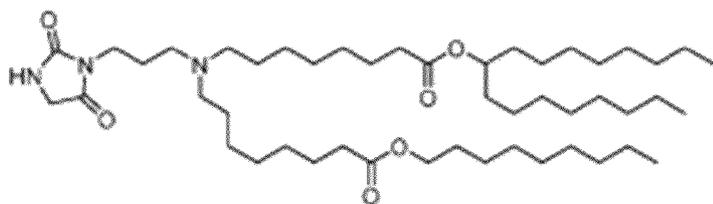


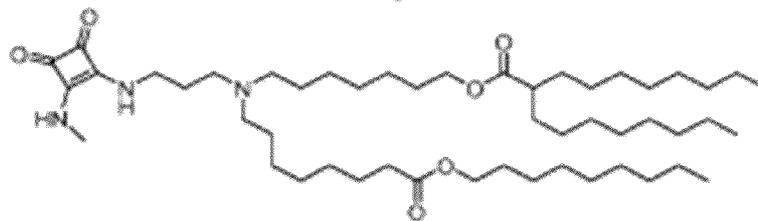
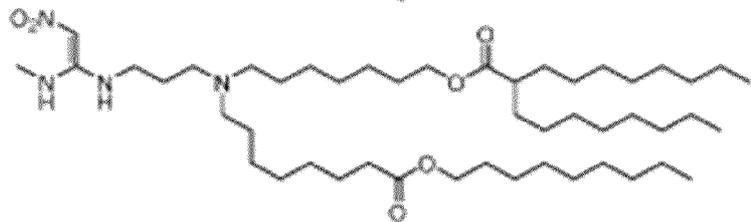
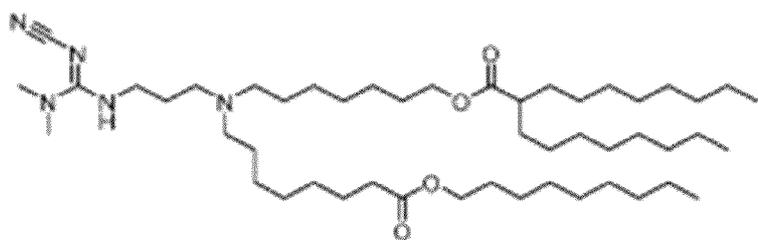
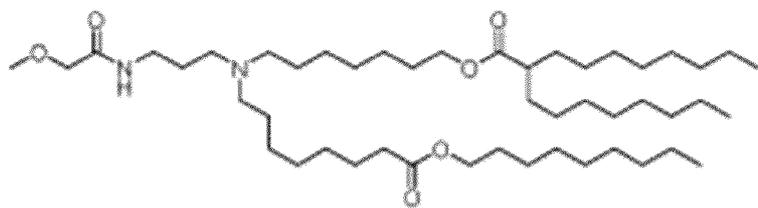
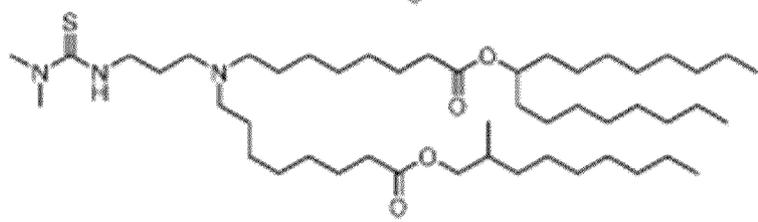
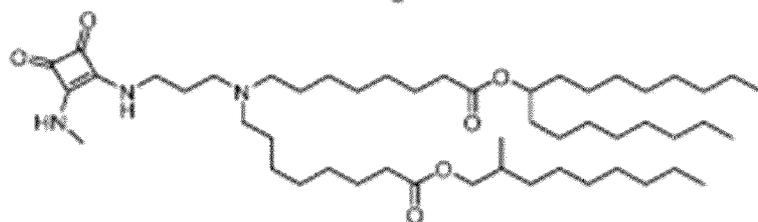
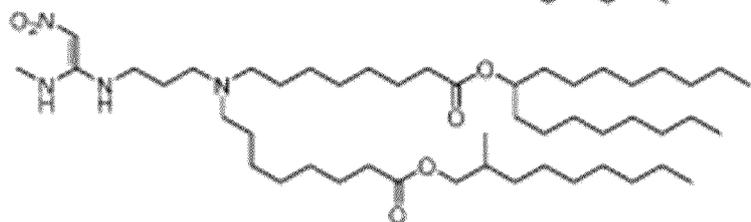
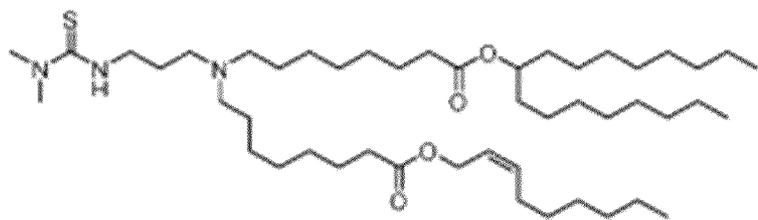


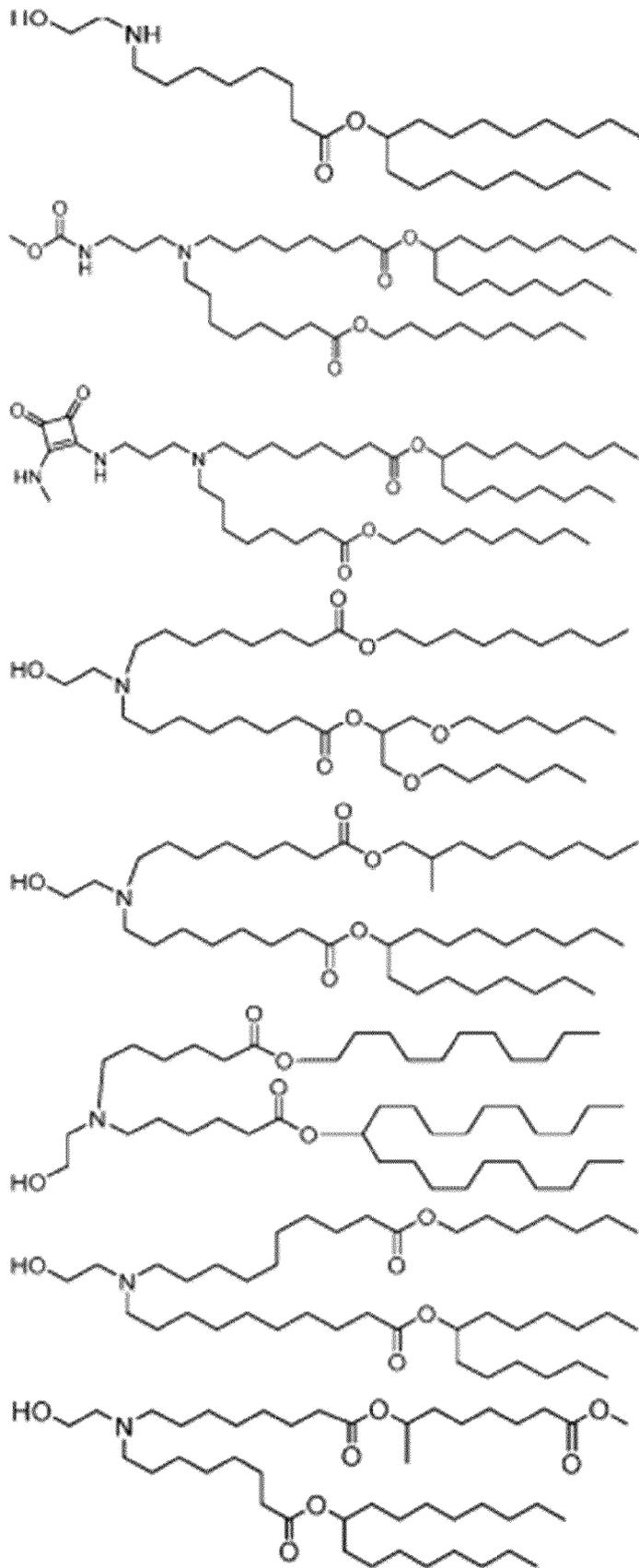


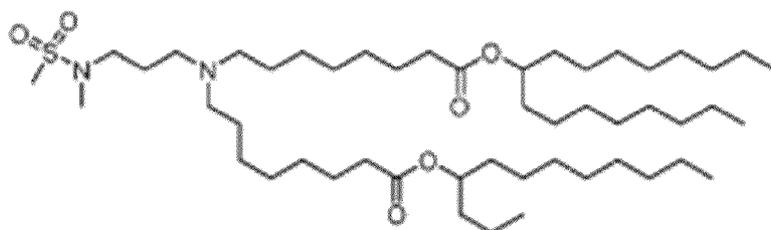
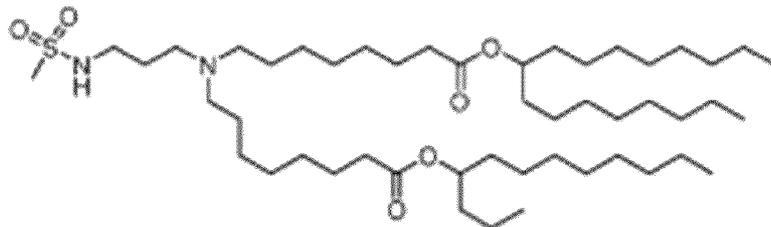
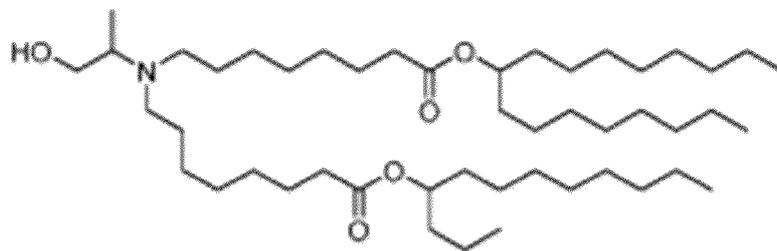
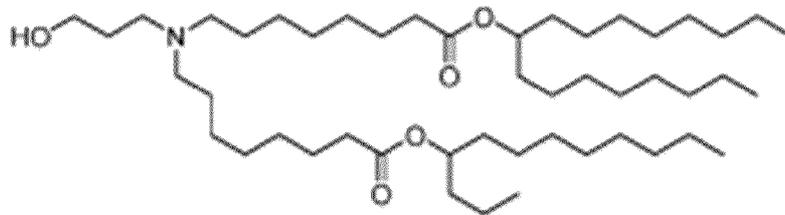
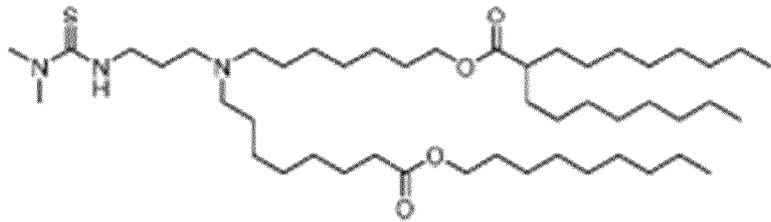
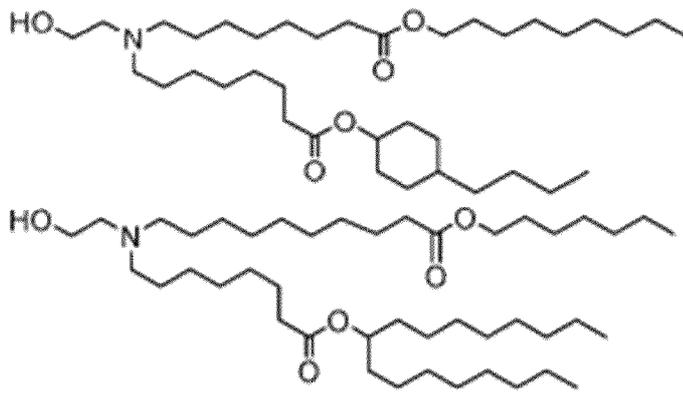


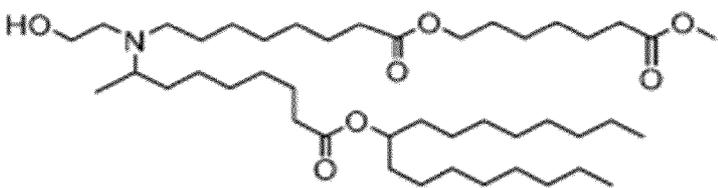
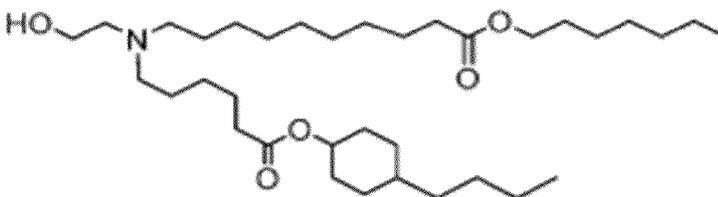
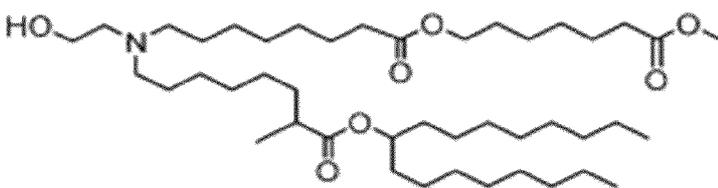
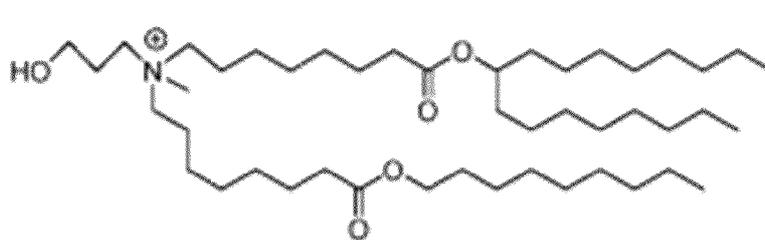
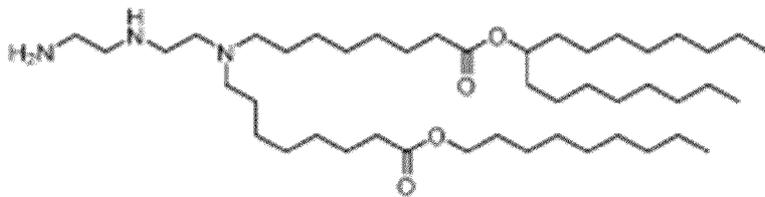
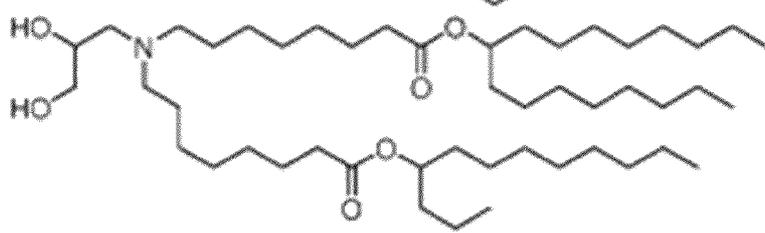
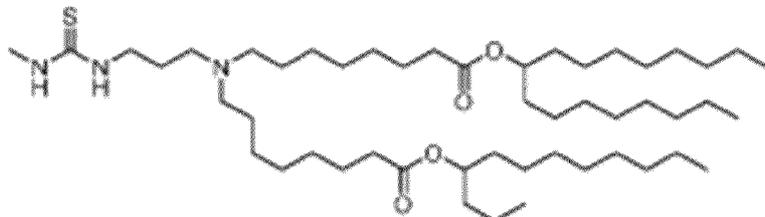
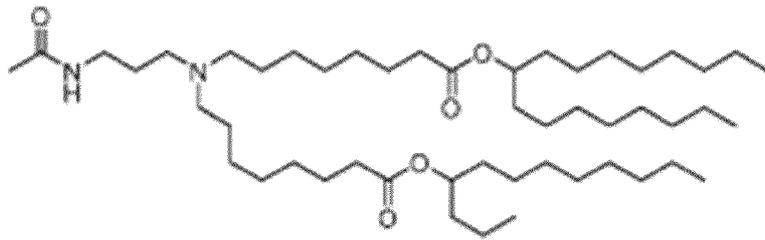


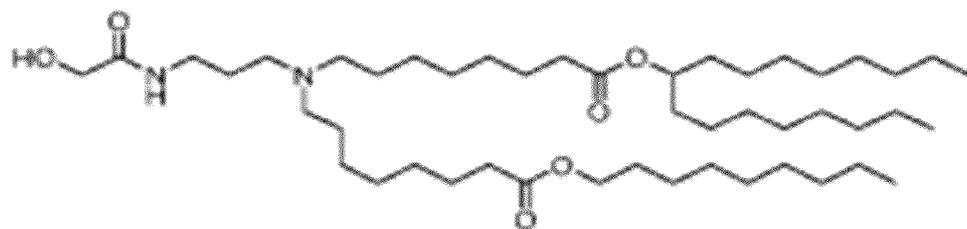
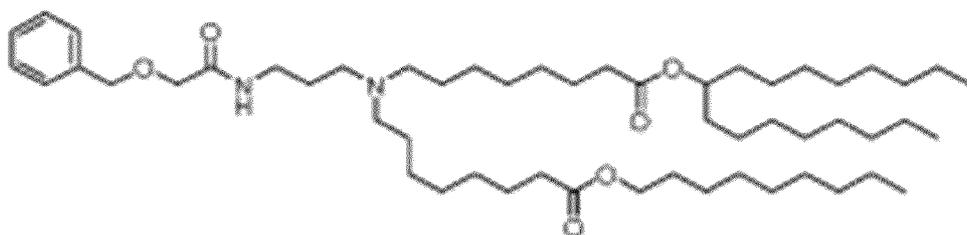
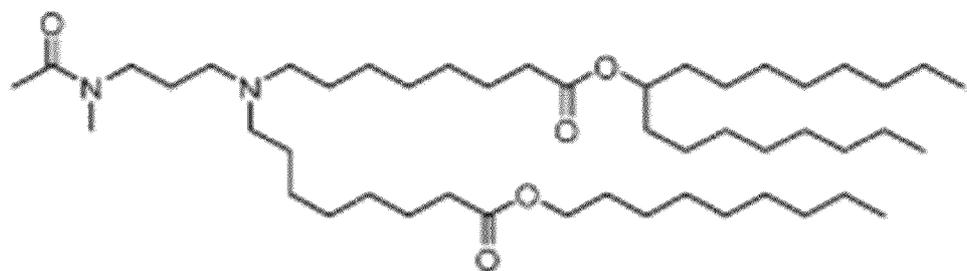
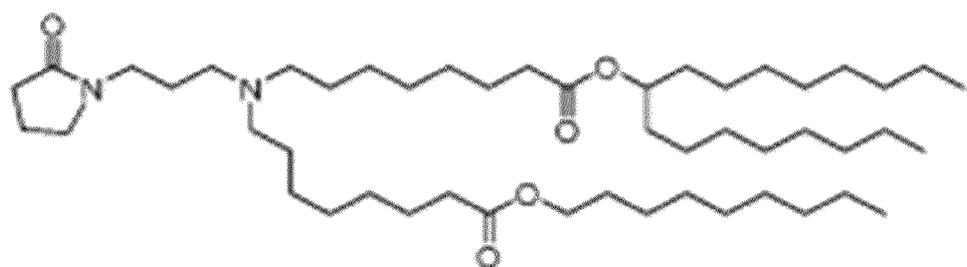
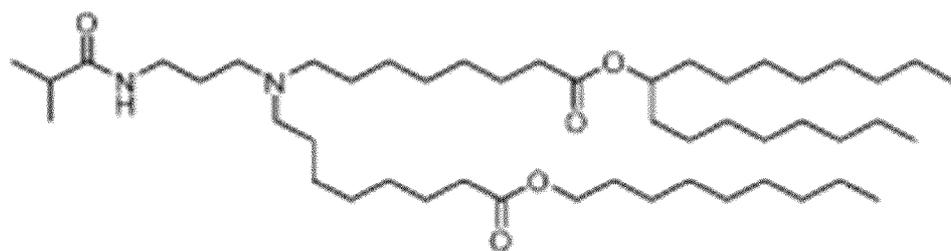
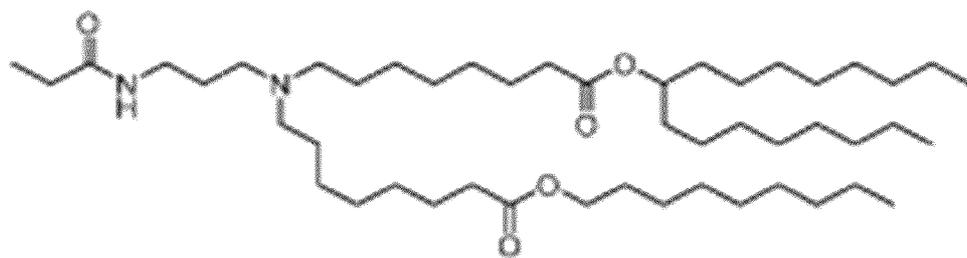


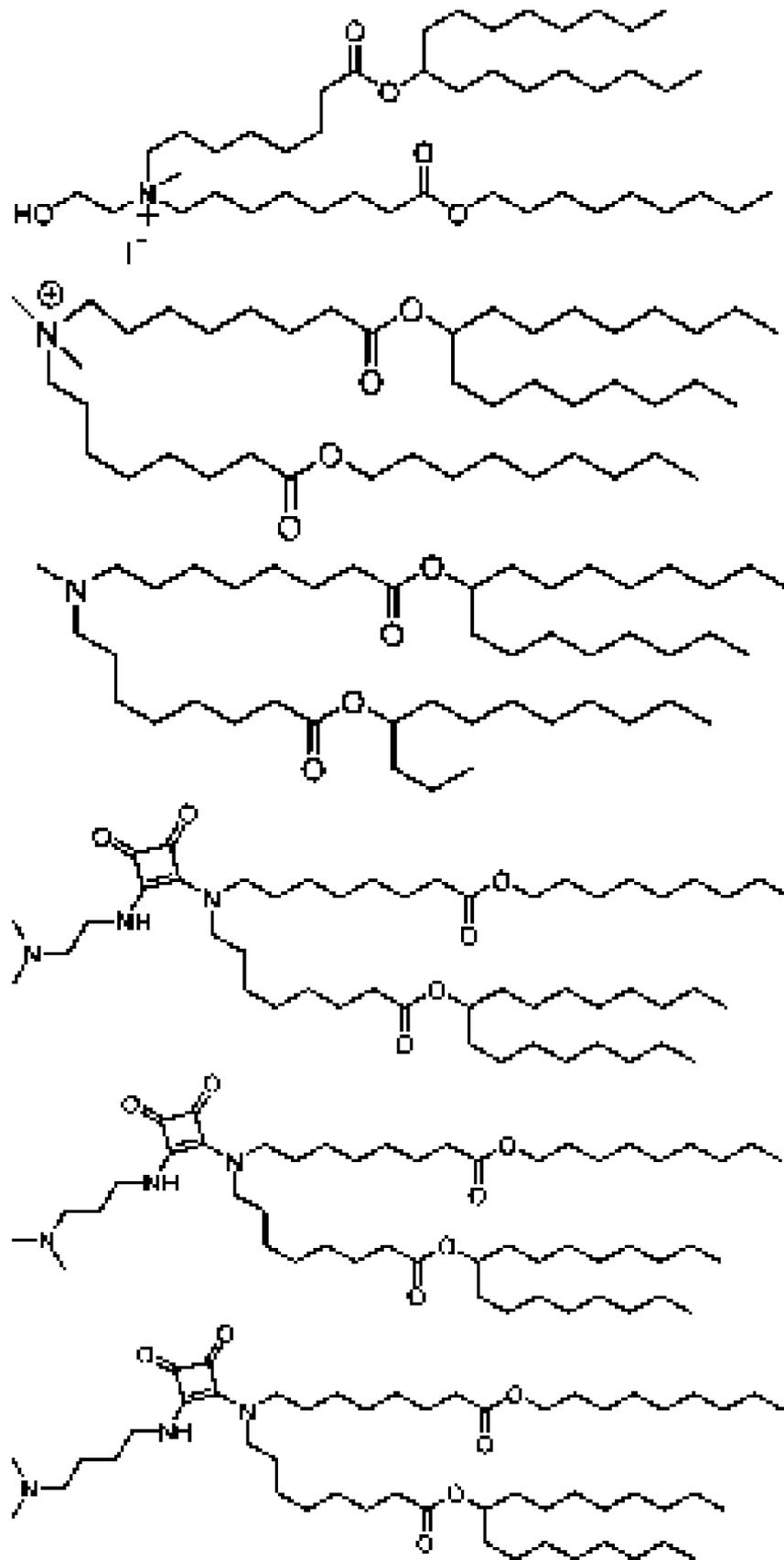


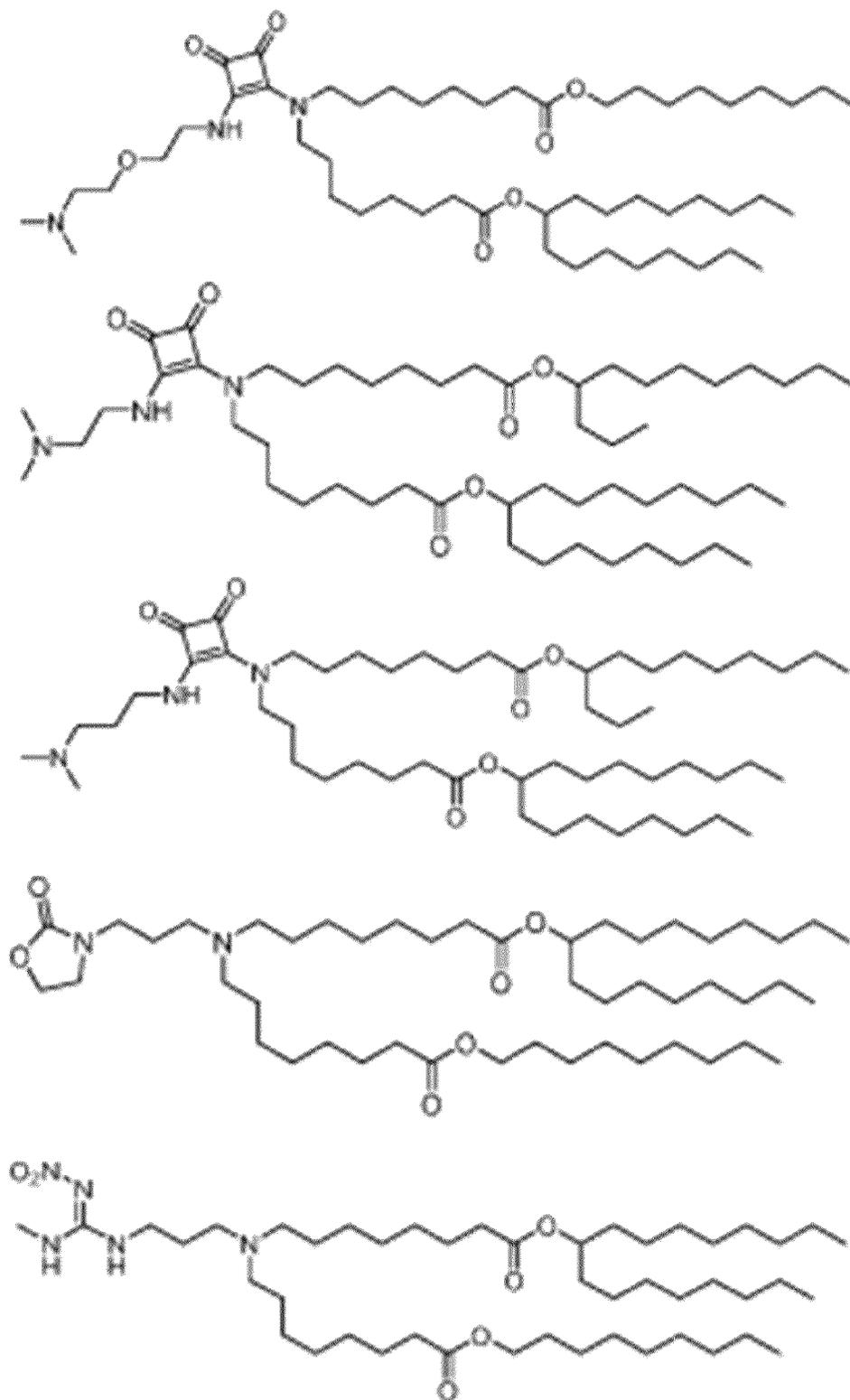


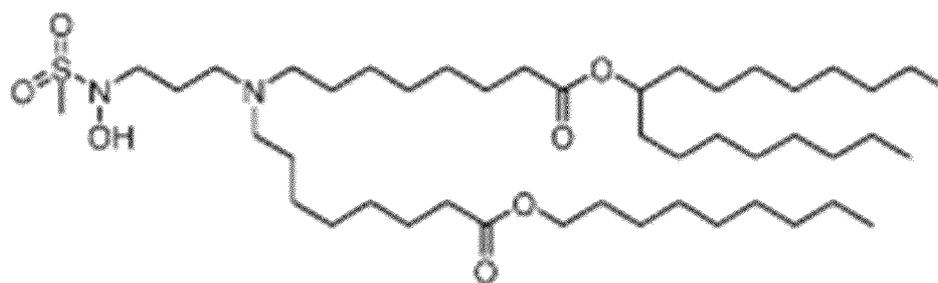
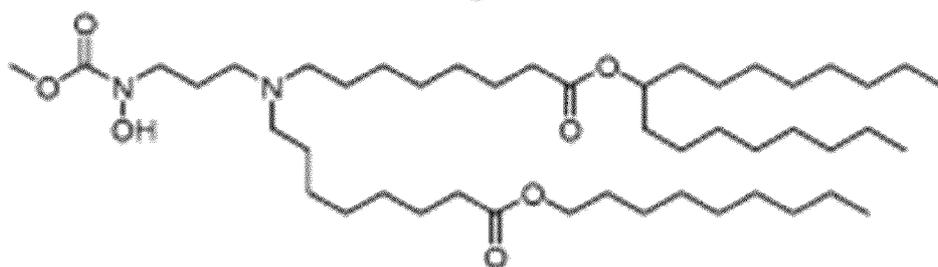
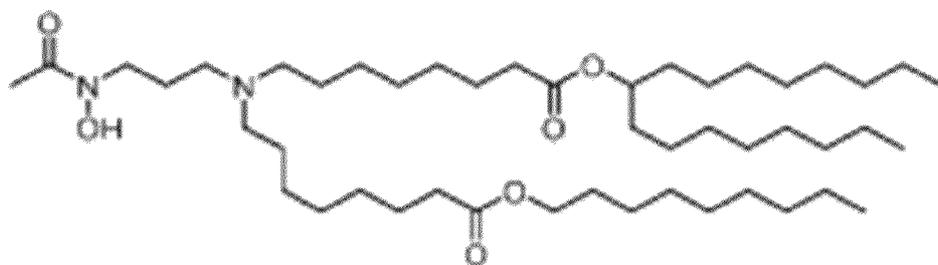
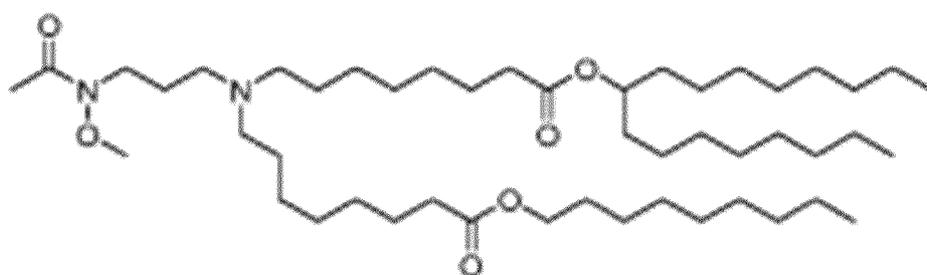
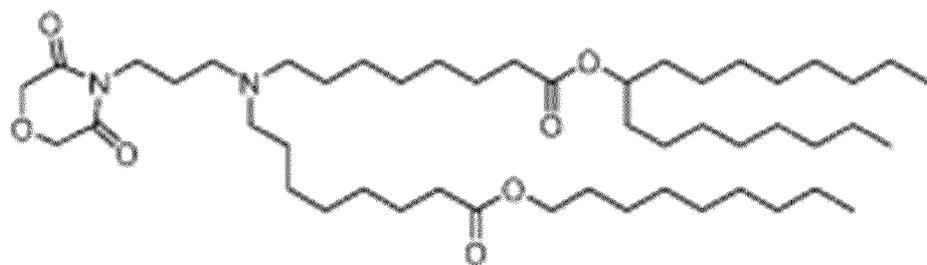
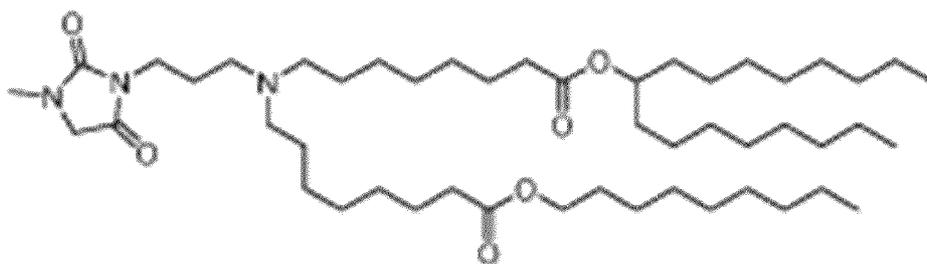


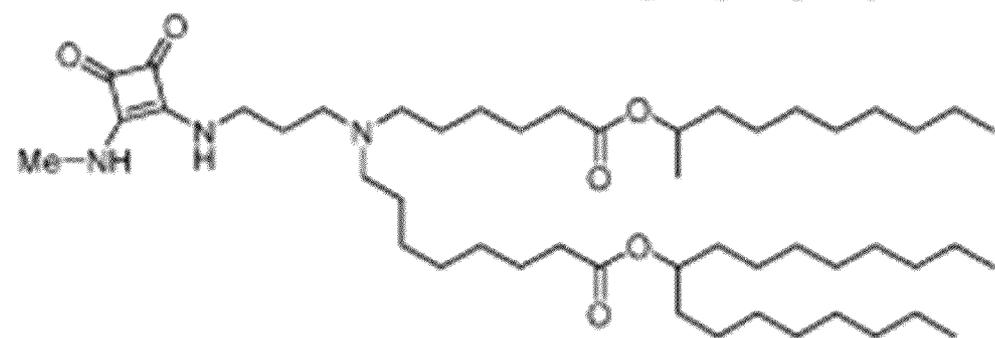
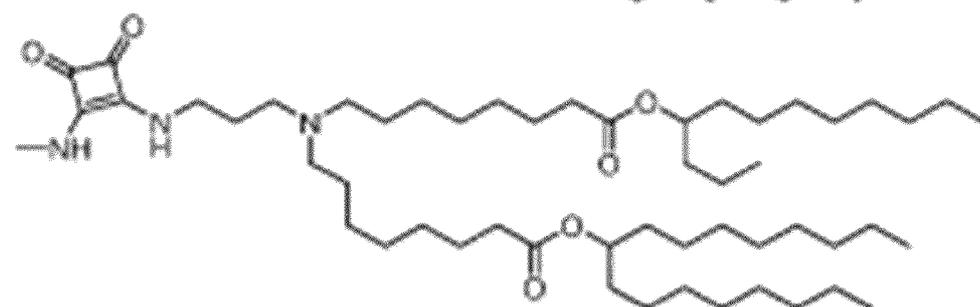
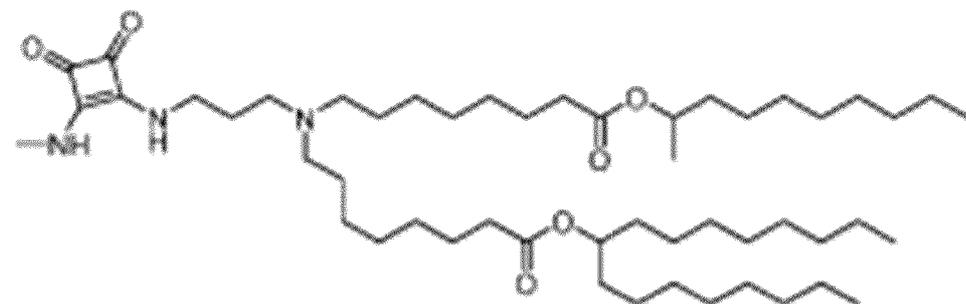
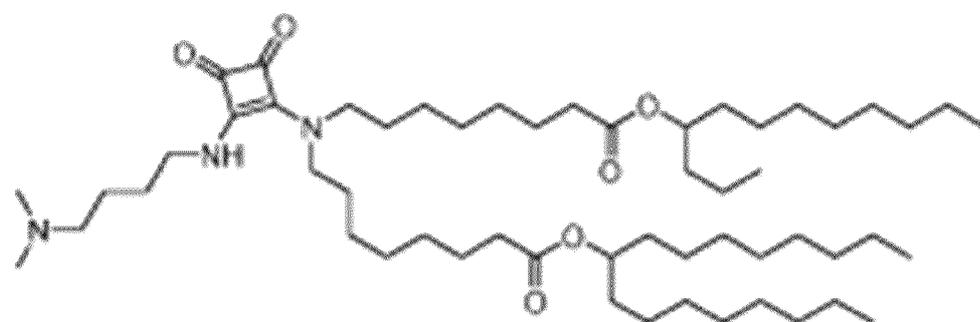
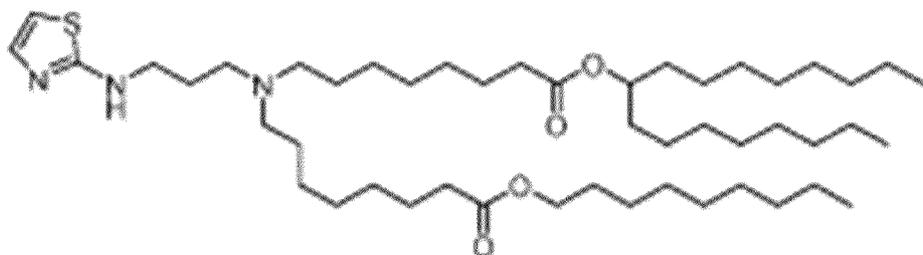
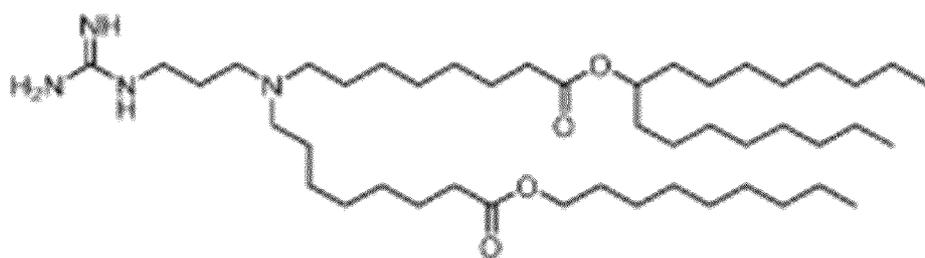


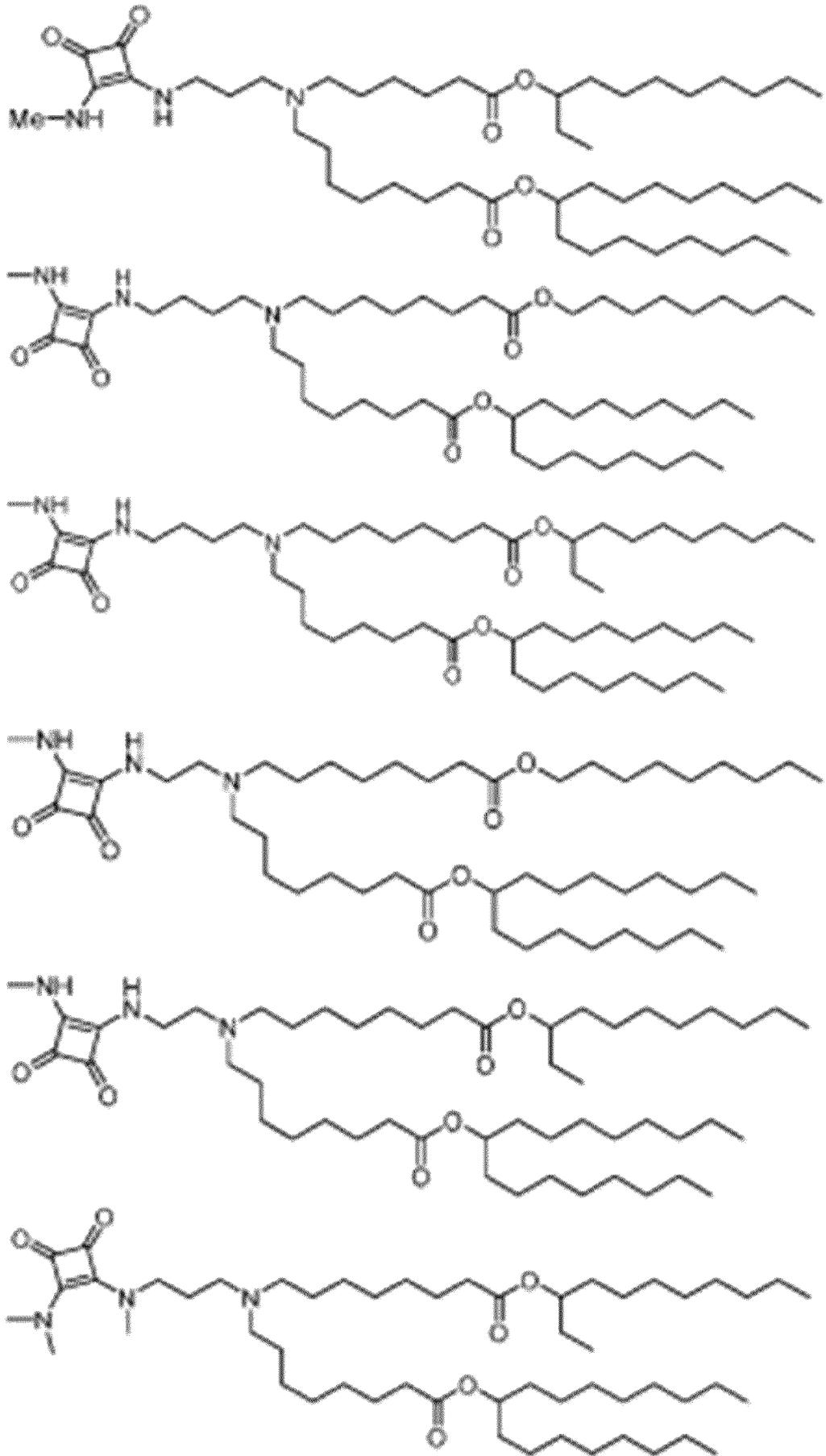


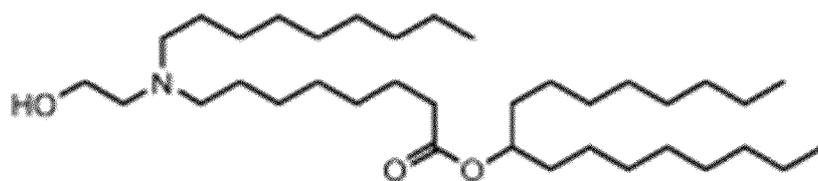
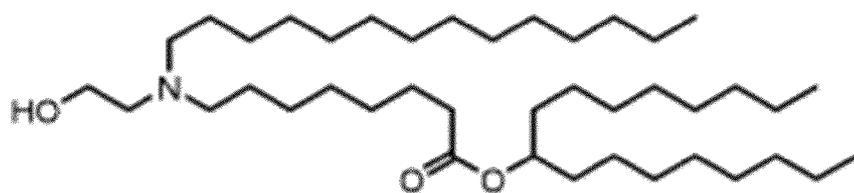
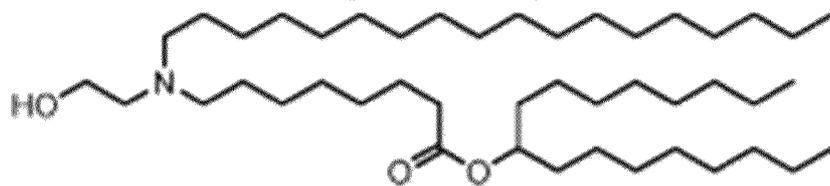
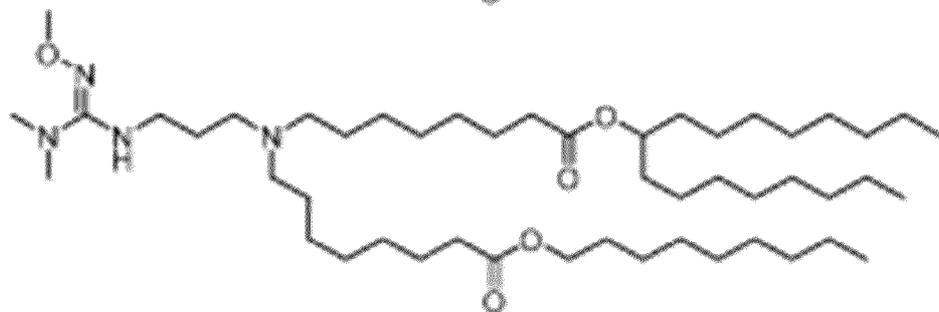
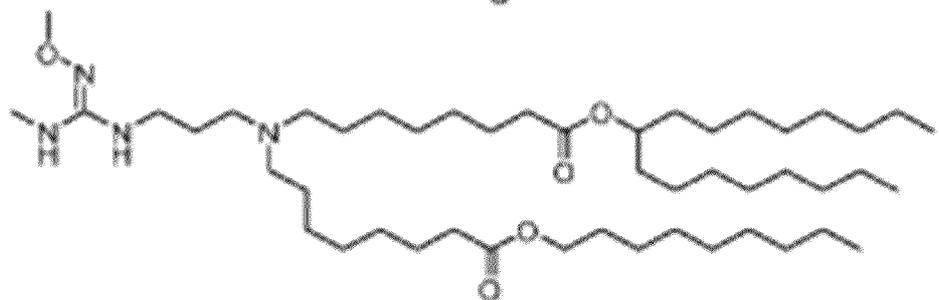
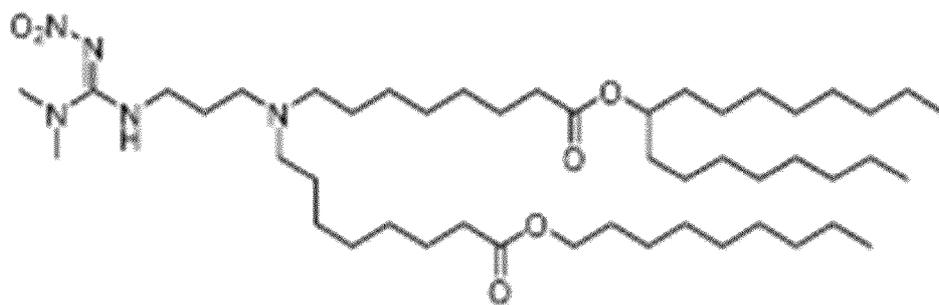


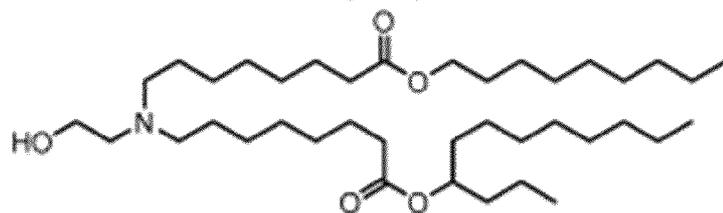
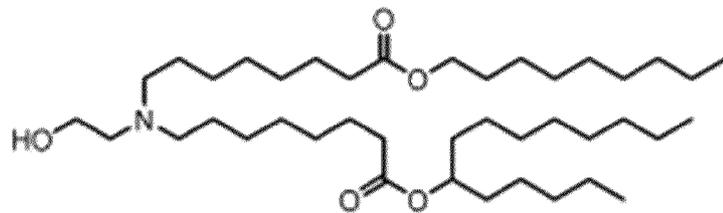
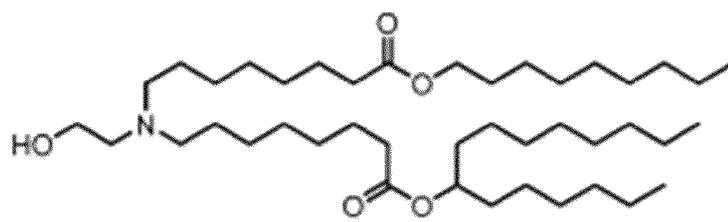
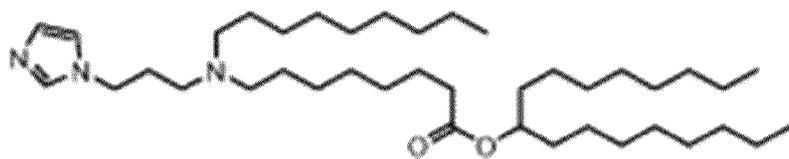
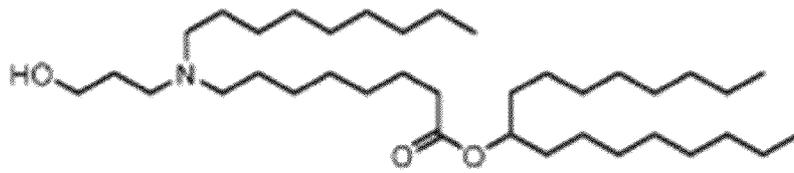
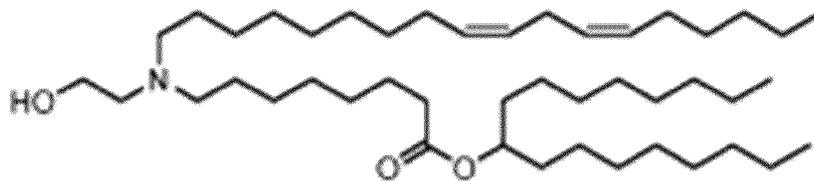
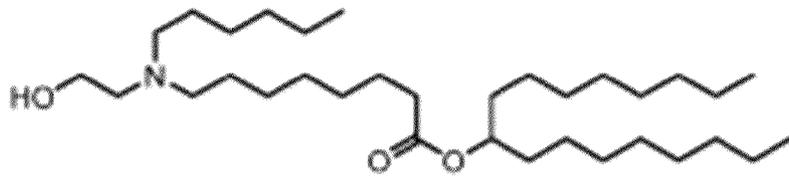
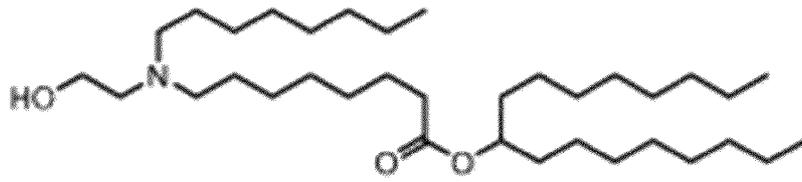


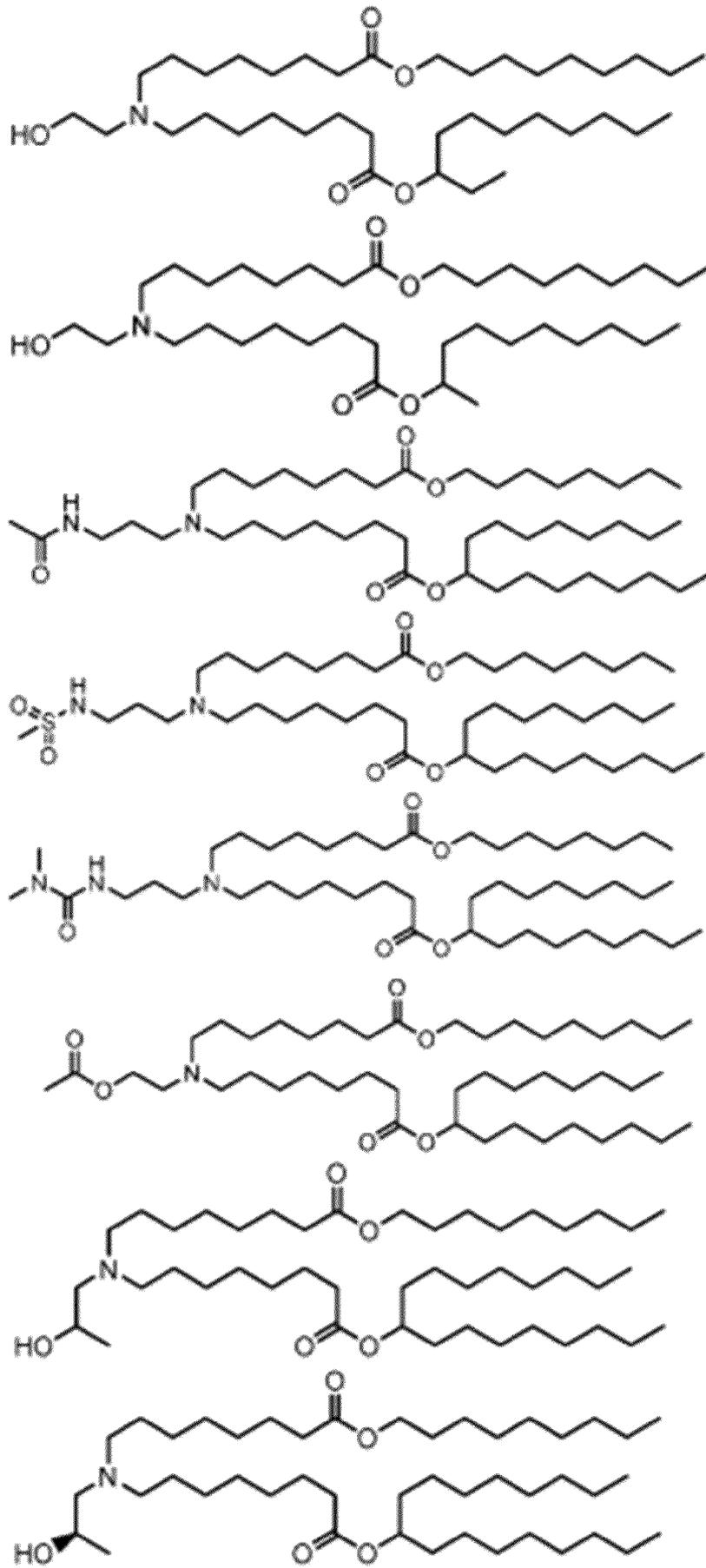


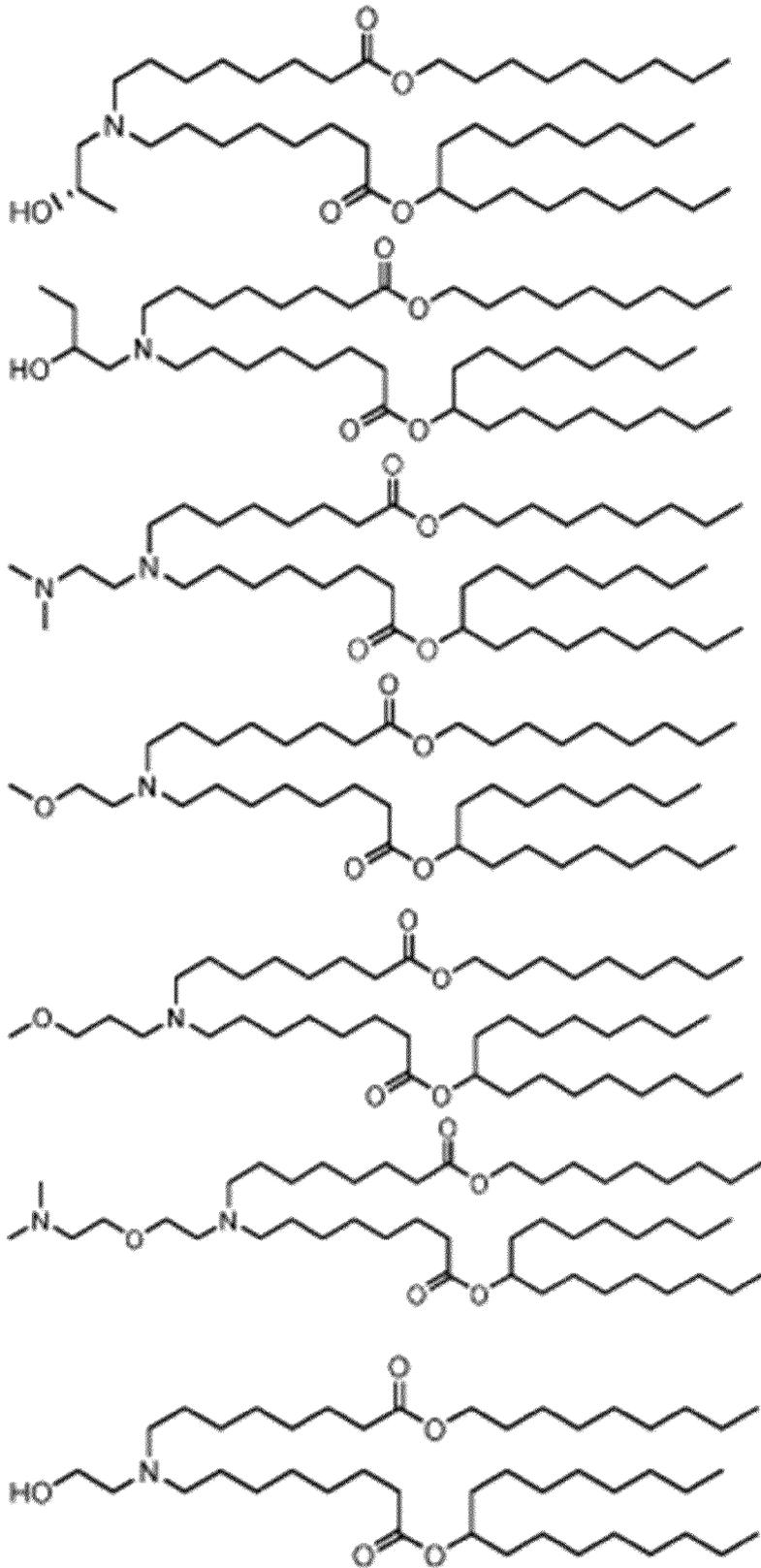


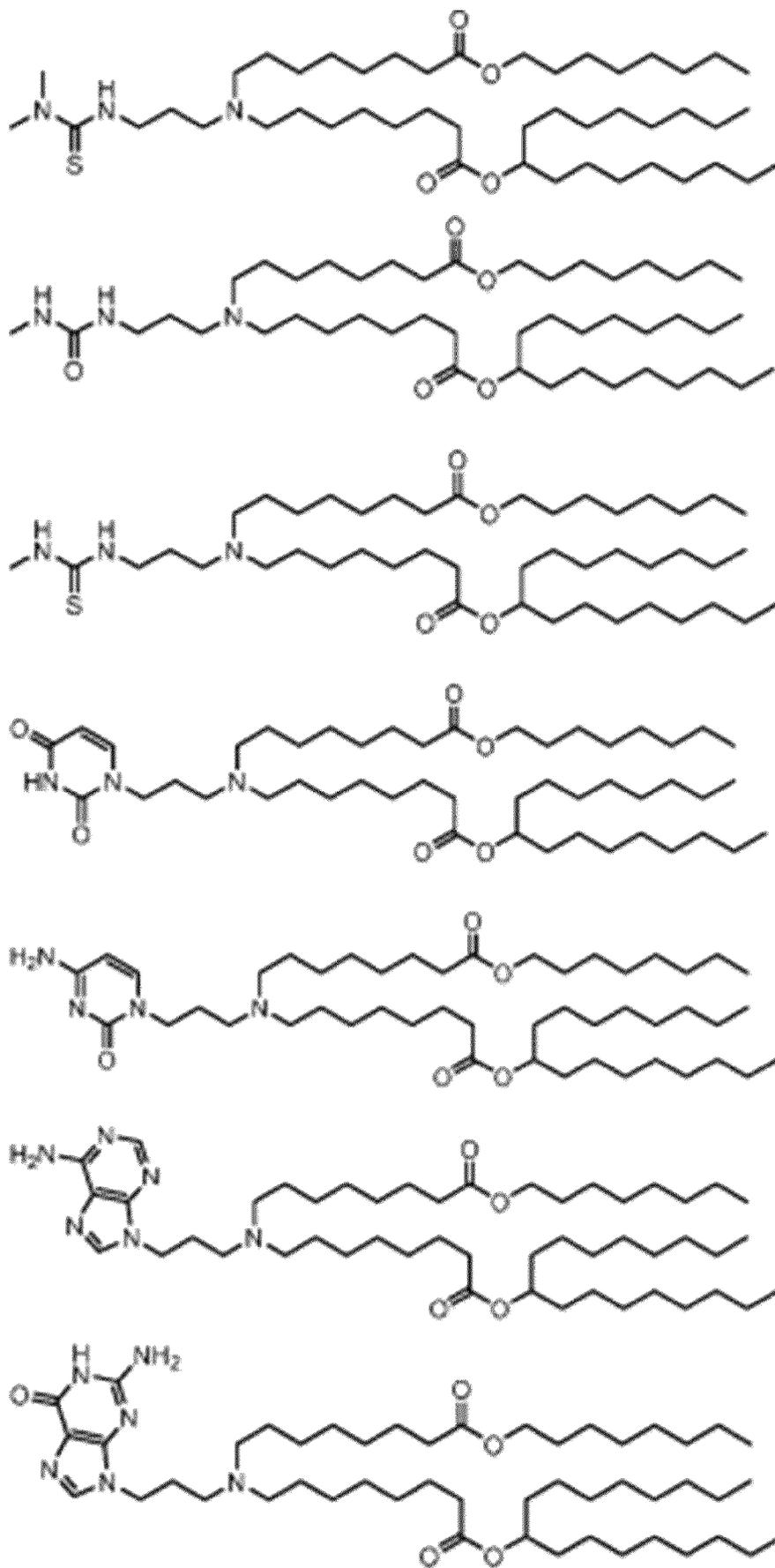


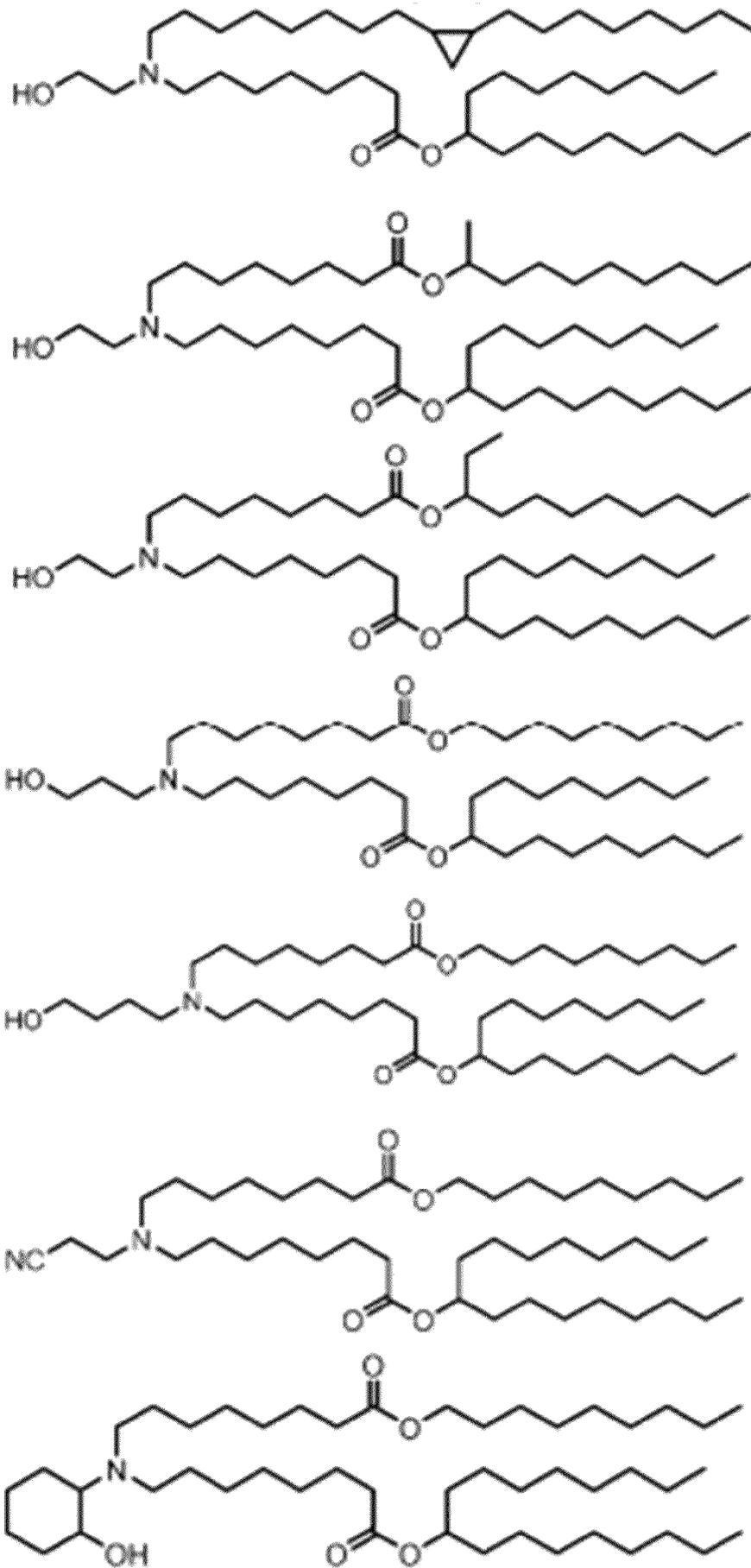


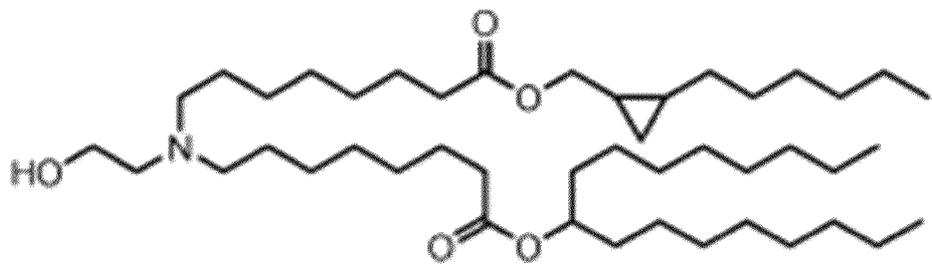
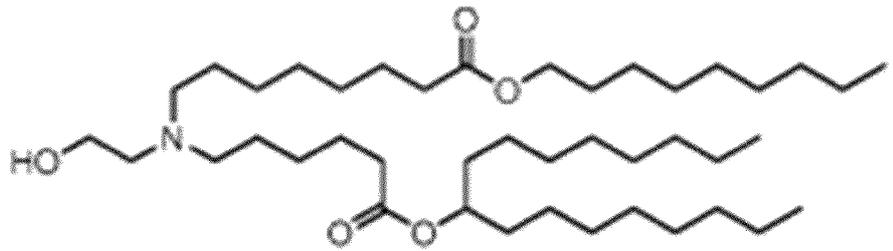
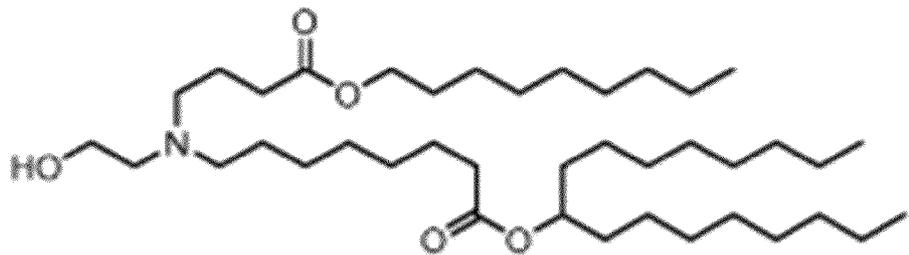
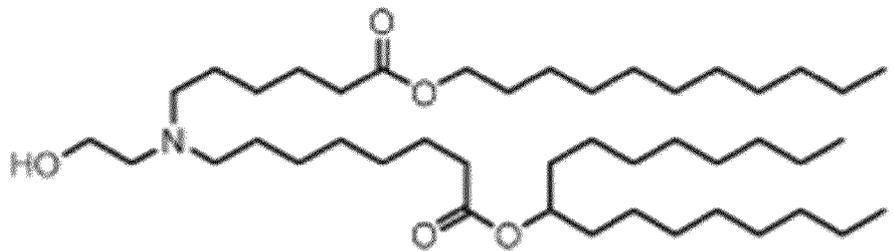
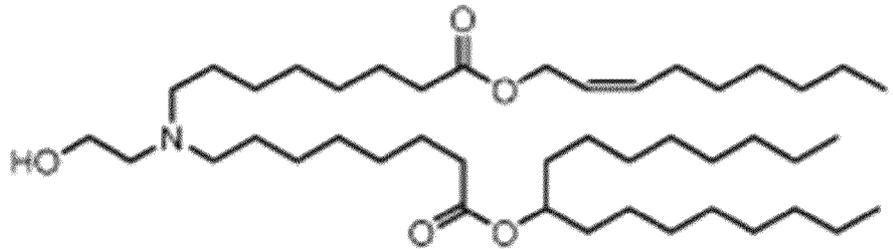
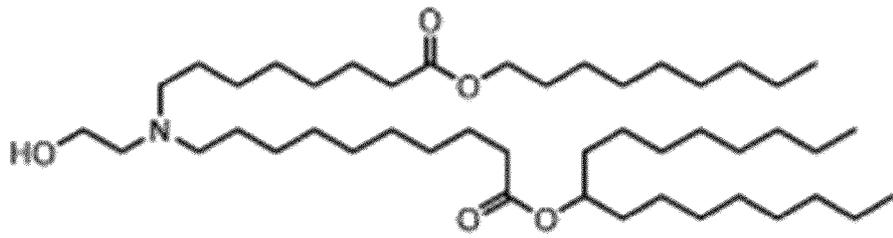


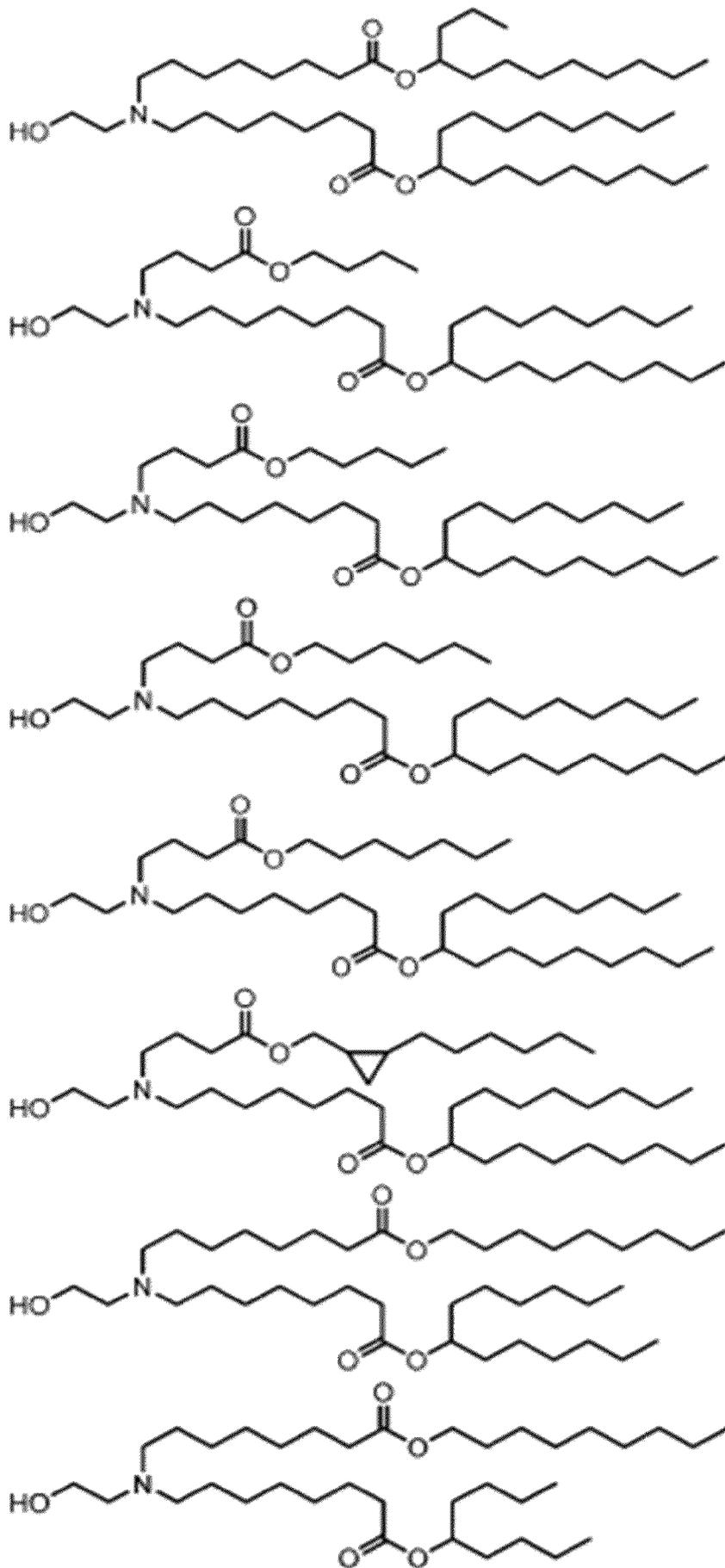


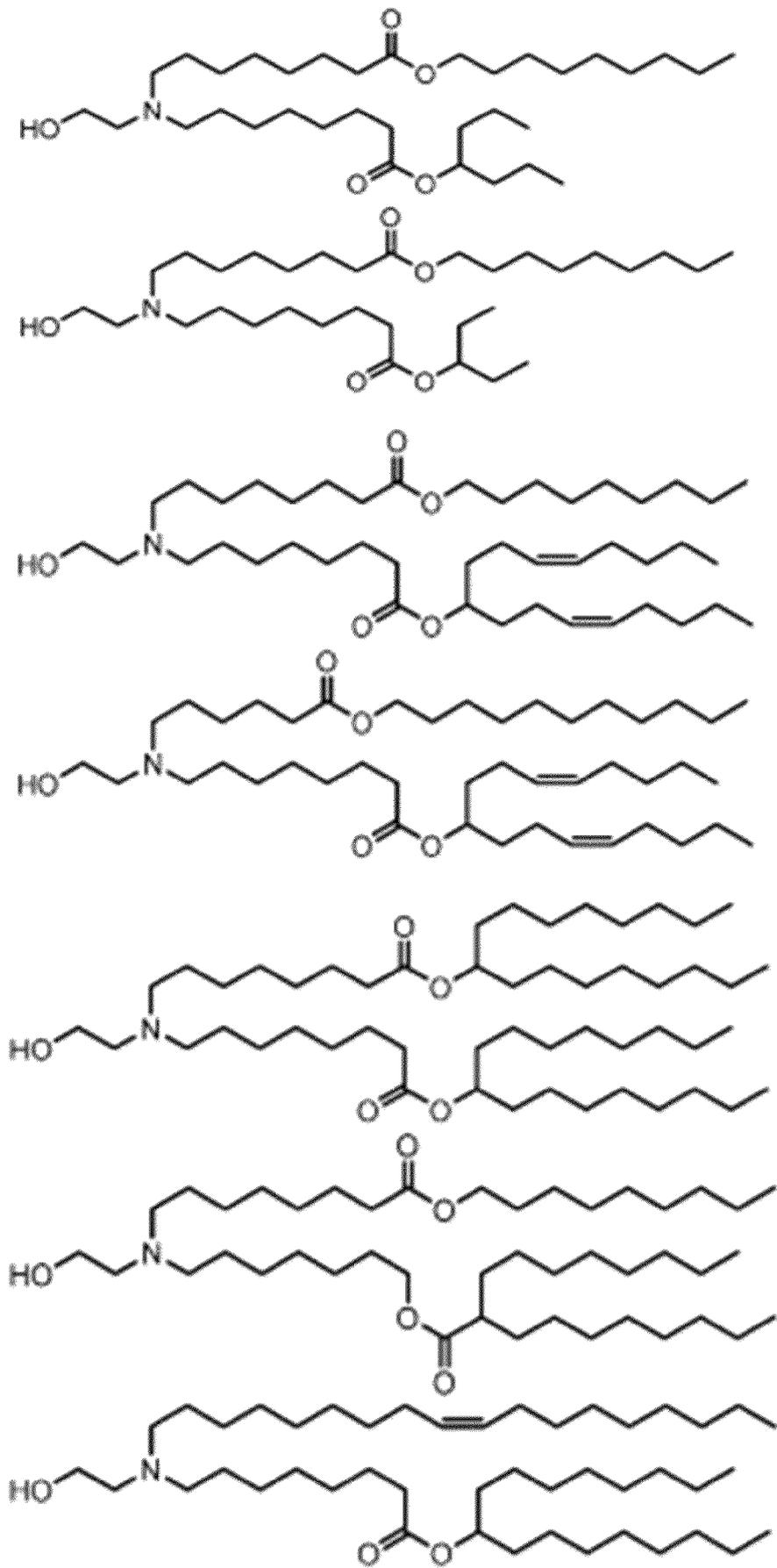


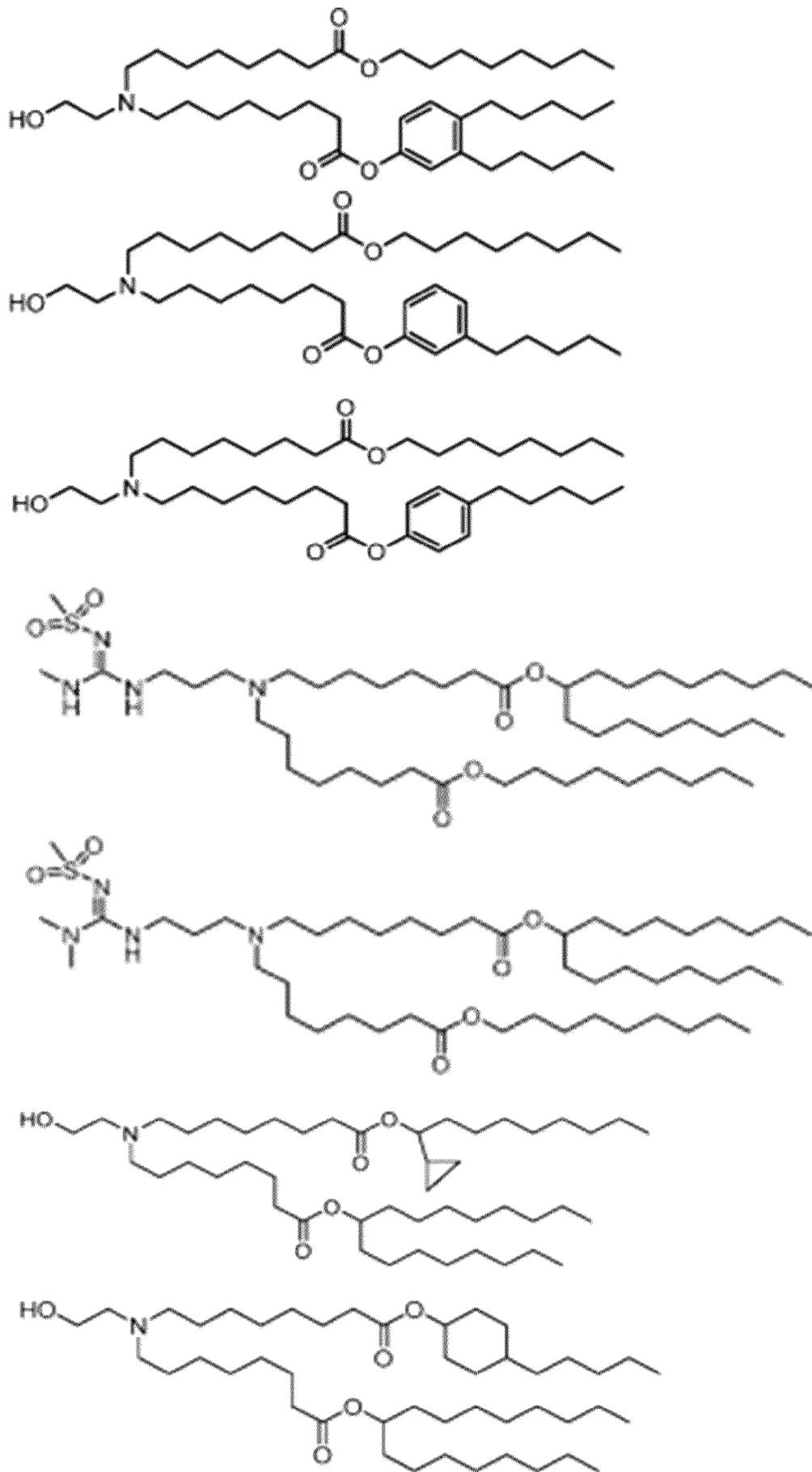


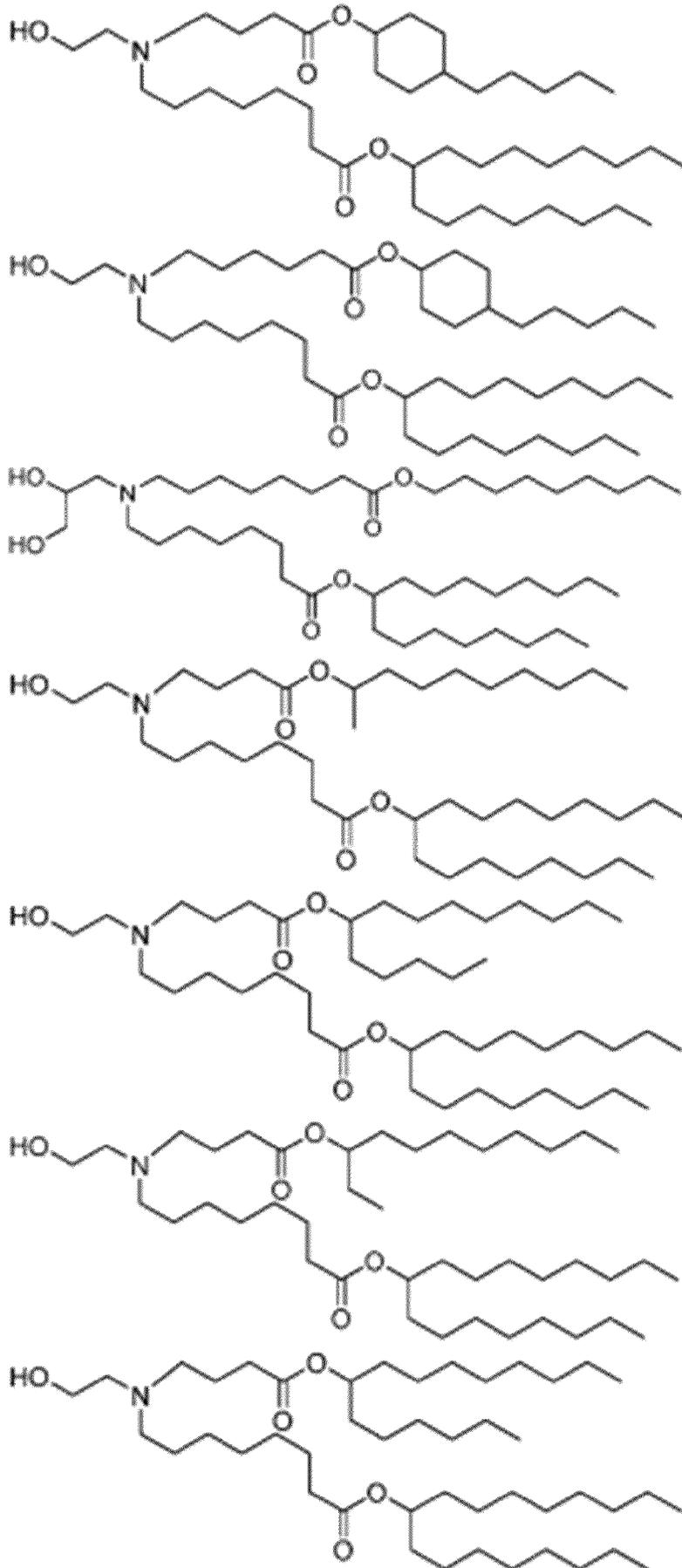


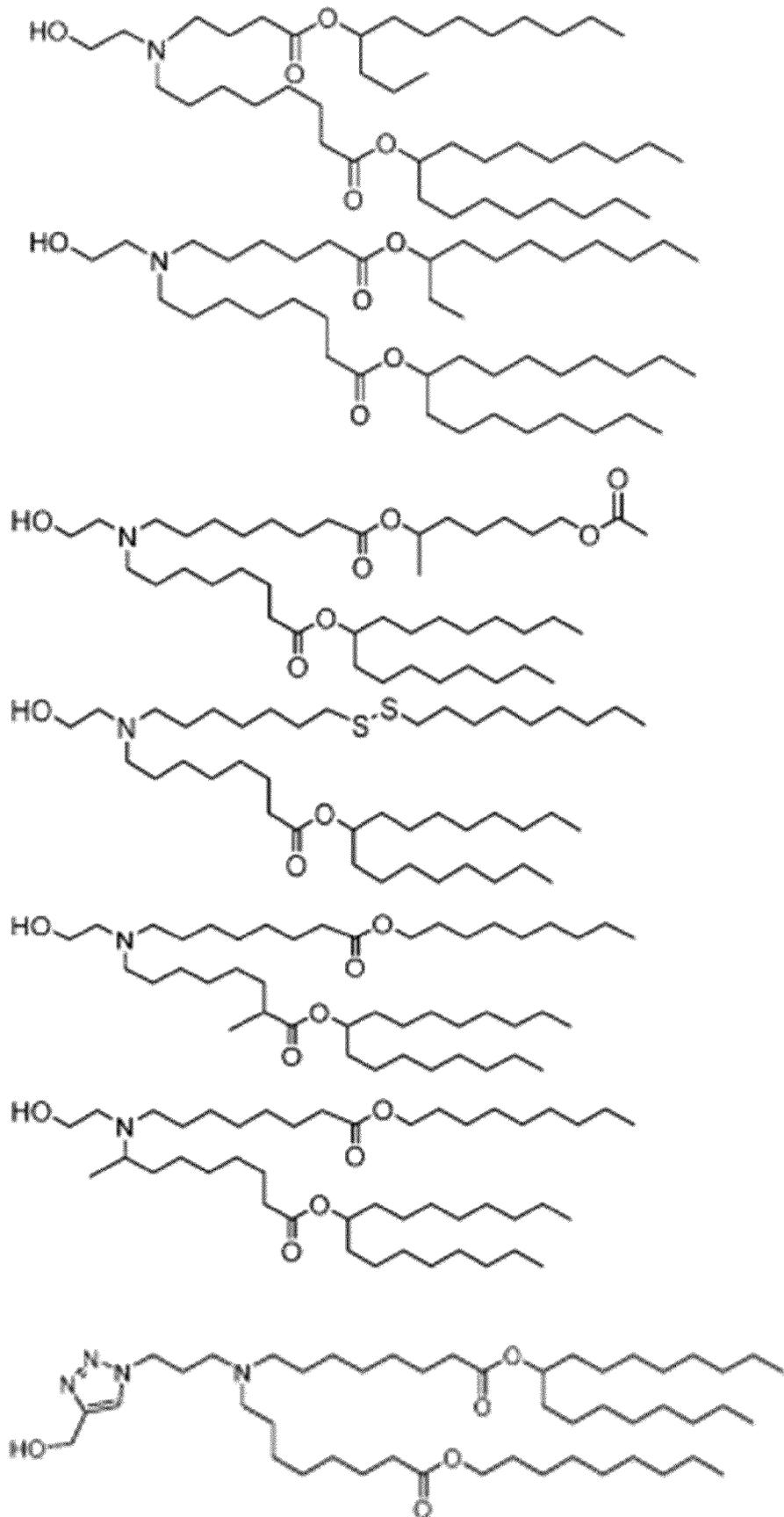


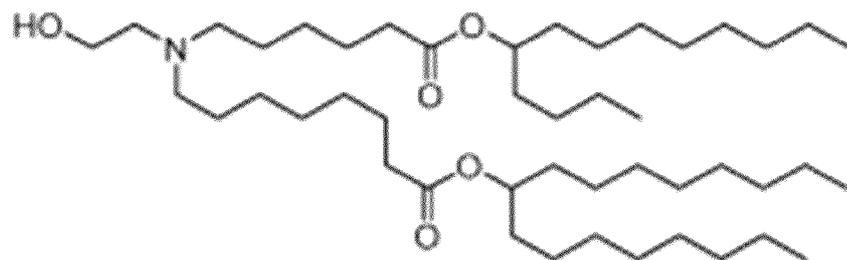
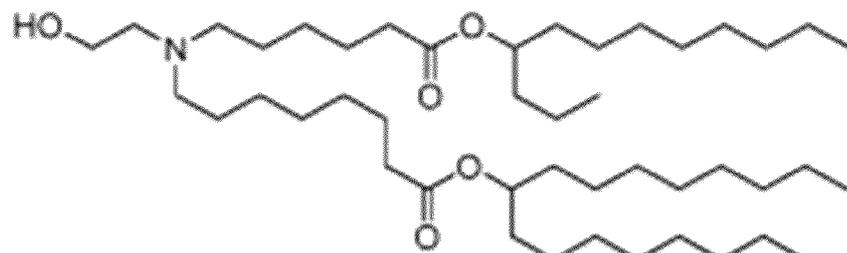
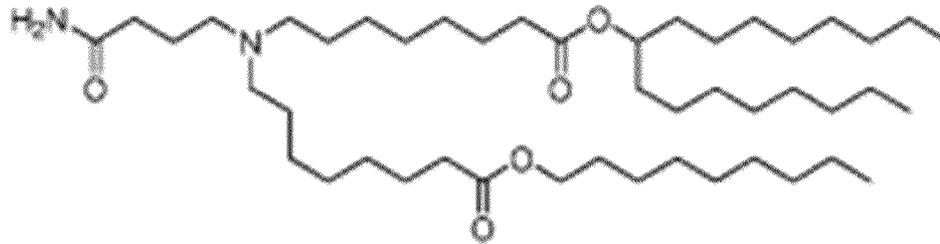
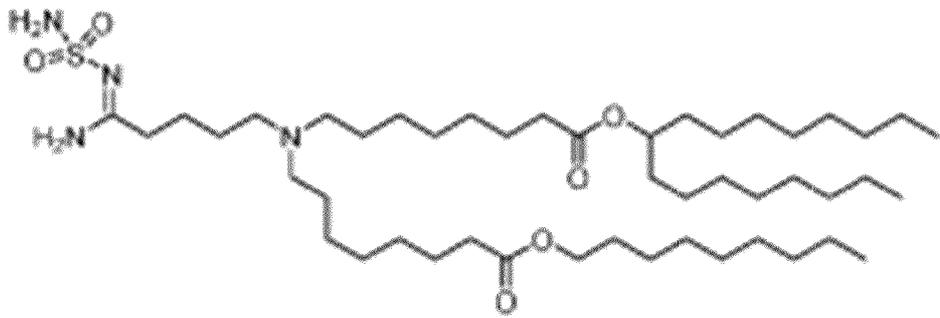
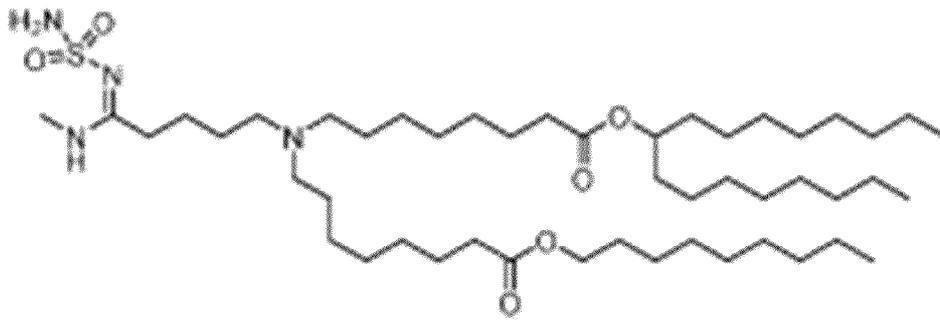
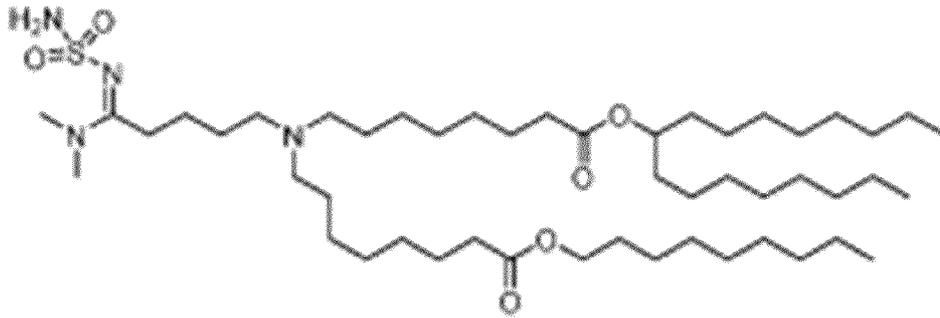


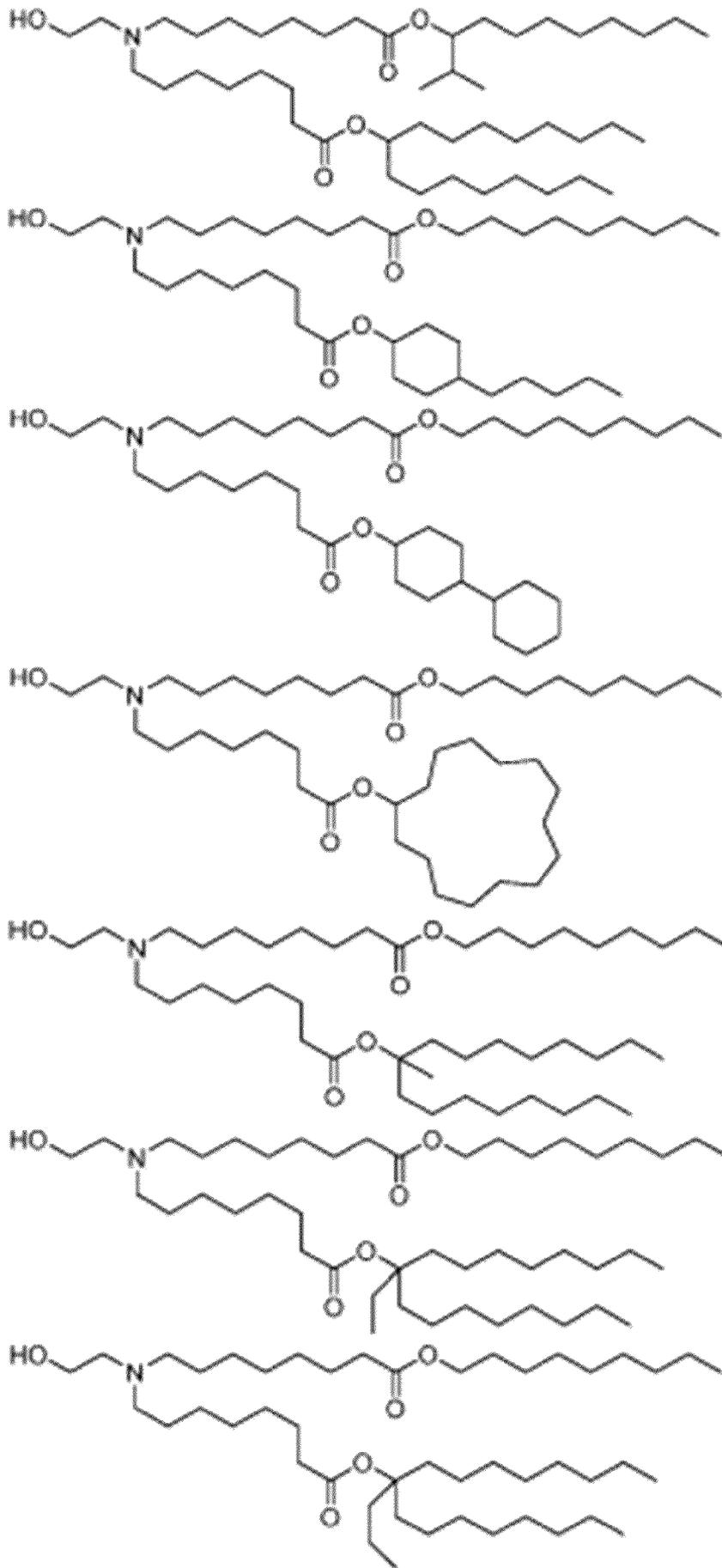


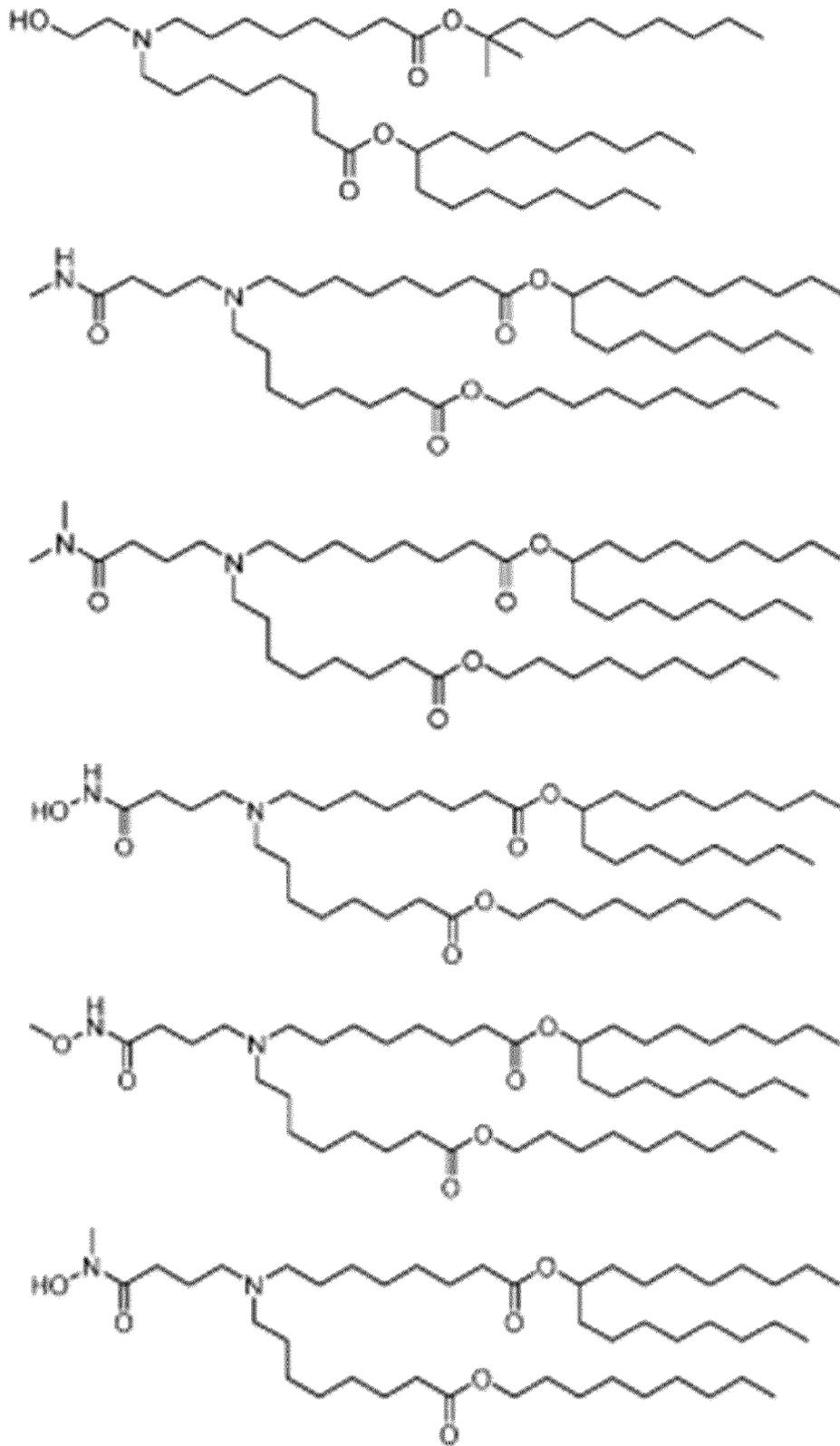


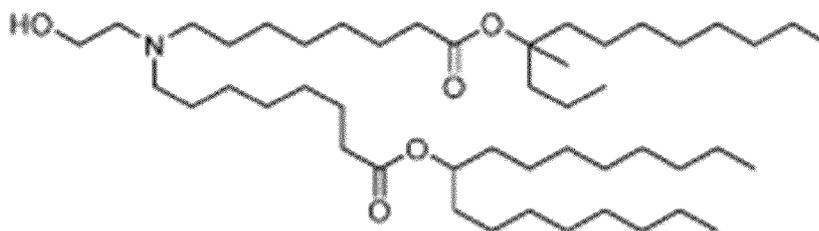
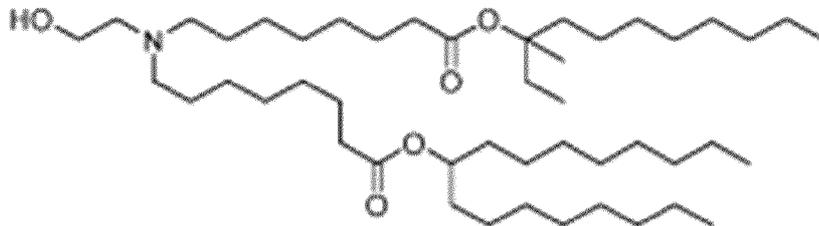
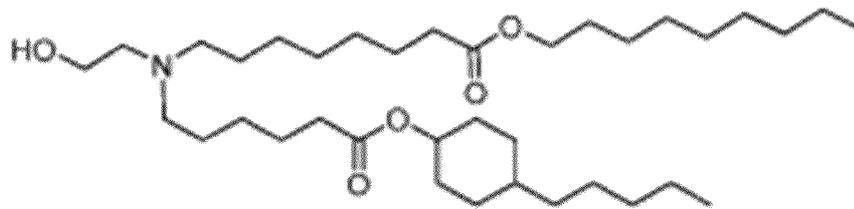
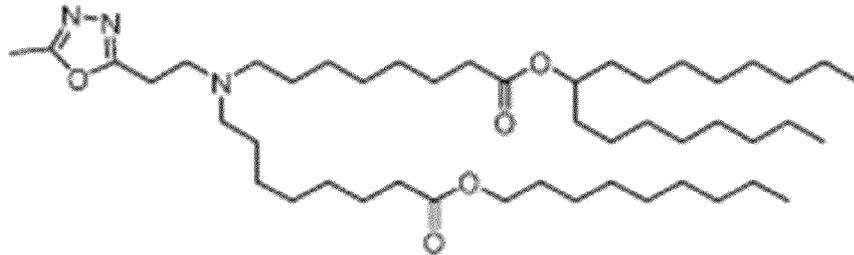
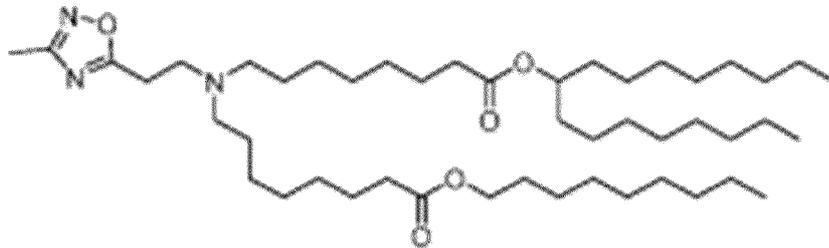
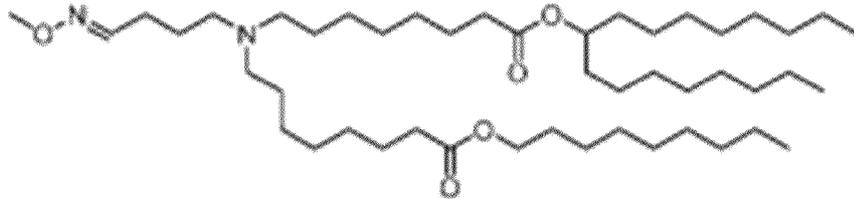
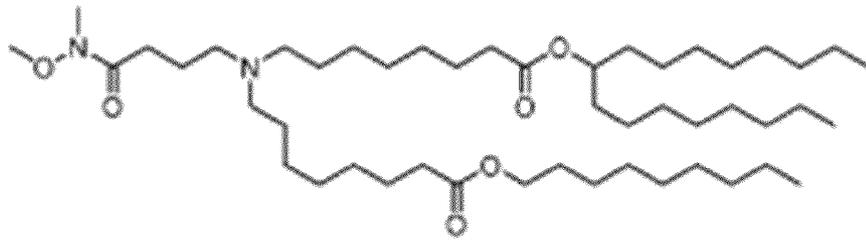


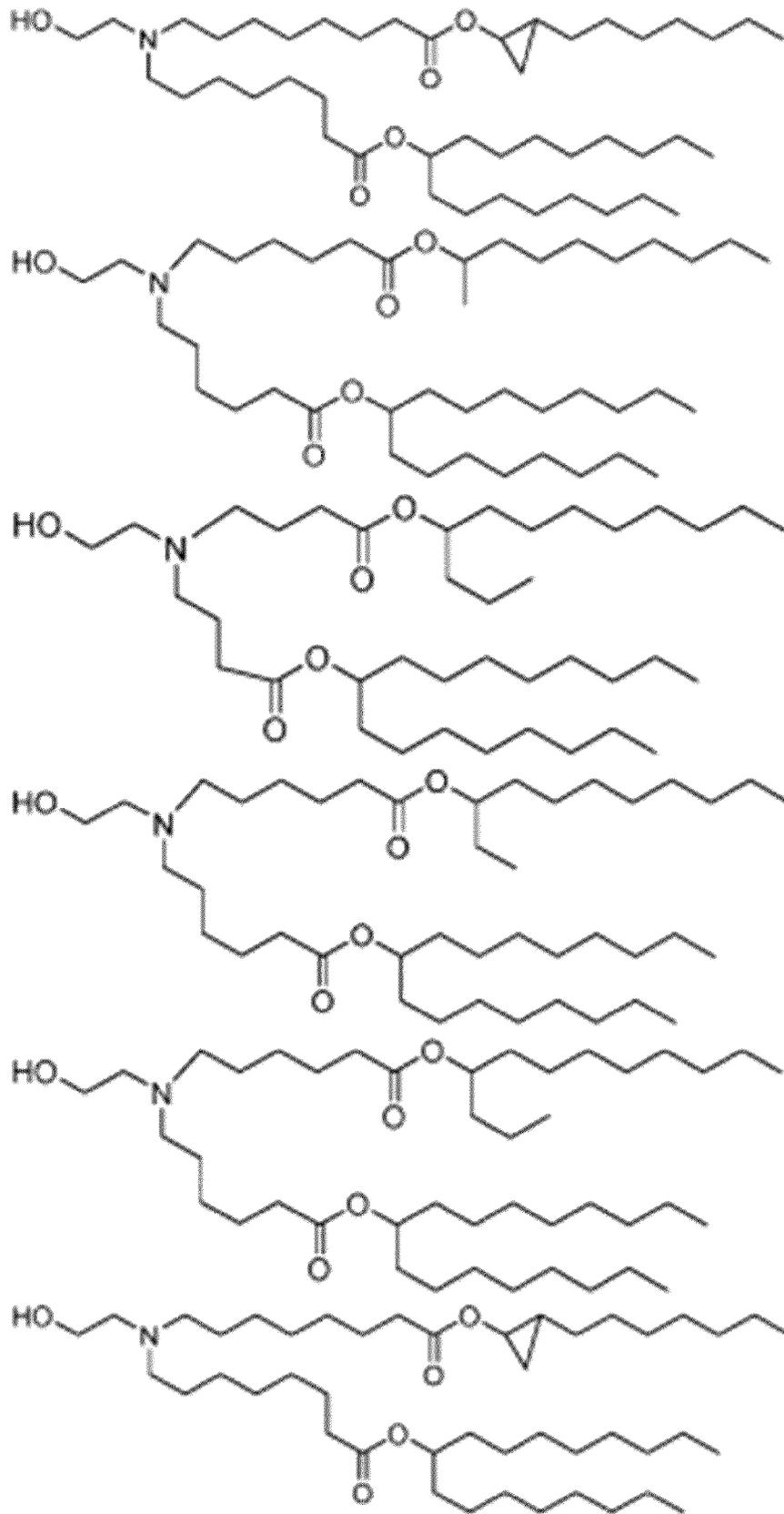


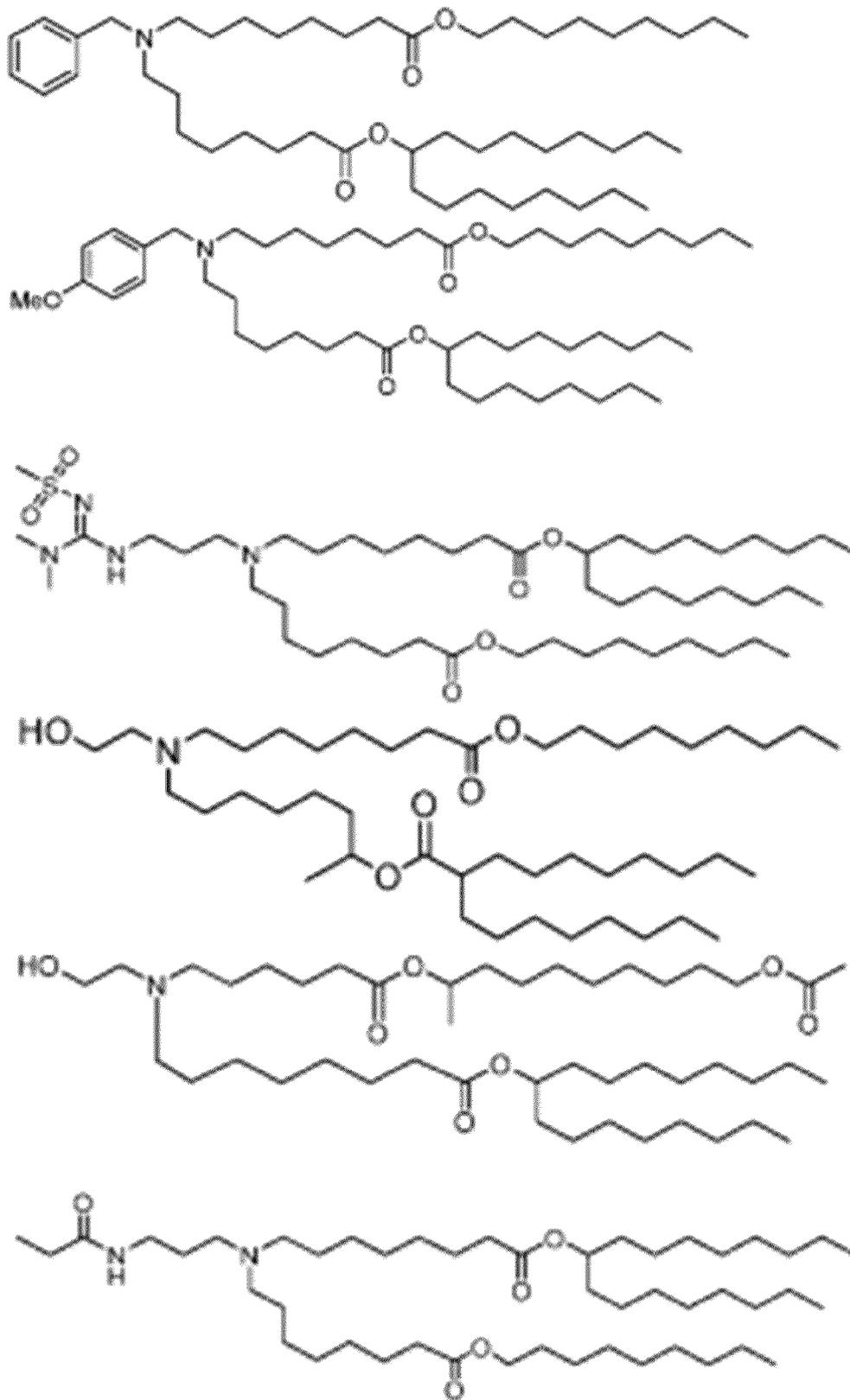


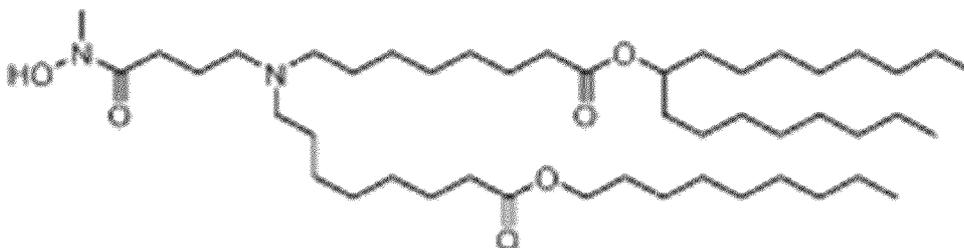
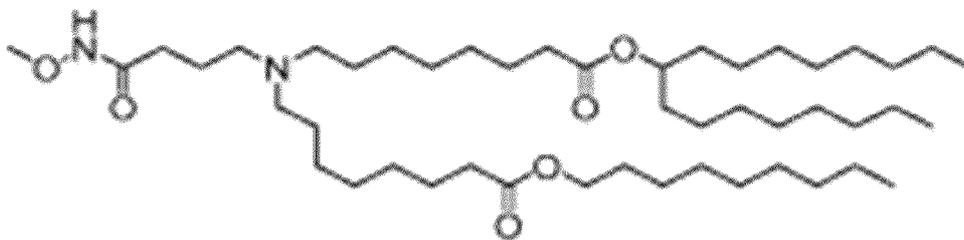
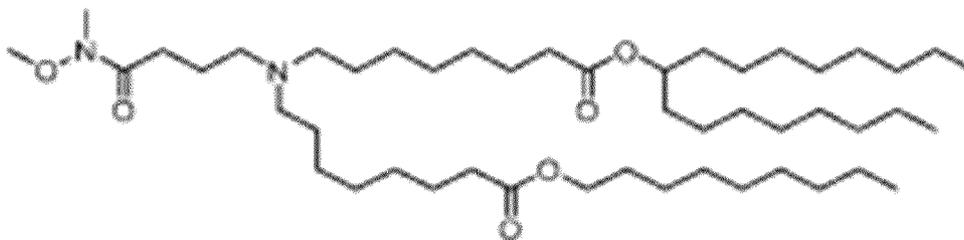
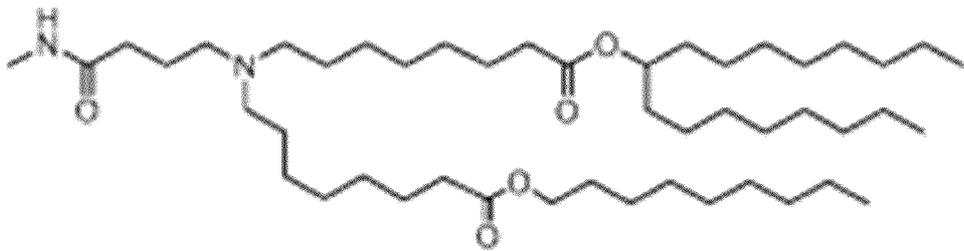
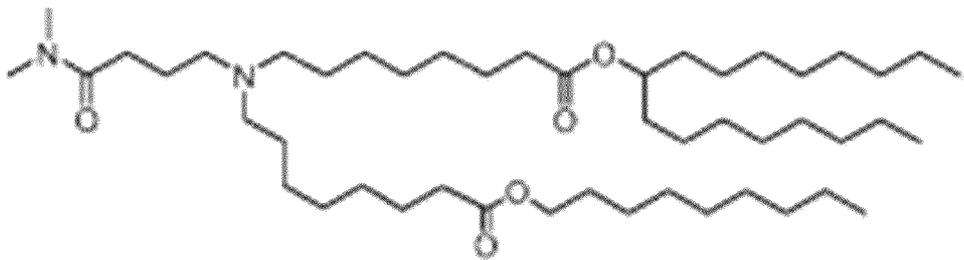
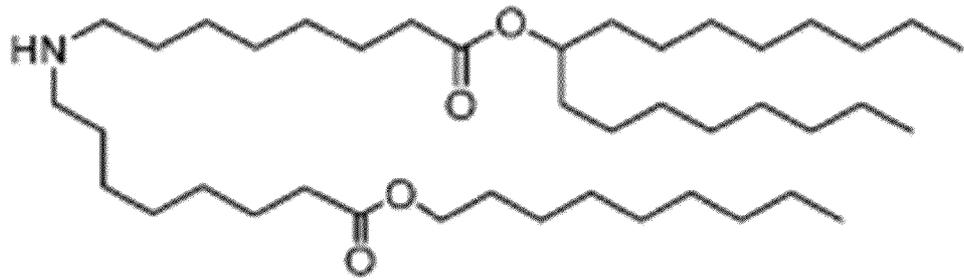


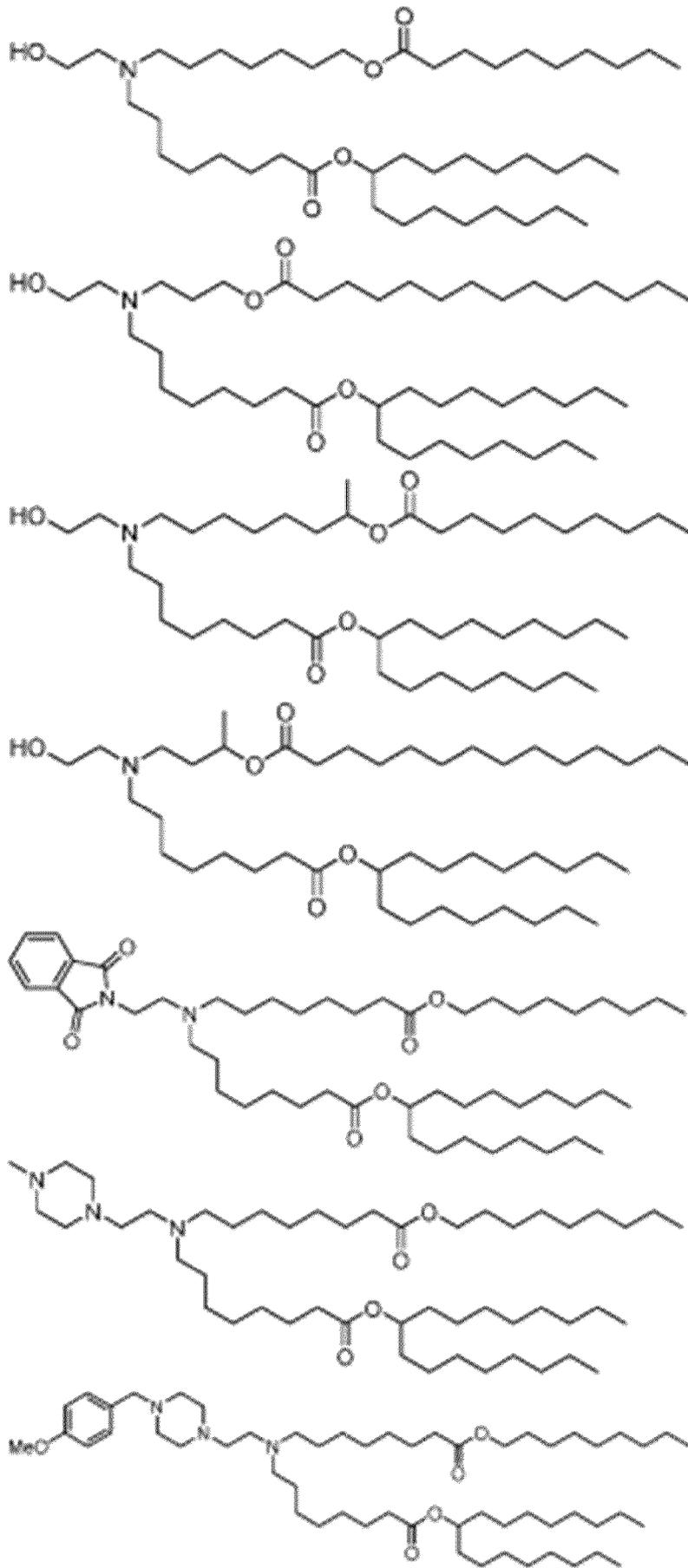


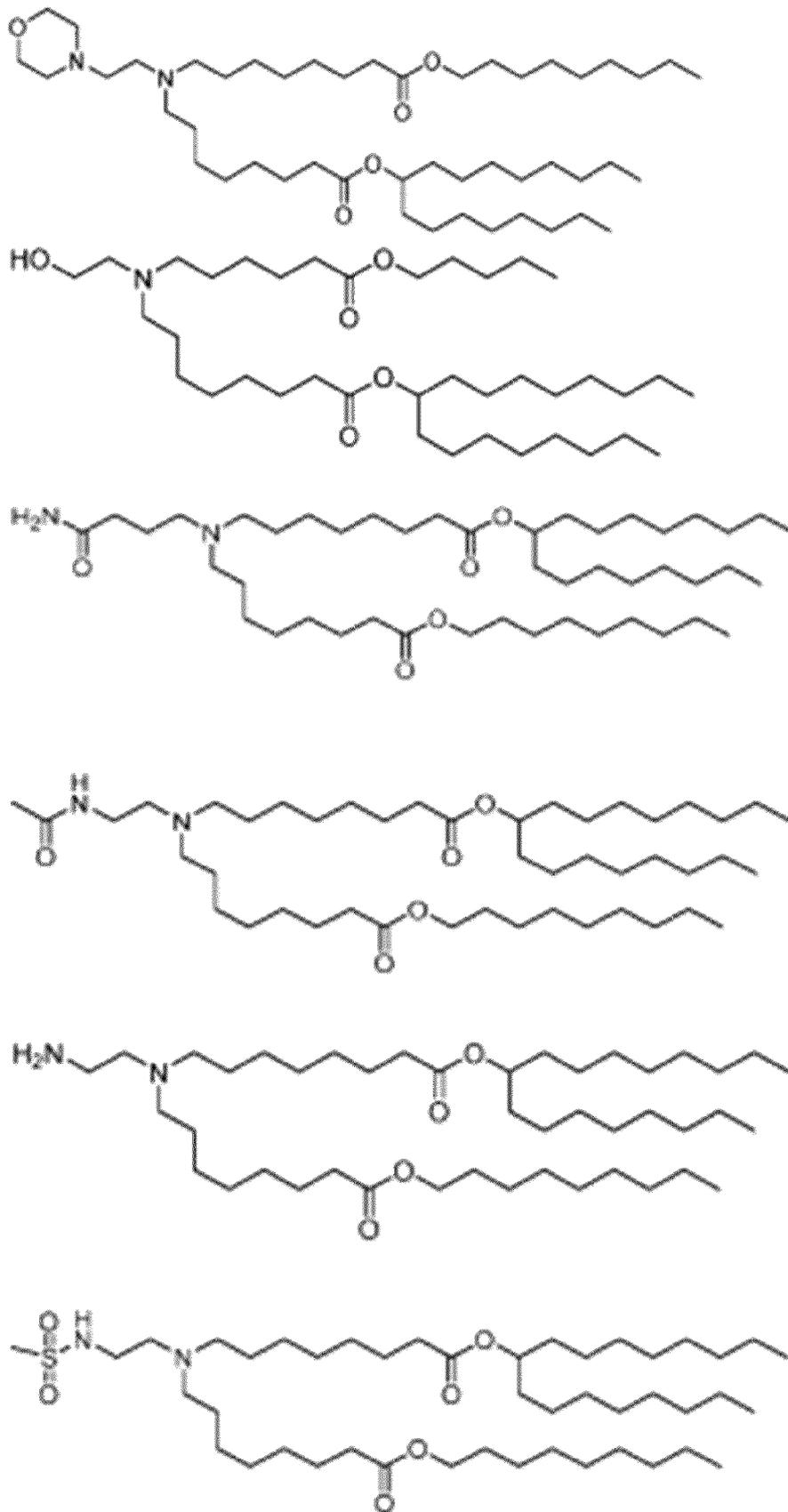


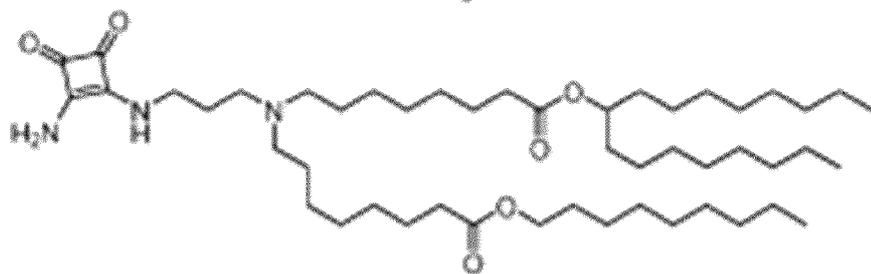
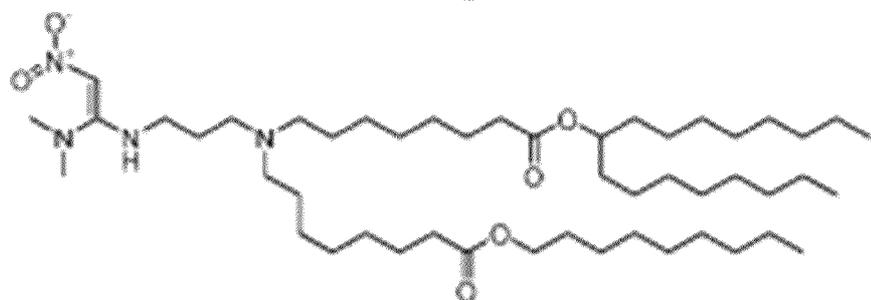
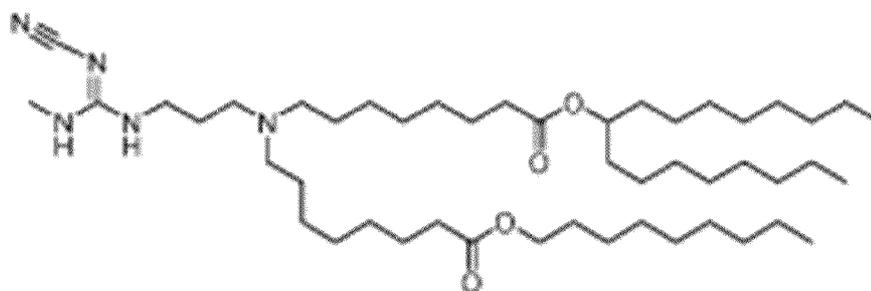
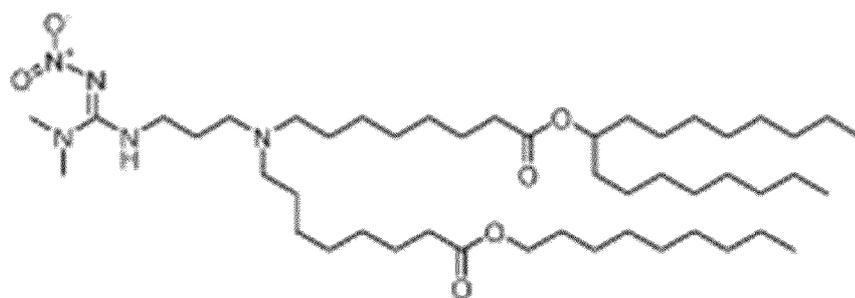
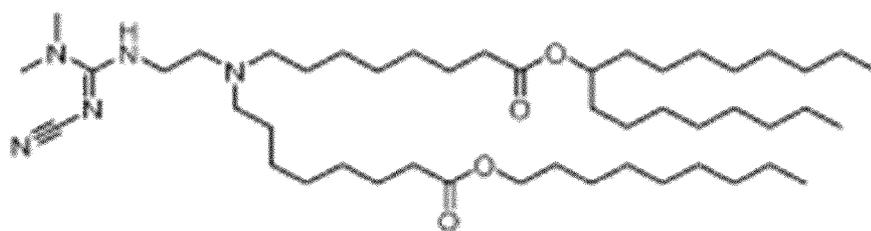


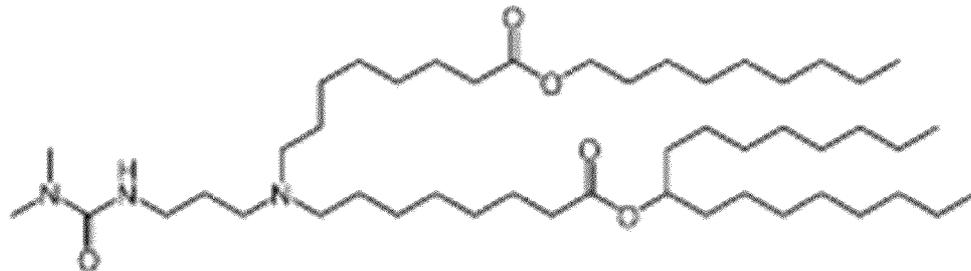
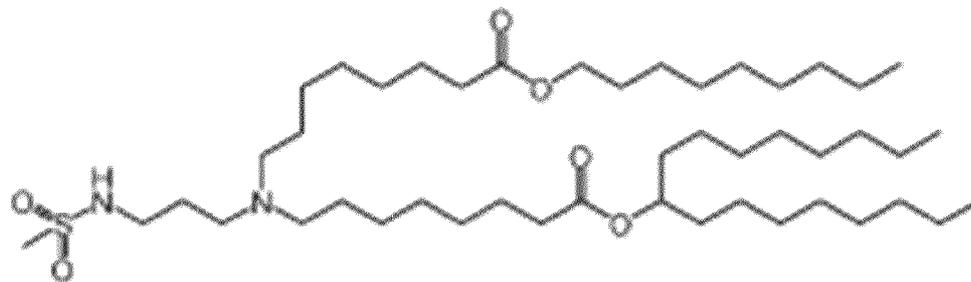
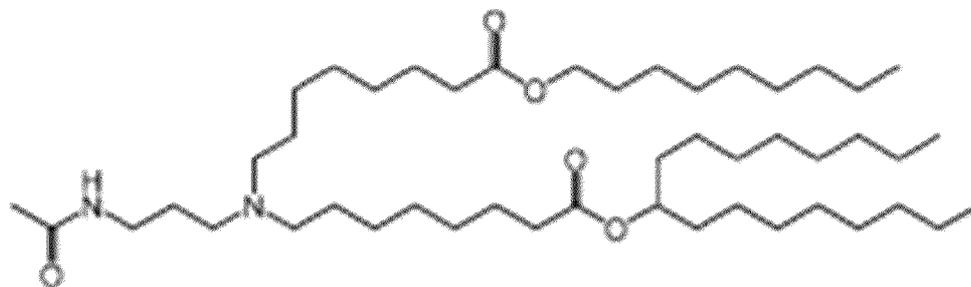
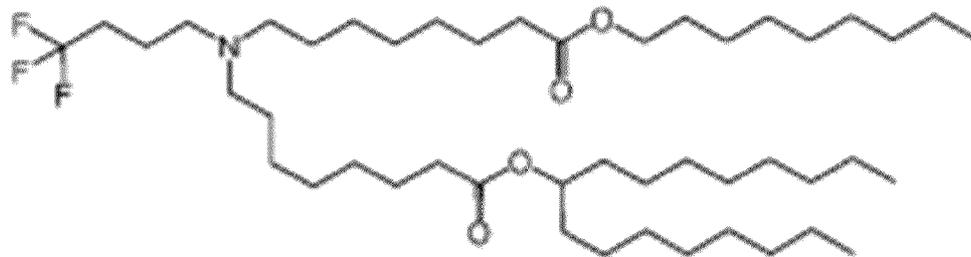
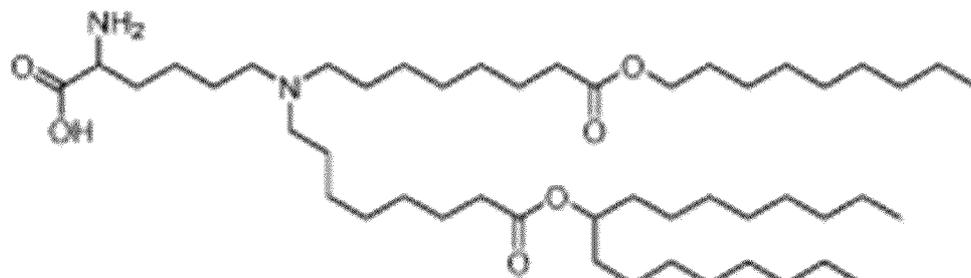
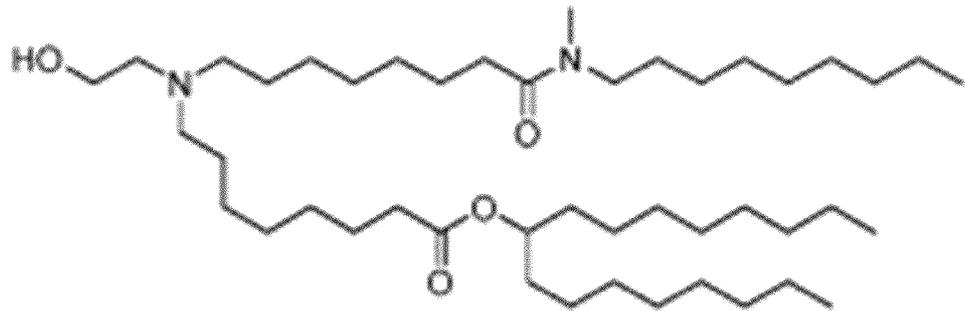


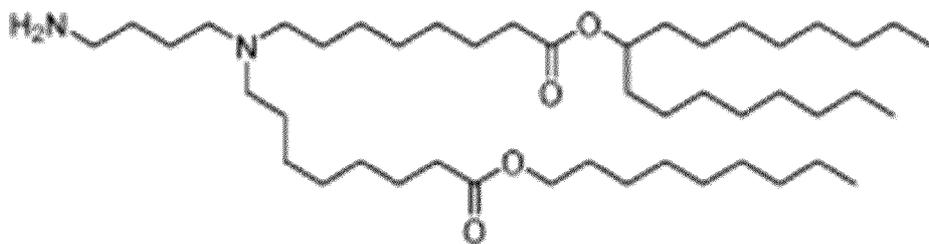
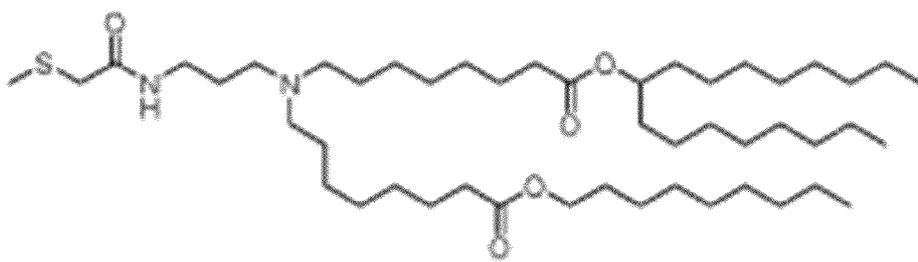
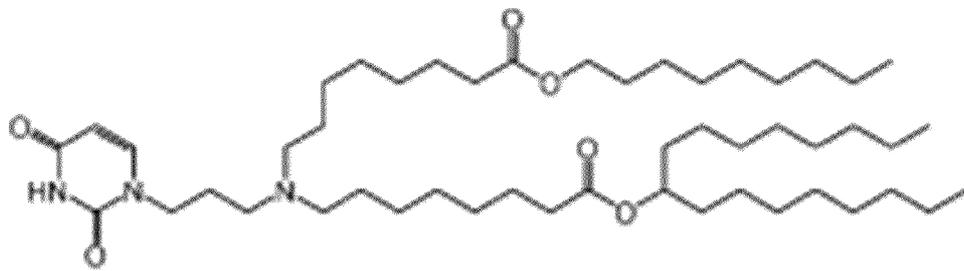
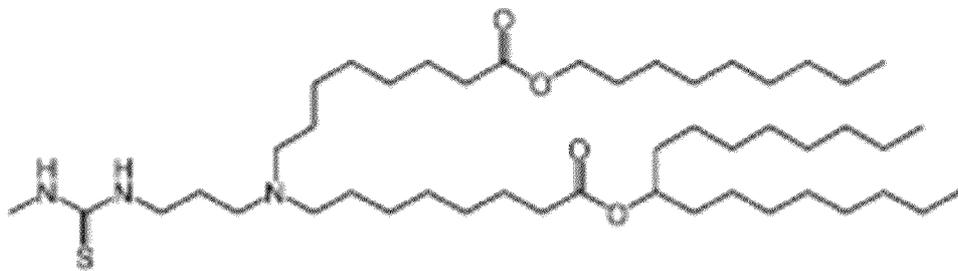
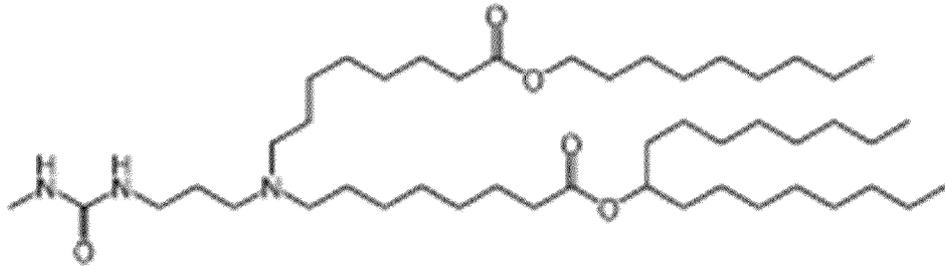
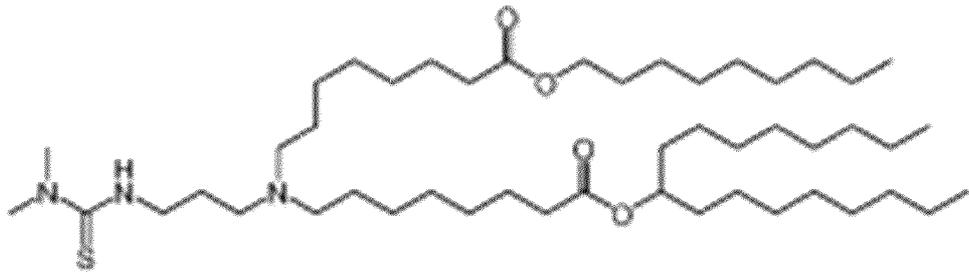


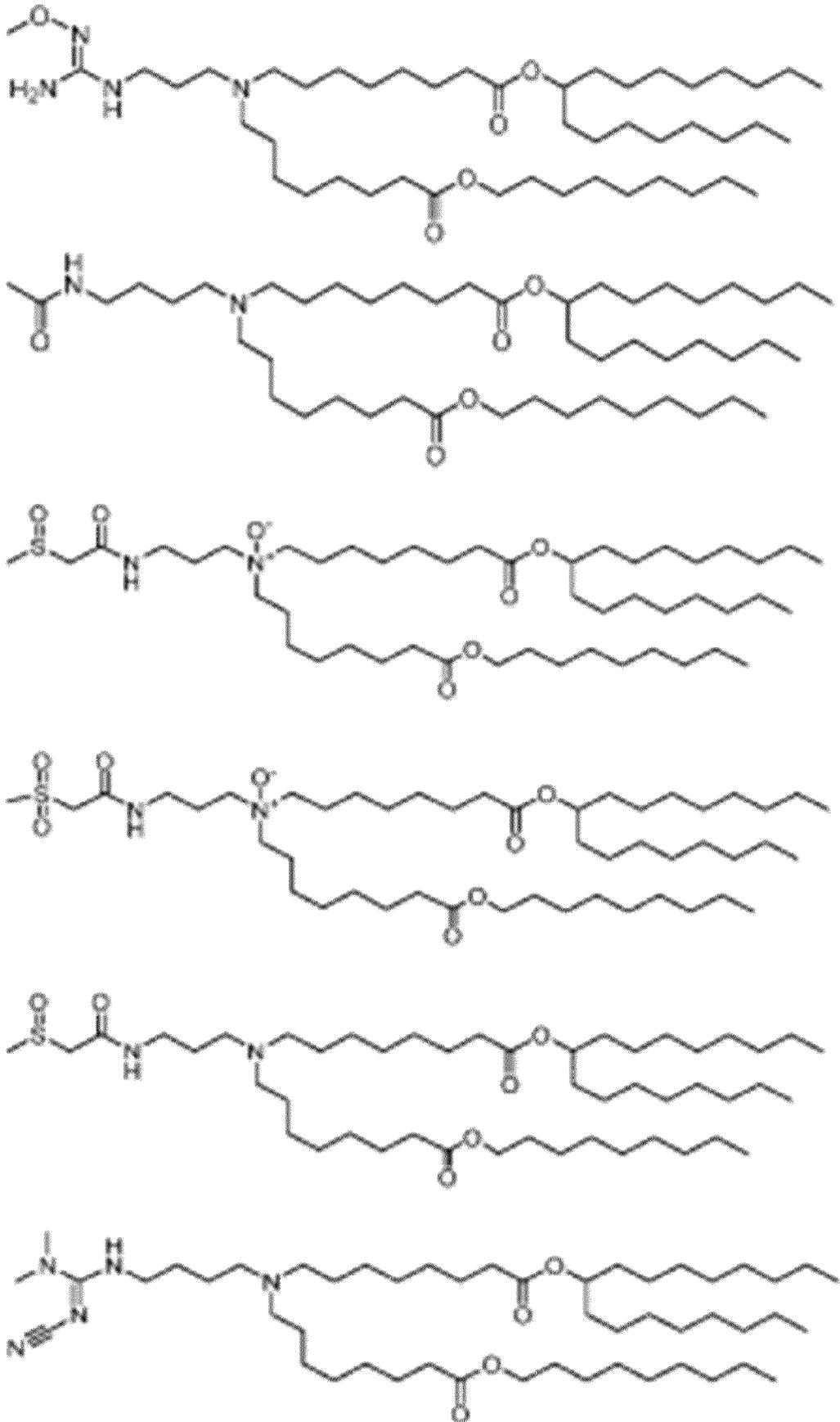


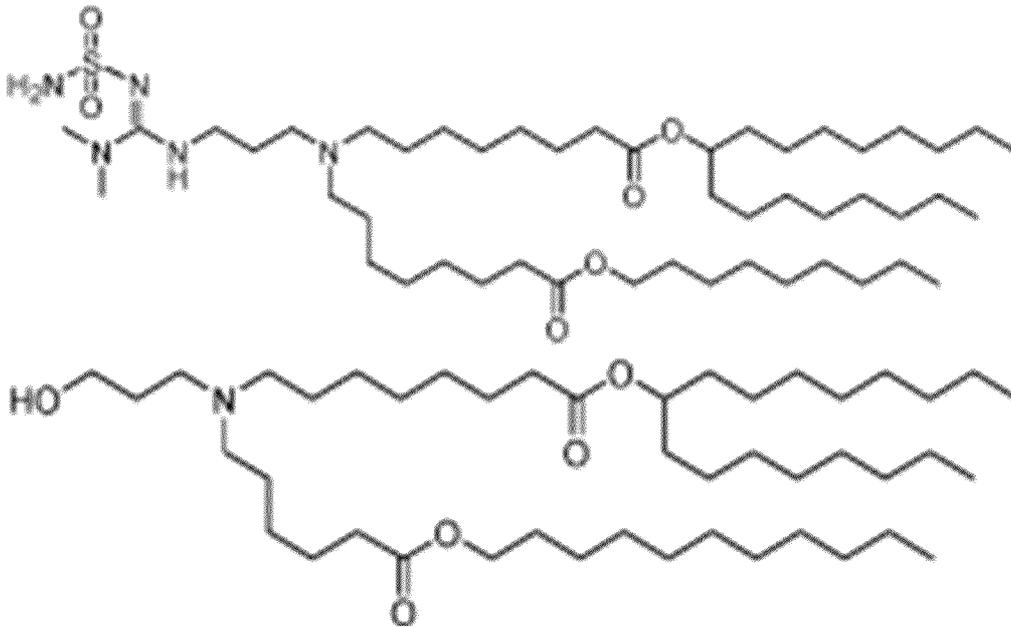










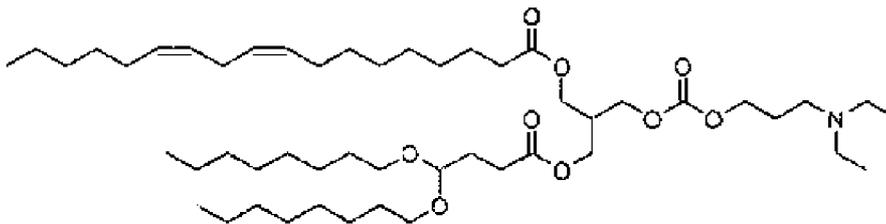


Аминолипиды

[0494] В некоторых вариантах осуществления переносчики композиций для доставки кольцевой РНК содержат аминоклипид. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой аминоклипид. В некоторых вариантах осуществления аминоклипид описан в международной заявке на патент PCT/US2018/053569.

[0495] В некоторых вариантах осуществления аминоклипид представляет собой липид E, представляющий собой (9Z, 12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил октадека-9, 12-диеноат.

[0496] Липид E может быть изображен как:



[0497] Липид E может быть синтезирован согласно WO2015/095340 (например стр. 84-86). В некоторых вариантах осуществления аминоклипид является эквивалентом липида E.

[0498] В некоторых вариантах осуществления аминоклипид представляет собой аналог липида E. В некоторых вариантах осуществления аналогом липида E является аналог-ацеталь липида E. В конкретных композициях переносчиков аналог-ацеталь представляет собой C₄-C₁₂ аналог-ацеталь. В некоторых вариантах осуществления аналог-ацеталь представляет собой C₅-C₁₂ аналог-ацеталь. В дополнительных вариантах осуществления аналог-ацеталь представляет собой C₅-C₁₀ аналог-ацеталь. В дополнительных вариантах осуществления аналог-ацеталь выбирают из C₄, C₅, C₆, C₇, C₉, C₁₀, C₁₁ и C₁₂ аналога-ацетала.

[0499] Аминолипиды и другие биоразлагаемые липиды, подходящие для использования в переносчиках, например, в липидных наночастицах, описанных в данном документе, являются биоразлагаемыми *in vivo*. Аминолипиды, описанные в данном документе, обладают низкой токсичностью (например животные модели переносят их без побочных эффектов в количествах, превышающих или равных 10 мг/кг). В некоторых вариантах осуществления переносчики, состоящие из аминоклипера, включают переносчики, в которых по меньшей мере 75% аминоклипера выводится из плазмы в пределах 8, 10, 12, 24 или 48 часов или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 дней.

[0500] Биоразлагаемые липиды включают, например, биоразлагаемые липиды WO2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086.

[0501] Клиренс липидов можно измерить с помощью способов, известных специалистам в данной области. См., например, Maier, M.A., et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Mol. Ther.* 2013, 21(8), 1570-78.

[0502] Композиции переносчиков, содержащие аминоклипер, могут приводить к увеличению скорости клиренса. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость клиренса липидов, например скорость, с которой липид выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость клиренса РНК, например скорость, с которой *circRNA* выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость, с которой переносчики выводятся из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость, с которой переносчики выводятся из ткани, такой как ткань печени или ткань селезенки. В некоторых вариантах осуществления высокая скорость клиренса приводит к профилю безопасности без существенных побочных эффектов. Аминоклиперы и биоразлагаемые липиды могут уменьшать накопление переносчика в кровотоке и в тканях. В некоторых вариантах осуществления уменьшение накопления переносчика в кровотоке и в тканях приводит к профилю безопасности без существенных побочных эффектов.

[0503] Липиды могут быть ионизируемыми в зависимости от pH среды, в которой они находятся. Например, в слегка кислой среде липид, такой как аминоклипер, может быть протонирован и, таким образом, нести положительный заряд. Наоборот, в слегка щелочной среде, такой как, например, кровь, где pH составляет примерно 7,35, липид, такой как аминоклипер, может не быть протонирован и, таким образом, не нести заряда.

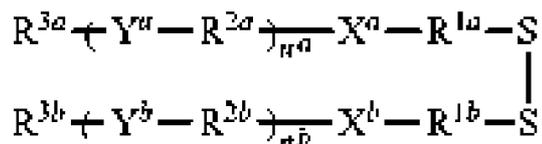
[0504] Способность липида нести заряд связана с его внутренней pKa. В некоторых вариантах осуществления каждый из аминоклиперов согласно настоящему изобретению независимо может иметь pKa в диапазоне от примерно 5,1 до примерно 7,4. В некоторых вариантах осуществления каждый из биодоступных липидов согласно настоящему изобретению может независимо иметь pKa в диапазоне от примерно 5,1 до примерно 7,4. Например, каждый из аминоклиперов согласно настоящему изобретению независимо может

иметь рКа в диапазоне от примерно 5,8 до примерно 6,5. Липиды с рКа в диапазоне от примерно 5,1 до примерно 7,4 эффективны для доставки груза *in vivo*, например, в печень. Кроме того, было обнаружено, что липиды с рКа в диапазоне от примерно 5,3 до примерно 6,4 эффективны для доставки *in vivo*, например, в опухоли. См., например, WO 2014/136086.

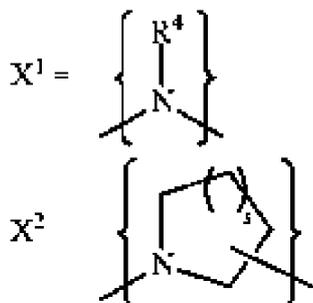
Липиды, содержащие дисульфидную связь

[0505] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид описан в патенте США 9708628.

[0506] В настоящем изобретении представлен липид, представленный структурой (XXII):



[0507] В структуре (XXII), X^a и X^b каждый независимо представляет X^1 или X^2 , показанные ниже.



[0508] R^4 в X^1 представляет алкильную группу, имеющую 1-6 атомов углерода, которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими. Алкильная группа предпочтительно имеет углеродное число 1-3. Конкретными примерами алкильной группы, имеющей 1-6 атомов углерода, является метильная группа, этильная группа, пропильная группа, изопропильная группа, n-бутил группа, втор-бутильная группа, изобутильная группа, трет-бутильная группа, пентильная группа, изопентильная группа, неопентильная группа, t-пентильная группа, 1,2-диметилпропильная группа, 2-метилбутильная группа, 2-метилпентильная группа, 3-метилпентильная группа, 2,2-диметилбутильная группа, 2,3-диметилбутильная группа, циклогексильная группа и тому подобное. R^4 представляет собой предпочтительно метильную группу, этильную группу, пропильную группу или изопропильную группу, наиболее предпочтительно метильную группу.

[0509] s в X^2 составляет 1 или 2. Когда s составляет 1, X^2 представляет собой пирролидиновую группу, а когда s составляет 2, X^2 представляет собой пиперидиновую группу. s предпочтительно составляет 2. Несмотря на то, что направление связывания X^2 не ограничено, атом азота в X^2 предпочтительно связывается с R^{1a} и R^{1b} .

[0510] X^a может быть таким же как X^b или отличаться от него, а X^a предпочтительно представляет собой ту же группу, что и X^b .

[0511] n^a и n^b каждый независимо составляет 0 или 1, предпочтительно 1. Когда n^a

составляет 1, R^{3a} связывается с X^a через Y^a и R^{2a} , а когда n^a составляет 0, берут структуру $R^{3a}-X^a-R^{1a}-S-$. Аналогично, когда n^b составляет 1, R^{3b} связывается с X^b через Y^b и R^{2b} , а когда n^b составляет 0, берут структуру $R^{3b}-X^b-R^{1b}-S-$.

[0512] n^a может быть таким же как n^b или отличаться от него, а n^a предпочтительно такой же как n^b .

[0513] R^{1a} и R^{1b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода, которая может быть линейной или разветвленной, предпочтительно линейной. Конкретные примеры алкиленовой группы, имеющей 1-6 атомов углерода, включают метиленовую группу, этиленовую группу, триметиленовую группу, изопропиленовую группу, тетраметиленовую группу, изобутиленовую группу, пентаметиленовую группу, неопентиленовую группу и тому подобное. R^{1a} и R^{1b} каждый представляет предпочтительно метиленовую группу, этиленовую группу, триметиленовую группу, изопропиленовую группу или тетраметиленовую группу, наиболее предпочтительно этиленовую группу.

[0514] R^{1a} может быть таким же как R^{1b} или отличаться от него, а R^{1a} предпочтительно представляет собой ту же группу, что и R^{1b} .

[0515] R^{2a} и R^{2b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода, которая может быть линейной или разветвленной, предпочтительно линейной. Примеры алкиленовой группы, имеющей 1-6 атомов углерода, включают группы, указанные в качестве примеров алкиленовой группы, имеющей 1-6 атомов углерода, для R^{1a} или R^{1b} . R^{2a} и R^{2b} каждый представляет предпочтительно метиленовую группу, этиленовую группу, триметиленовую группу, изопропиленовую группу или тетраметиленовую группу.

[0516] Когда X^a и X^b каждый представляет X^1 , R^{2a} и R^{2b} предпочтительно представляют триметиленовые группы. Когда X^a и X^b каждый представляет X^2 , R^{2a} и R^{2b} предпочтительно представляют этиленовые группы.

[0517] R^{2a} может быть таким же как R^{2b} или отличаться от него, а R^{2a} предпочтительно представляет собой ту же группу, что и R^{2b} .

[0518] Y^a и Y^b каждый независимо представляет сложноэфирную связь, амидную связь, карбаматную связь, эфирную связь или мочевиновую связь, предпочтительно сложноэфирную связь, амидную связь или карбаматную связь, наиболее предпочтительно сложноэфирную связь. Несмотря на то, что направление связывания Y^a и Y^b не ограничено, когда Y^a представляет сложноэфирную связь, предпочтительной является структура $R^{3a}-CO-O-R^{2a}-$, а когда Y^b представляет сложноэфирную связь, предпочтительной является структура $R^{3b}-CO-O-R^{2b}-$.

[0519] Y^a может быть таким же как или отличаться от Y^b , а Y^a предпочтительно представляет собой ту же группу, что и Y^b .

[0520] R^{3a} и R^{3b} каждый независимо представляет остаток стерола, остаток жирорастворимого витамина или алифатическую углеводородную группу, содержащую 12-22 атома углерода, предпочтительно остаток жирорастворимого витамина или

алифатическую углеводородную группу, содержащую 12-22 атома углерода, наиболее предпочтительно остаток жирорастворимого витамина.

[0521] Примеры остатка стерола включают холестерильную группу (остаток холестерина), холестерильную группу (остаток холестеранола), стигмастерильную группу (остаток стигмастерола), β -ситостерильную группу (остаток β -ситостерола), ланостерильную группу (остаток ланостерола) и эргостерильную группу (остаток эргостерола) и тому подобное. Остаток стерола предпочтительно представляет собой холестерильную группу или холестерильную группу.

[0522] В качестве остатка жирорастворимого витамина можно использовать остаток, полученный из жирорастворимого витамина, а также остаток, полученный из производного, полученного с помощью соответствующего преобразования гидроксильной группы, альдегида или карбоновой кислоты, которая является функциональной группой в жирорастворимом витамине, в другую реакционноспособную функциональную группу. Что касается жирорастворимого витамина, имеющего гидроксильную группу, например, гидроксильную группу можно превратить в карбоновую кислоту путем взаимодействия с ангидридом янтарной кислоты, ангидридом глутаровой кислоты и тому подобное. Примеры жирорастворимого витамина включают ретиновую кислоту, ретинол, ретиналь, эргостерол, 7-дегидрохолестерол, кальциферол, холекальциферол, дигидроэргокальциферол, дигидротрахистерол, токоферол, токотриенол и тому подобное. Предпочтительные примеры жирорастворимого витамина включают ретиновую кислоту и токоферол.

[0523] Алифатическая углеводородная группа, содержащая 12-22 атома углерода, может быть линейной или разветвленной, предпочтительно линейной. Алифатическая углеводородная группа может быть насыщенной или ненасыщенной. В случае ненасыщенной алифатической углеводородной группы алифатическая углеводородная группа обычно содержит 1-6, предпочтительно 1-3, более предпочтительно 1-2 ненасыщенных связи. Хотя ненасыщенная связь включает двойную связь углерод-углерод и тройную связь углерод-углерод, она предпочтительно представляет собой двойную связь углерод-углерод. Алифатическая углеводородная группа имеет число атомов углерода предпочтительно 12-18, наиболее предпочтительно 13-17. Хотя алифатическая углеводородная группа включает алкильную группу, алкенильную группу, алкинильную группу и тому подобное, она предпочтительно представляет собой алкильную группу или алкенильную группу. Конкретные примеры алифатической углеводородной группы, содержащей 12-22 атома углерода, включают додецильную группу, тридецильную группу, тетрадецильную группу, пентадецильную группу, гексадецильную группу, гептадецильную группу, октадецильную группу, нонадецильную группу, икозильную группу, геникозильную группу, докозильную группу, додеценильную группу, тридеценильную группу, тетрадеценильную группу, пентадеценильную группу, гексадеценильную группу, гептадеценильную группу, октадеценильную группу, нонадеценильную группу, икозенильную группу, геникозенильную группу, докозенильную

группу, декадиенильную группу, тридекадиенильную группу, тетрадекадиенильную группу, пентадекадиенильную группу, гексадекадиенильную группу, гептадекадиенильную группу, октадекадиенильную группу, нонадекадиенильную группу, икосадиенильную группу, геникосадиенильную группу, докозадиенильную группу, октадекатриенильную группу, икосатриенильную группу, икозатетраенильную группу, икозапентаенильную группу, докозагексаенильную группу, изостеарильную группу и тому подобное Алифатическая углеводородную группу, содержащая 12-22 атома углерода, предпочтительно представляет собой тридецильную группу, тетрадецильную группу, гептадецильную группу, октадецильную группу, гептадецильную группу или октадекадиенильную группу, особенно предпочтительно тридецильную группу, гептадецильную группу или гептадекадиенильную группу.

[0524] В одном варианте осуществления используют алифатическую углеводородную группу, содержащую 12-22 атома углерода, которая получена из жирной кислоты, алифатического спирта или алифатического амина. Когда R^{3a} (или R^{3b}) получают из жирной кислоты, Y^a (или Y^b) представляет собой сложноэфирную связь или амидную связь, и в Y^a (или Y^b) находится карбонильный углерод, происходящий из жирной кислоты. Например, при использовании линолевой кислоты R^{3a} (или R^{3b}) представляет собой гептадекадиенильную группу.

[0525] R^{3a} может быть таким же как R^{3b} или отличаться от него, а R^{3a} предпочтительно представляет собой ту же группу, что и R^{3b} .

[0526] В одном варианте осуществления X^a такой же как X^b , n^a такой же как n^b , R^{1a} такой же как R^{1b} , R^{2a} такой же как R^{2b} , R^{3a} такой же как R^{3b} , а Y^a такой же как Y^b .

[0527] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый независимо представляет X^1 ,

R^4 представляет собой алкильную группу, имеющую 1-3 атома углерода, n^a и n^b каждый составляет 1,

R^{1a} и R^{1b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

R^{2a} и R^{2b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

Y^a и Y^b каждый представляет сложноэфирную связь или амидную связь, а

R^{3a} и R^{3b} каждый независимо представляет алифатическую углеводородную группу, содержащую 12-22 атома углерода.

[0528] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый представляет X^1 ,

R^4 представляет собой алкильную группу, имеющую 1-3 атома углерода, n^a и n^b каждый составляет 1,

R^{1a} и R^{1b} каждый представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

R^{2a} и R^{2b} каждый представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

Y^a и Y^b каждый представляет сложноэфирную связь или амидную связь,

R^{3a} и R^{3b} каждый представляет алифатическую углеводородную группу, содержащую 12-22 атома углерода,

X^a такой же как X^b ,

R^{1a} такой же как R^{1b} ,

R^{2a} такой же как R^{2b} , а

R^{3a} такой же как R^{3b} .

[0529] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый представляет X^1 ,

R^4 представляет собой метильную группу, n^a и n^b каждый составляет 1,

R^{1a} и R^{1b} каждый представляет этиленовую группу,

R^{2a} и R^{2b} каждый представляет триметиленовую группу,

Y^a и Y^b каждый представляет -CO-O-, а

R^{3a} и R^{3b} каждый независимо представляет алкильную группу или алкенильную группу, имеющую 13-17 атомов углерода.

[0530] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый представляет X^1 ,

R^4 представляет собой метильную группу, n^a и n^b каждый составляет 1,

R^{1a} и R^{1b} каждый представляет этиленовую группу,

R^{2a} и R^{2b} каждый представляет триметиленовую группу,

Y^a и Y^b каждый представляет -CO-O-,

R^{3a} и R^{3b} каждый представляет алкильную группу или алкенильную группу, имеющую 13-17 атомов углерода и

R^{3a} такой же как R^{3b} .

[0531] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый независимо представляет X^1 ,

R^4 представляет собой алкильную группу, имеющую 1-3 атома углерода, n^a и n^b каждый составляет 1,

R^{1a} и R^{1b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

R^{2a} и R^{2b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

Y^a и Y^b каждый представляет сложноэфирную связь или амидную связь, а

R^{3a} и R^{3b} каждый независимо представляет остаток жирорастворимого витамина (например остаток ретиноевой кислоты, остаток токоферола).

[0532] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый представляет X^1 ,

R^4 представляет собой алкильную группу, имеющую 1-3 атома углерода, n^a и n^b каждый составляет 1,

R^{1a} и R^{1b} каждый представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

R^{2a} и R^{2b} каждый представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

Y^a и Y^b каждый представляет сложноэфирную связь или амидную связь,
 R^{3a} и R^{3b} каждый представляет остаток жирорастворимого витамина (например
остаток ретиноевой кислоты, остаток токоферола),

X^a такой же как X^b ,

R^{1a} такой же как R^{1b} ,

R^{2a} такой же как R^{2b} , а

R^{3a} такой же как R^{3b} .

[0533] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый представляет X^1 ,

R^4 представляет собой метильную группу, n^a и n^b каждый составляет 1,

R^{1a} и R^{1b} каждый представляет этиленовую группу,

R^{2a} и R^{2b} каждый представляет триметиленовую группу,

Y^a и Y^b каждый представляет $-CO-O-$, а

R^{3a} и R^{3b} каждый независимо представляет остаток жирорастворимого витамина
(например остаток ретиноевой кислоты, остаток токоферола).

[0534] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый представляет X^1 ,

R^4 представляет собой метильную группу, n^a и n^b каждый составляет 1,

R^{1a} и R^{1b} каждый представляет этиленовую группу,

R^{2a} и R^{2b} каждый представляет триметиленовую группу,

Y^a и Y^b каждый представляет $-CO-O-$,

R^{3a} и R^{3b} каждый представляет остаток жирорастворимого витамина (например
остаток ретиноевой кислоты, остаток токоферола) и

R^{3a} такой же как R^{3b} .

[0535] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый независимо представляет X^2 ,

t составляет 2,

R^{1a} и R^{1b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6
атомов углерода,

R^{2a} и R^{2b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6
атомов углерода,

Y^a и Y^b каждый представляет сложноэфирную связь, а

R^{3a} и R^{3b} каждый независимо представляет остаток жирорастворимого витамина
(например остаток ретиноевой кислоты, остаток токоферола) или алифатическую
углеводородную группу, содержащую 12-22 атома углерода (например алкильную группу,
имеющую 12-22 атома углерода).

[0536] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый независимо представляет X^2 ,

t составляет 2,

R^{1a} и R^{1b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6

атомов углерода,

R^{2a} и R^{2b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

Y^a и Y^b каждый представляет сложноэфирную связь,

R^{3a} и R^{3b} каждый независимо представляет остаток жирорастворимого витамина (например остаток ретиноевой кислоты, остаток токоферола) или алифатическую углеводородную группу, содержащую 12-22 атома углерода (например алкильную группу, имеющую 12-22 атома углерода),

X^a такой же как X^b ,

R^{1a} такой же как R^{1b} ,

R^{2a} такой же как R^{2b} , а

R^{3a} такой же как R^{3b} .

[0537] В одном варианте осуществления

X^a и X^b каждый независимо представляет X^2 ,

t составляет 2,

R^{1a} и R^{1b} каждый представляет этиленовую группу,

R^{2a} и R^{2b} каждый независимо представляет алкиленовую группу, имеющую 1-6 атомов углерода,

Y^a и Y^b каждый представляет сложноэфирную связь,

R^{3a} и R^{3b} каждый независимо представляет остаток жирорастворимого витамина (например остаток ретиноевой кислоты, остаток токоферола) или алифатическую углеводородную группу, содержащую 12-22 атома углерода (например алкильную группу, имеющую 12-22 атома углерода),

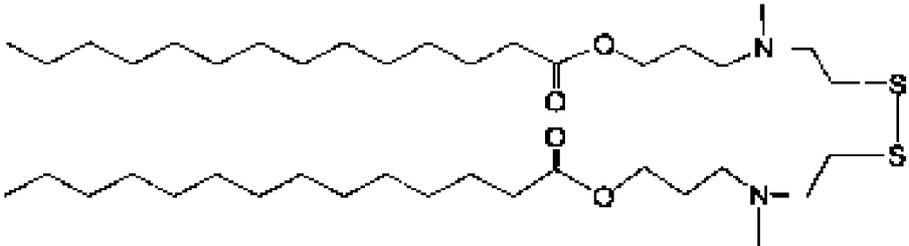
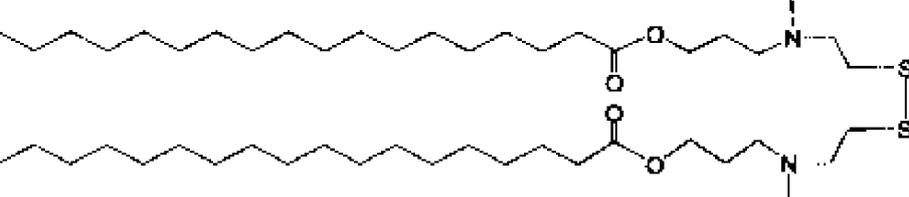
X^a такой же как X^b ,

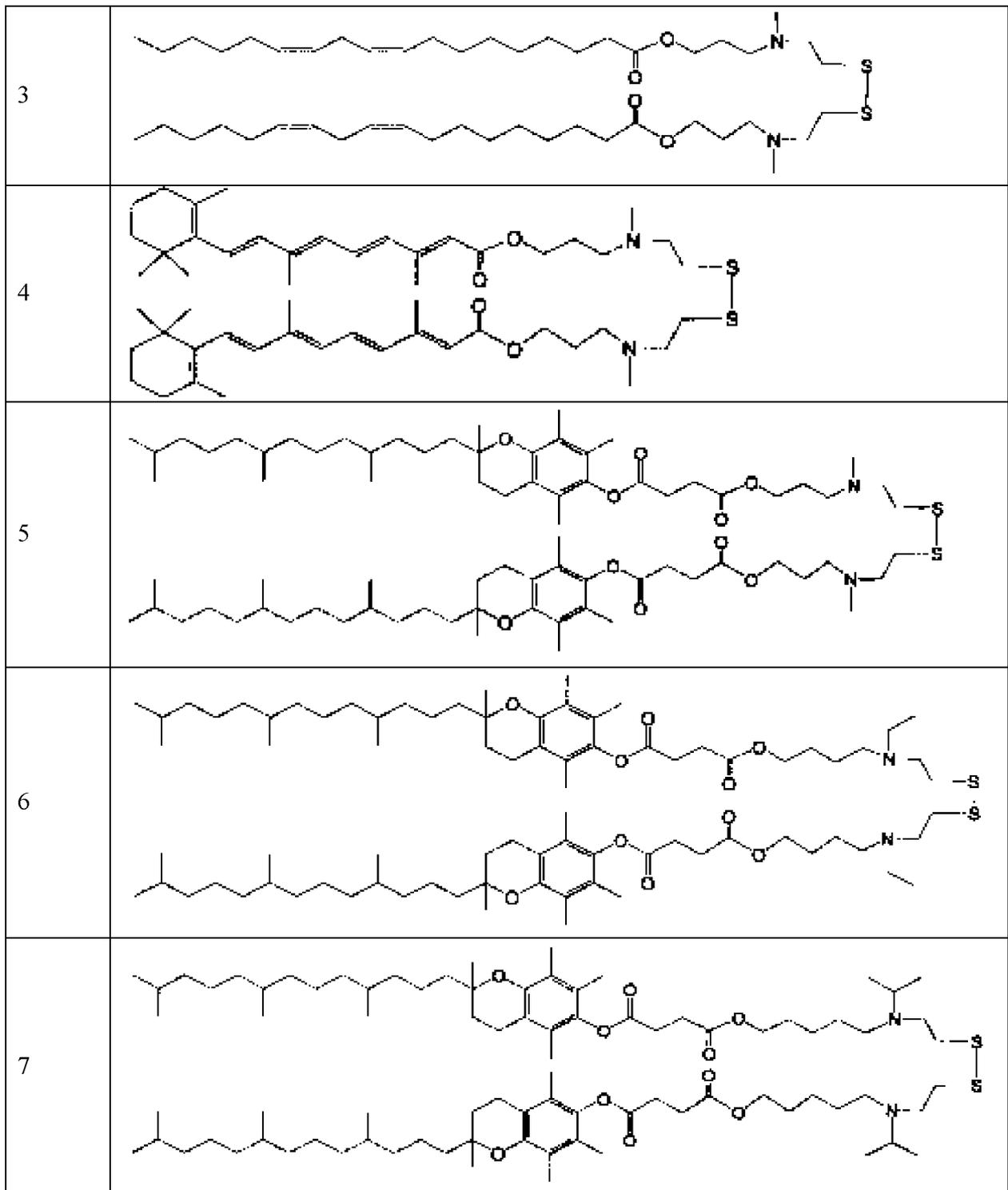
R^{2a} такой же как R^{2b} , а

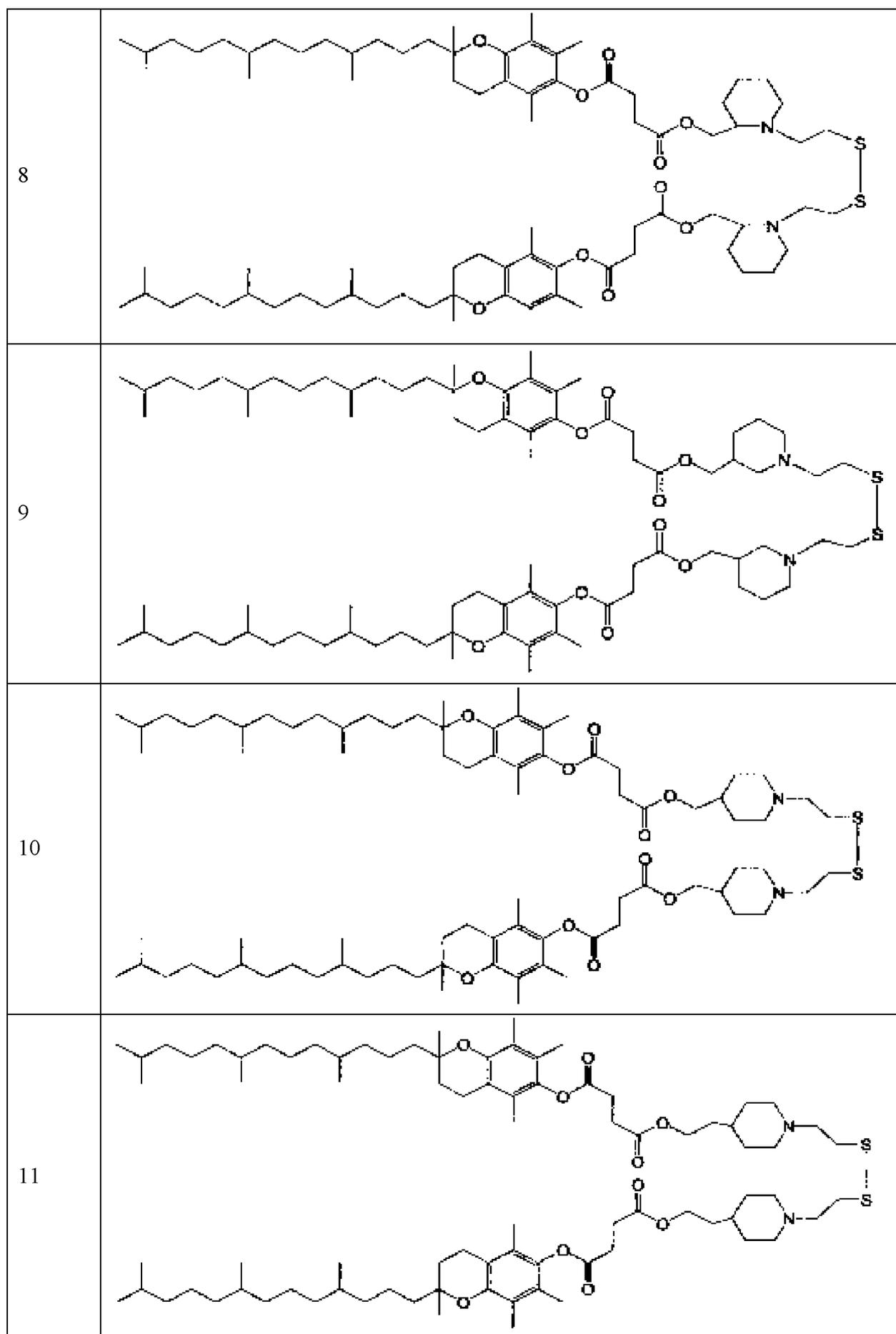
R^{3a} такой же как R^{3b} .

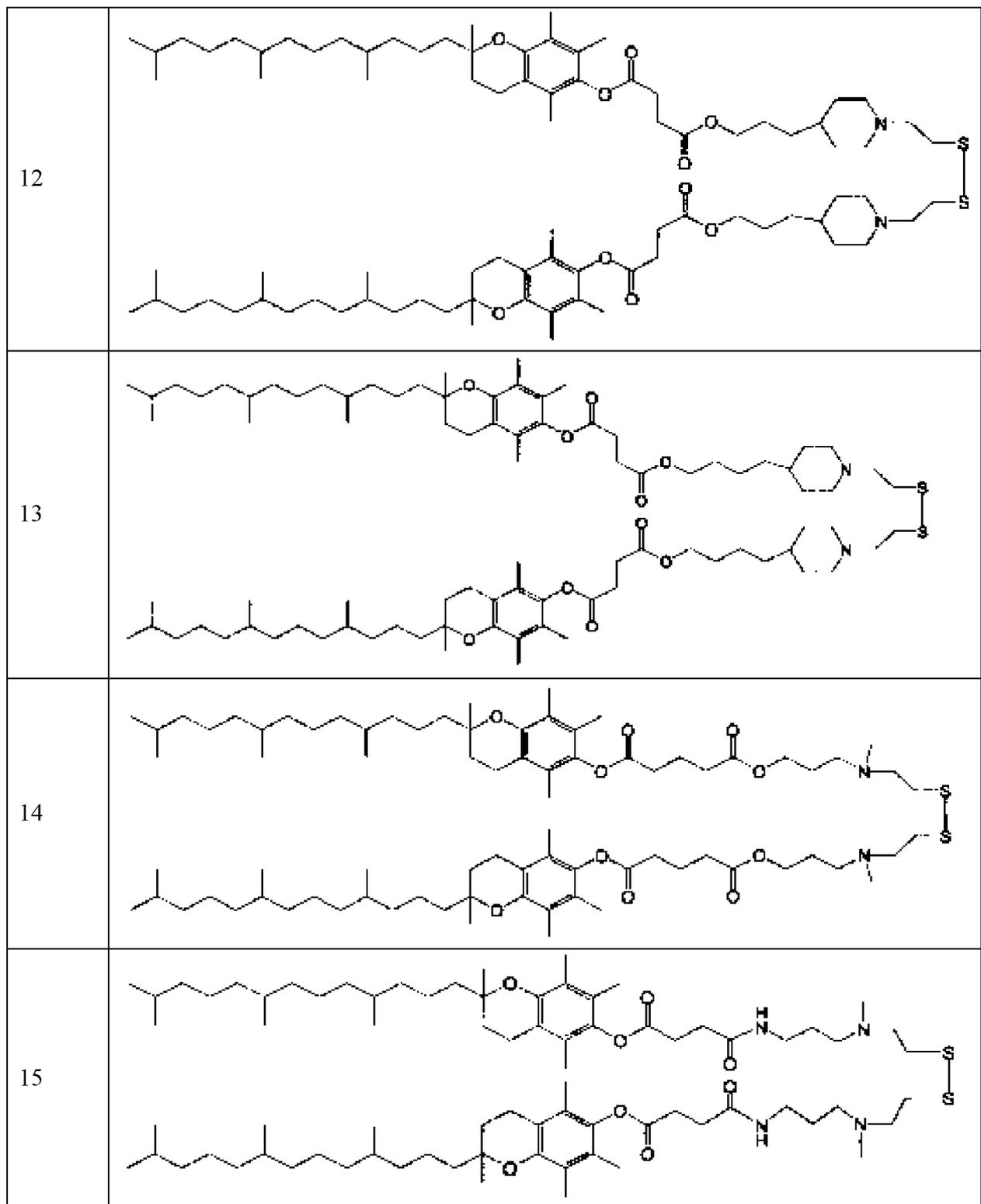
[0538] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид имеет одну из структур, приведенных в таблице 15b ниже.

Таблица 15b

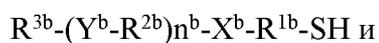
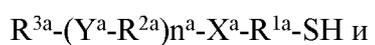
Номер	Структура
1	
2	







[0539] Липид согласно настоящему изобретению может иметь -S-S- (дисульфидную) связь. Способ получения такого соединения включает в себя, например, способ, включающий получение



подвергая их окислению (реакции сочетания) с получением соединения, содержащего -S-S-, способ, включающий последовательное связывание необходимых частей с соединением, содержащим связь -S-S- с итоговым получением соединения

согласно настоящему изобретению и тому подобное. Предпочтительным является последний способ.

[0540] Ниже показан конкретный пример последнего способа, который не следует рассматривать как ограничивающий.

[0541] Примеры исходного соединения включают связь -S-S-, содержащую двухконцевую карбоновую кислоту, двухконцевой карбоксилат, двухконцевой амин, двухконцевой изоцианат, двухконцевой спирт, двухконцевой спирт, имеющий уходящую группу, такую как MsO (мезилатная группа) и тому подобное, двухконцевой карбонат, имеющий уходящую группу, такую как pNP (п-нитрофенилкарбонатная группа) и тому подобное.

[0542] Например, когда получают соединение, содержащее X^1 или X^2 для X^a и X^b , две концевые функциональные группы соединения (1), содержащие связь -S-S-, взаимодействуют с группой -NH- в соединении (2) с группой -NH- и одной функциональной группой на конце, функциональная группа на конце в соединении (2), которая не участвует в реакции, взаимодействует с функциональной группой в соединении (3), содержащей R^3 , в результате чего может быть получено соединение согласно настоящему изобретению, содержащее связь -S-S-, R^{1a} и R^{1b} , X^a и X^b , R^{2a} и R^{2b} , Y^a и Y^b и R^{3a} и R^{3b} .

[0543] В реакции соединения (1) и соединения (2) в качестве катализатора можно использовать щелочной катализатор, такой как карбонат калия, карбонат натрия, трет-бутоксид калия и тому подобное, или реакцию можно проводить без катализатора. Предпочтительно в качестве катализатора используют карбонат калия или карбонат натрия.

[0544] Количество катализатора составляет 0,1-100 молярных эквивалентов, предпочтительно 0,1-20 молярных эквивалентов, более предпочтительно 0,1-5 молярных эквивалентов по отношению к соединению (1). Количество загружаемого соединения (2) составляет 1-50 молярных эквивалентов, предпочтительно 1-10 молярных эквивалентов по отношению к соединению (1).

[0545] Растворитель, используемый для реакции соединения (1) и соединения (2), конкретно не ограничен при условии, что он представляет собой растворитель или водный раствор, который не ингибирует реакцию. Например, можно указать этилацетат, дихлорметан, хлороформ, бензол, толуол и тому подобное. Среди них предпочтительными являются толуол и хлороформ.

[0546] Температура реакции составляет от -20 до 200°C, предпочтительно от 0 до 80°C, более предпочтительно от 20 до 50°C, и время реакции составляет 1-48 часов, предпочтительно 2-24 часа.

[0547] Когда продукт реакции соединения (1) и соединения (2) взаимодействует с соединением (3), можно использовать щелочной катализатор, такой как карбонат калия, карбонат натрия, t-бутоксид калия и тому подобное, или кислотный катализатор, такой как PTS (p-толуолсульфоновую кислоту), MSA (метансульфоновую кислоту) и тому подобное, подобно катализатору, используемому для реакции соединения (1) и соединения (2), или реакцию можно проводить без катализатора.

[0548] Кроме того, продукт реакции соединения (1) и соединения (2) может быть подвергнут непосредственному взаимодействию с соединением (3) с использованием конденсирующего средства, такого как DCC (дициклогексилкарбодиимид), DIC (диизопропилкарбодиимид), EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид) и тому подобное. Альтернативно, соединение (3) может быть обработано конденсирующим средством для однократного превращения в ангидрид и тому подобное, после чего оно подвергается взаимодействию с продуктом реакции соединения (1) и соединения (2).

[0549] Количество загружаемого соединения (3) составляет 1-50 молярных эквивалентов, предпочтительно 1-10 молярных эквивалентов по отношению к продукту реакции соединения (1) и соединения (2).

[0550] Используемый катализатор выбирают соответствующим образом в соответствии с функциональными группами, которые будут реагировать.

[0551] Количество катализатора составляет 0,05-100 молярных эквивалентов, предпочтительно 0,1-20 молярных эквивалентов, более предпочтительно 0,2-5 молярных эквивалентов по отношению к соединению (1).

[0552] Растворитель, используемый для реакции продукта реакции соединения (1) и соединения (2) с соединением (3), конкретно не ограничен при условии, что он представляет собой растворитель или водный раствор, который не ингибирует реакцию. Например, можно указать этилацетат, дихлорметан, хлороформ, бензол, толуол и тому подобное. Среди них предпочтительными являются толуол и хлороформ.

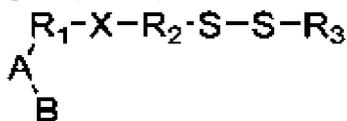
[0553] Температура реакции составляет от 0 до 200°C, предпочтительно от 0 до 120°C, более предпочтительно от 20 до 50°C, и время реакции составляет от 1 до 48 часов, предпочтительно от 2 до 24 часов.

[0554] Продукт реакции, полученный в результате вышеупомянутой реакции, может быть надлежащим образом очищен с помощью общего метода очистки, например, промывки водой, колоночной хроматографии на силикагеле, кристаллизации, перекристаллизации, жидкостной экстракции, переосаждения, ионообменной колоночной хроматографии и тому подобное.

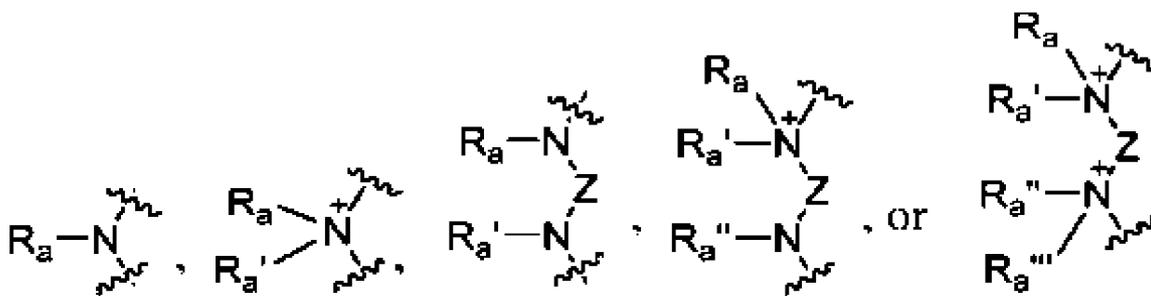
Структура XXIII липидов

[0555] В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид описан в патенте США 9765022.

[0556] В настоящем изобретении представлено соединение, отображаемое структурой (XXIII):



[0557] В структуре XXIII гидрофильной и необязательно положительно заряженной головной группой является



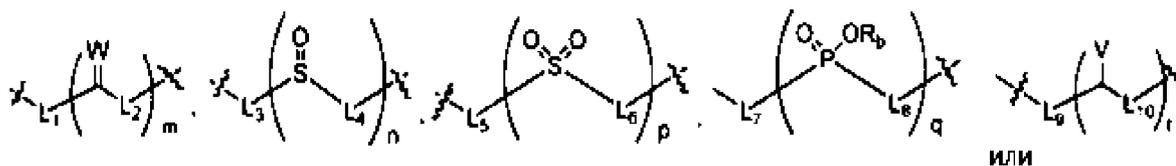
где каждый из R_a , $R_{a'}$, $R_{a''}$ и $R_{a'''}$ независимо, представляет H , C_1 - C_{20} одновалентный алифатический радикал, C_1 - C_{20} одновалентный гетероалифатический радикал, одновалентный арильный радикал или одновалентный гетероарильный радикал, а Z представляет собой C_1 - C_{20} двухвалентный алифатический радикал, C_1 - C_{20} двухвалентный гетероалифатический радикал, двухвалентный арильный радикал или двухвалентный гетероарильный радикал; V представляет собой C_1 - C_{24} одновалентный алифатический радикал, C_1 - C_{24} одновалентный гетероалифатический радикал, одновалентный арильный

радикал, одновалентный гетероарильный радикал, или $\text{---R}_4\text{---Y---R}_5\text{---S---S---R}_6$

каждый из R_1 и R_4 независимо представляет собой связь, C_1 - C_{10} двухвалентный алифатический радикал, C_1 - C_{10} двухвалентный гетероалифатический радикал, двухвалентный арильный радикал или двухвалентный гетероарильный радикал; каждый из R_2 и R_5 независимо представляет собой связь, C_1 - C_{20} двухвалентный алифатический радикал, C_1 - C_{20} двухвалентный гетероалифатический радикал, двухвалентный арильный радикал или двухвалентный гетероарильный радикал; каждый из R_3 и R_6 независимо представляет собой C_1 - C_{20} одновалентный алифатический радикал, C_1 - C_{20} одновалентный гетероалифатический радикал, одновалентный арильный радикал или одновалентный

гетероарильный радикал; каждый из $\text{---R}_2\text{---S---S---R}_3$ гидрофобная хвост и

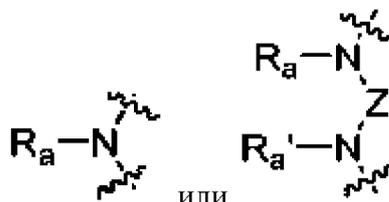
$\text{---R}_5\text{---S---S---R}_6$ также гидрофобный хвост имеет 8-24 атома углерода; и каждый из X , линкера и Y , также линкер независимо представляет собой



где каждый из m , n , p , q и t независимо, составляет 1-6; W представляет O , S или NR_c ; каждый из L_1 , L_3 , L_5 , L_7 и L_9 , непосредственно связанные с R_1 , R_2 , R_4 или R_5 , независимо представляет собой связь, O , S или NR_d ; каждый из L_2 , L_4 , L_6 , L_8 и L_{10}

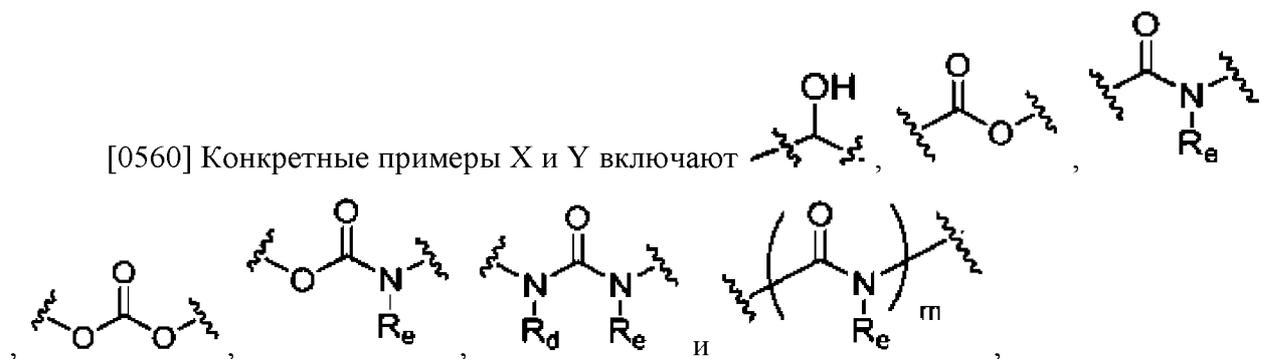
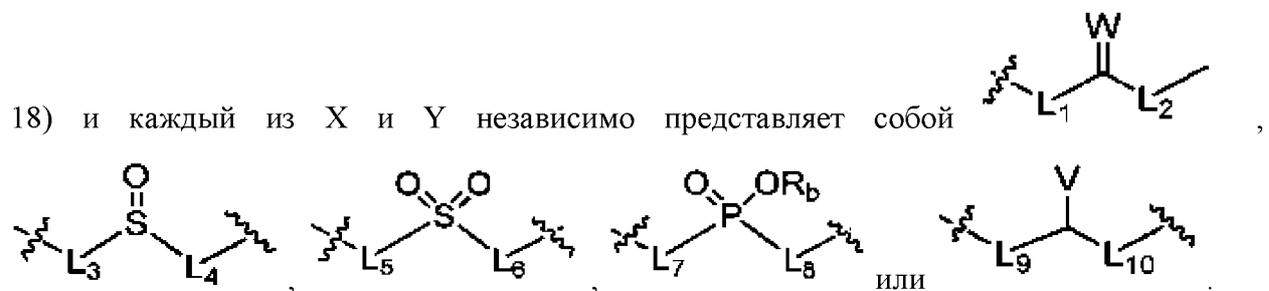
независимо представляет собой связь, O, S или NRe; V представляет ORf, SRg или NRhRi; и каждый из Rb, Rc, Rd, Re, Rf, Rg, Rh и Ri независимо представляет H, OH, C₁₋₁₀ оксалифатический радикал, C₁₋₁₀ одновалентный алифатический радикал, C₁₋₁₀ одновалентный гетероалифатический радикал, одновалентный арильный радикал или одновалентный гетероарильный радикал.

[0558] Подгруппа вышеописанных липидподобных соединений включает



соединения, в которых A представляет или , каждый из Ra и Ra' независимо представляет C₁₋₁₀ одновалентный алифатический радикал, C₁₋₁₀ одновалентный гетероалифатический радикал, одновалентный арильный радикал или одновалентный гетероарильный радикал; а Z представляет C₁₋₁₀ двухвалентный алифатический радикал, C₁₋₁₀ двухвалентный гетероалифатический радикал, двухвалентный арильный радикал или двухвалентный гетероарильный радикал.

[0559] Некоторые липидподобные соединения согласно этому изобретению содержат каждый из R₁ и R₄, независимо представляющий C₁₋₆ (например C₁₋₄) двухвалентный алифатический радикал или C₁₋₆ (например C₁₋₄), двухвалентный гетероалифатический радикал, общее углеродное число для R₂ и R₃ составляет 12-20 (например 14-18), общее углеродное число R₅ и R₆ также составляет 12-20 (например 14-

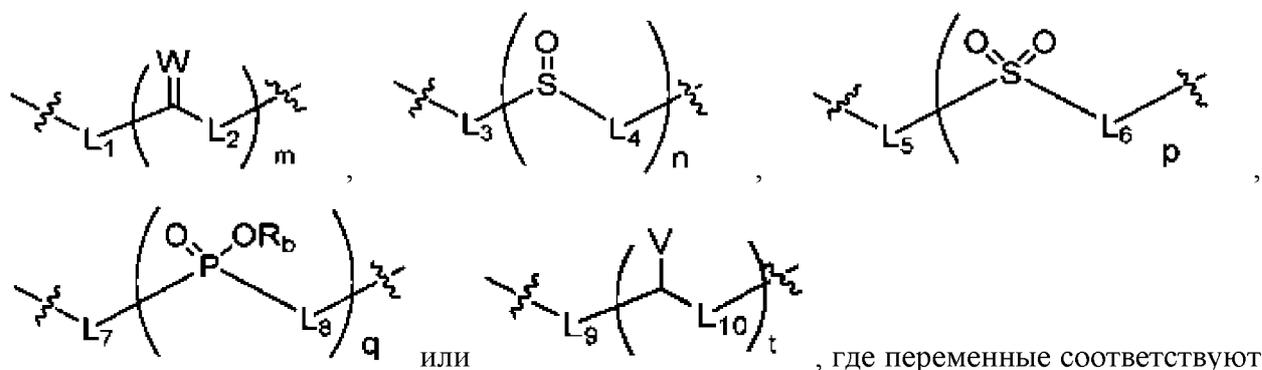


причем m составляет 2-6.

[0561] Еще в рамках данного изобретения имеется фармацевтическая композиция, содержащая наноконкомплекс, образованный из белка и биоразлагаемого соединения. В этой

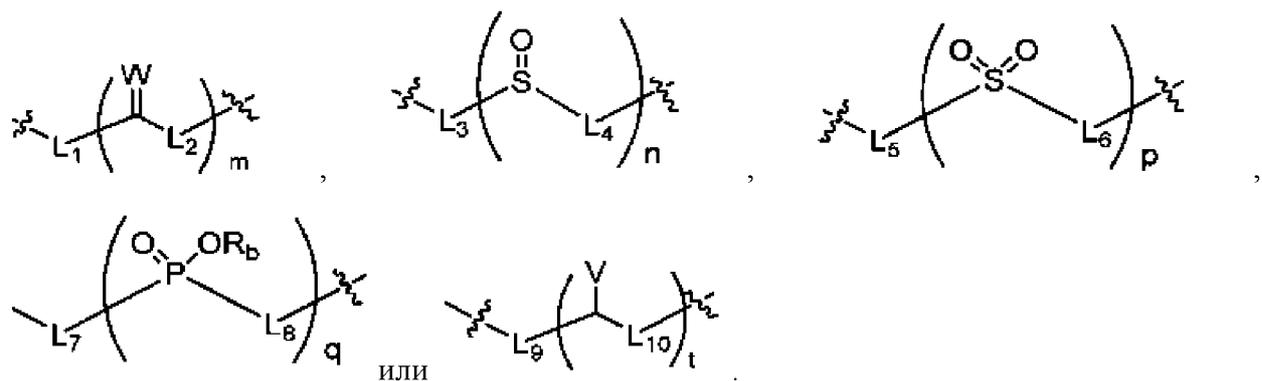
фармацевтической композиции наноконкомплекс имеет размер частиц 50-500 нм; биоразлагаемое соединение содержит дисульфидный гидрофобный фрагмент, гидрофильный фрагмент и линкер, соединяющий дисульфидный гидрофобный фрагмент и гидрофильный фрагмент; и белок связывается с биоразлагаемым соединением через нековалентное взаимодействие, ковалентную связь либо и то, и другое.

[0562] В некоторых вариантах осуществления дисульфидный гидрофобный фрагмент представляет собой гетероалифатический радикал, содержащий одну или несколько -S-S- групп и 8-24 атома углерода; гидрофильный фрагмент представляет собой алифатический или гетероалифатический радикал, содержащий одну или несколько гидрофильных групп и 1-20 атомов углерода, каждая из гидрофильных групп представляет амино, алкиламино, диалкиламино, триалкиламино, тетраалкиламмоний, гидроксиамино, гидроксил, карбоксил, карбоксилат, карбамат, карбамид, карбонат, фосфат, фосфит, сульфат, сульфит или тиосульфат; и линкер представляет O, S, Si, C₁-C₆ алкилен,



определению выше.

[0563] Конкретные примеры X и Y включают O, S, Si, C₁-C₆ алкилен,

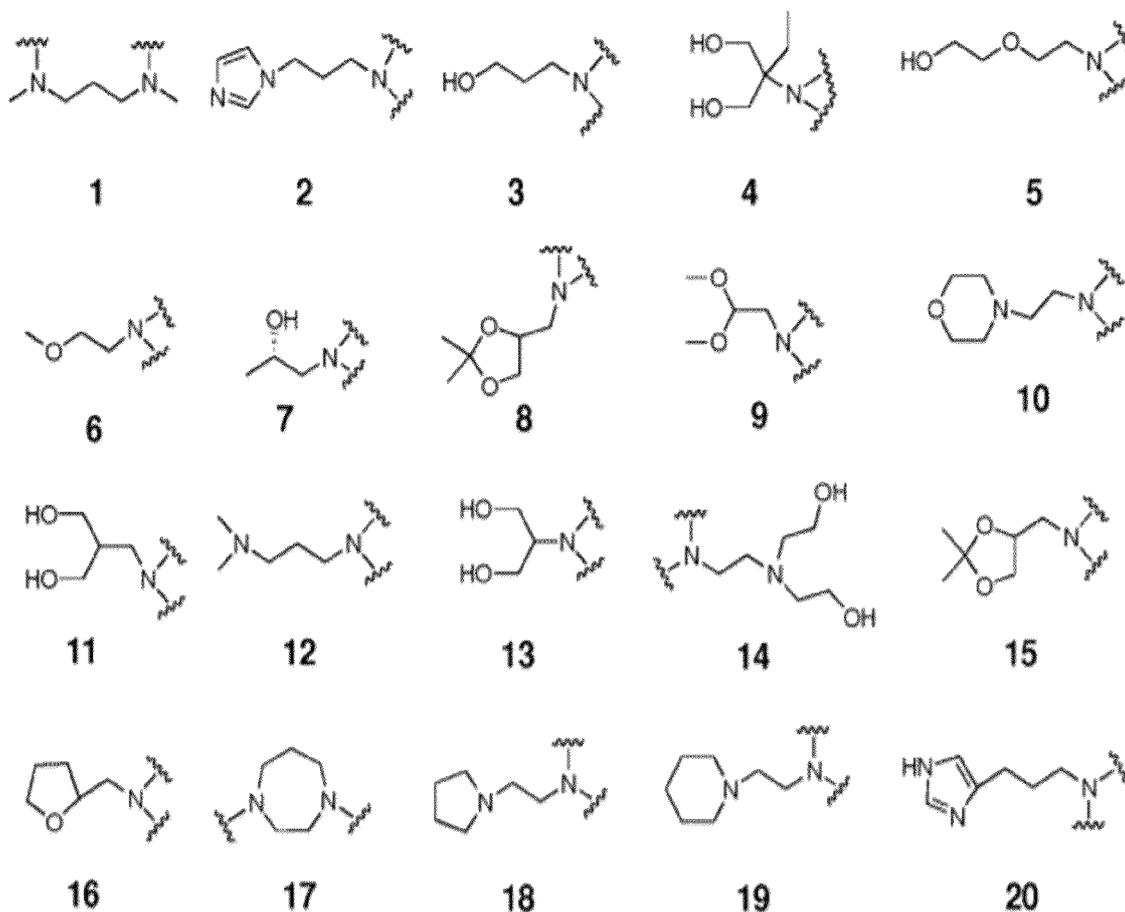


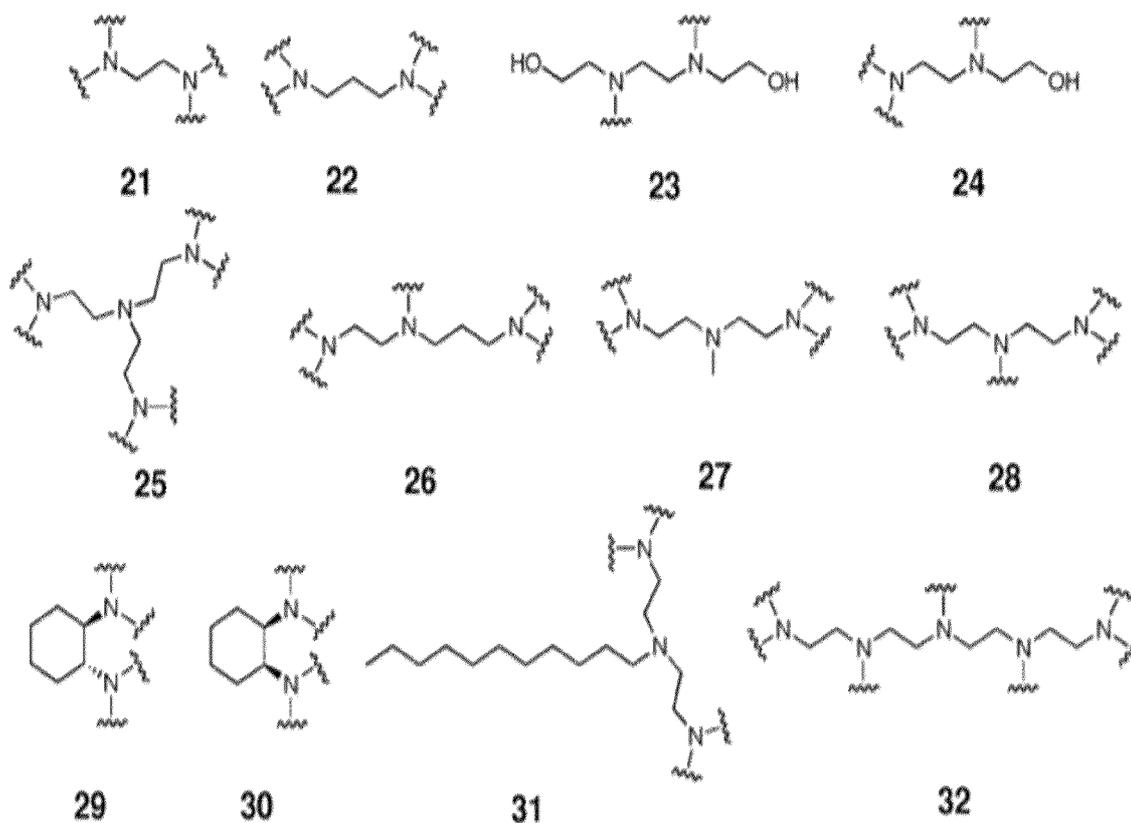
[0564] В некоторых вариантах осуществления липидподобное соединение согласно этому изобретению, как показано в структуре XXIII выше, включает в себя (i) гидрофильную головную группу, A; (ii) гидрофобный хвост, R₂-S-S-R₃; и (iii) линкер, X. Необязательно, эти соединения содержат второй гидрофобный хвост, R₅-S-S-R₆ и второй линкер, Y.

[0565] Гидрофильная головная группа со структурой XXIII содержит одну или несколько гидрофильных функциональных групп, например, гидроксил, карбонил,

карбоксил, amino, сульфогидрил, фосфат, амид, сложный эфир, эфир, карбамат, карбонат, карбамид и фосфодиэфир. Эти группы могут образовывать водородные связи и необязательно положительно или отрицательно заряжены.

[0566] Примеры гидрофильной головной группы включают:

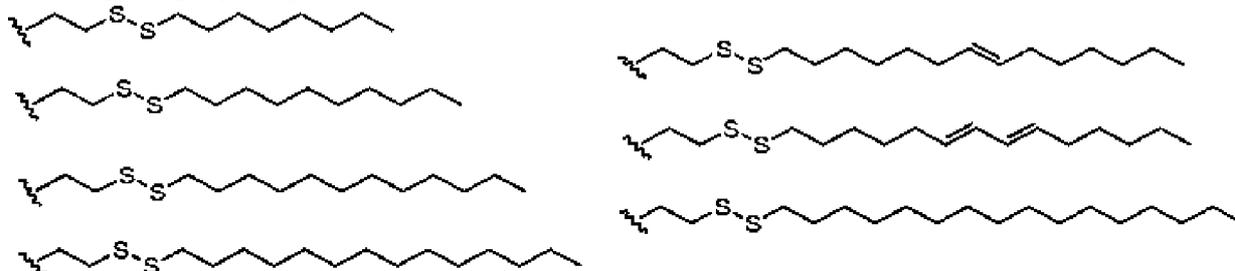




[0567] Другие примеры включают примеры, описанные в Akinc et al. *Nature Biotechnology*, 26, 561-69 (2008) и Mahon et al. Публикация заявки на патент США 2011/0293703.

[0568] Гидрофобный хвост со структурой XXIII представляет собой насыщенный или ненасыщенный, линейный или разветвленный, нециклический или циклический, ароматический или неароматический углеводородный фрагмент, содержащий дисульфидную связь и 8-24 атома углерода. Один или несколько атомов углерода могут быть заменены на гетероатом, такой как N, O, P, B, S, Si, Sb, Al, Sn, As, Se и Ge. Хвост необязательно замещен одной или несколькими группами, описанными выше. Липидподобные соединения, содержащие эту дисульфидную связь, могут быть биоразлагаемыми.

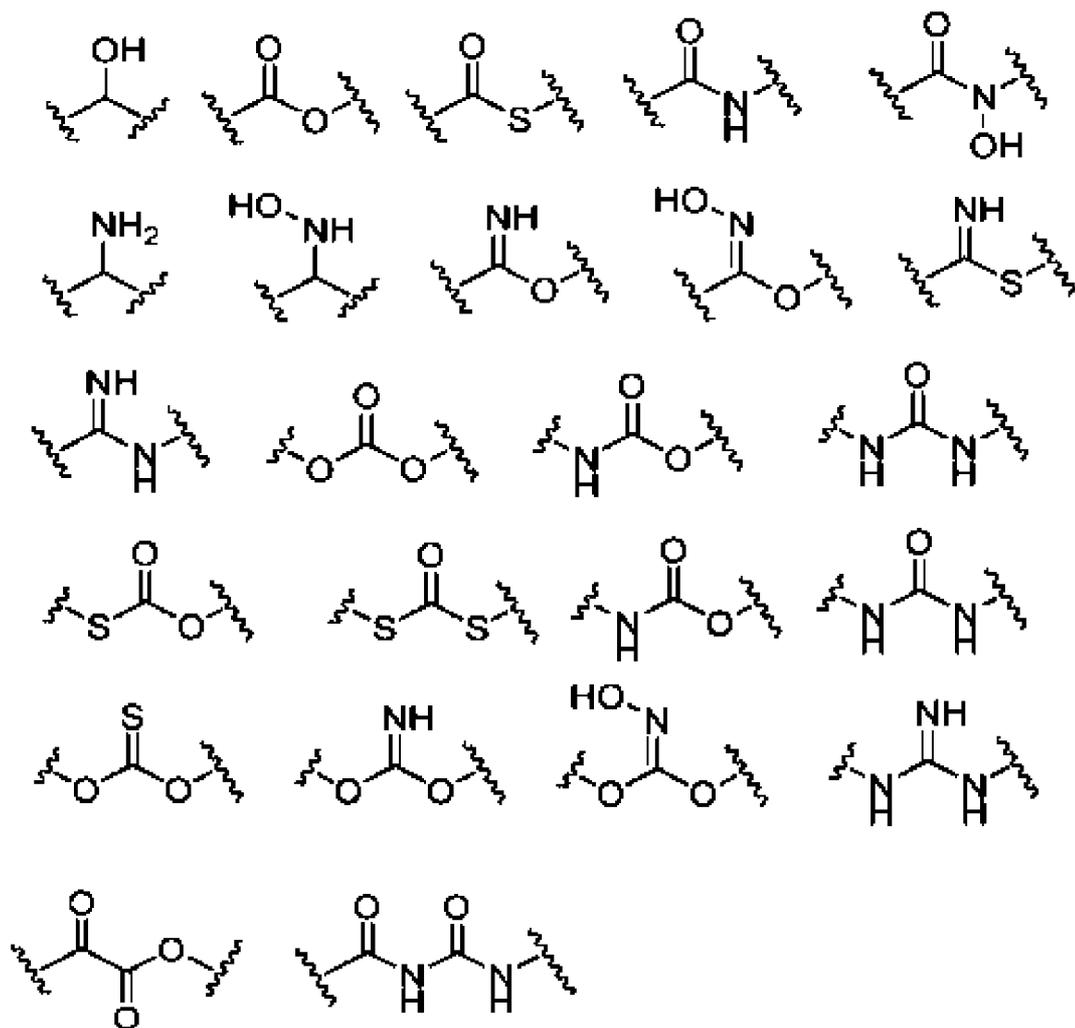
[0569] Примеры включают:



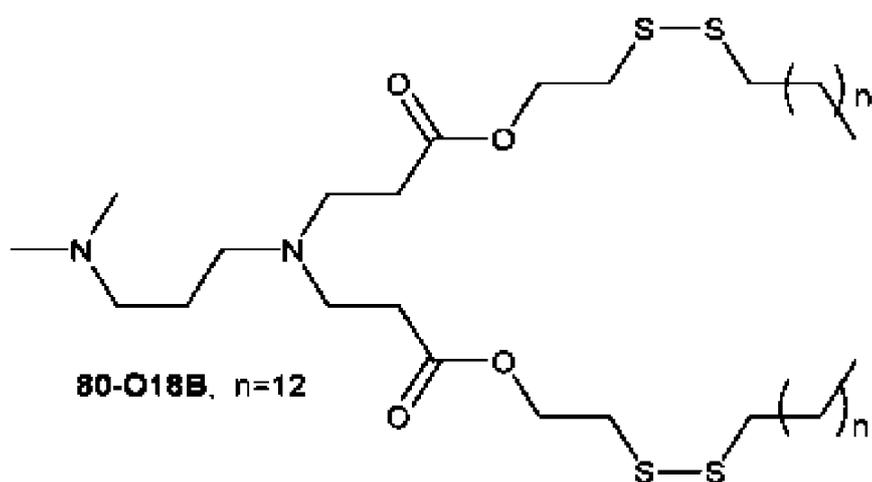
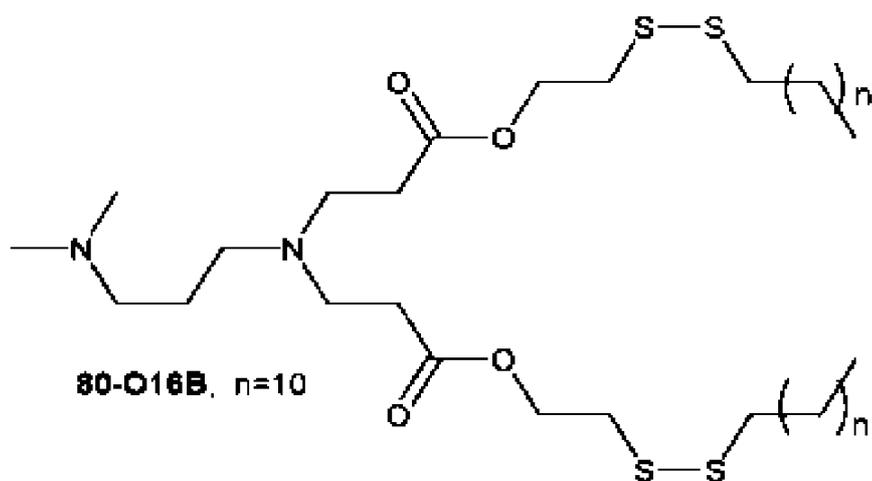
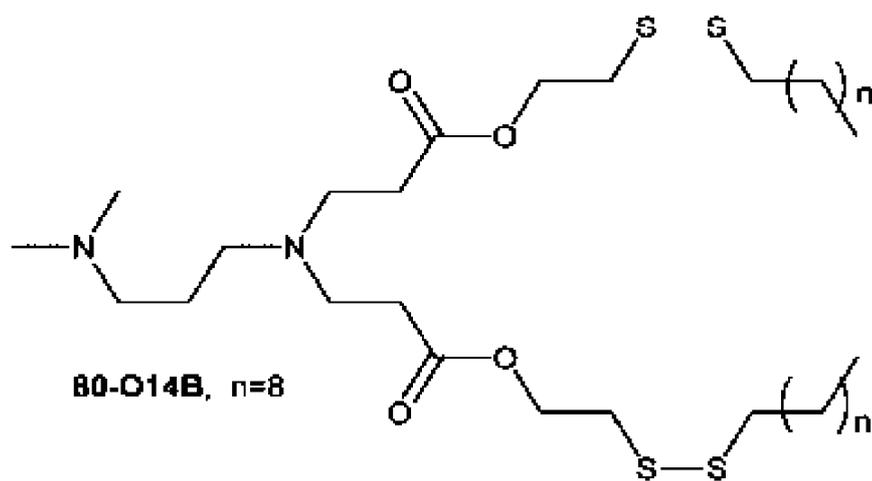
[0570] Линкер со структурой XXIII связывает гидрофильную головную группу и гидрофобный хвост. Линкером может быть любая химическая группа, гидрофильная или гидрофобная, полярная или неполярная, например, O, S, Si, amino, алкилен, сложный эфир,

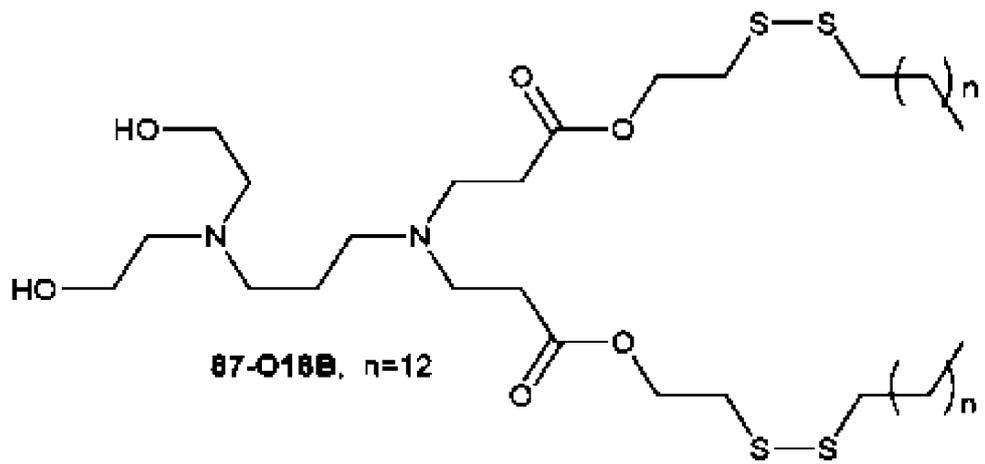
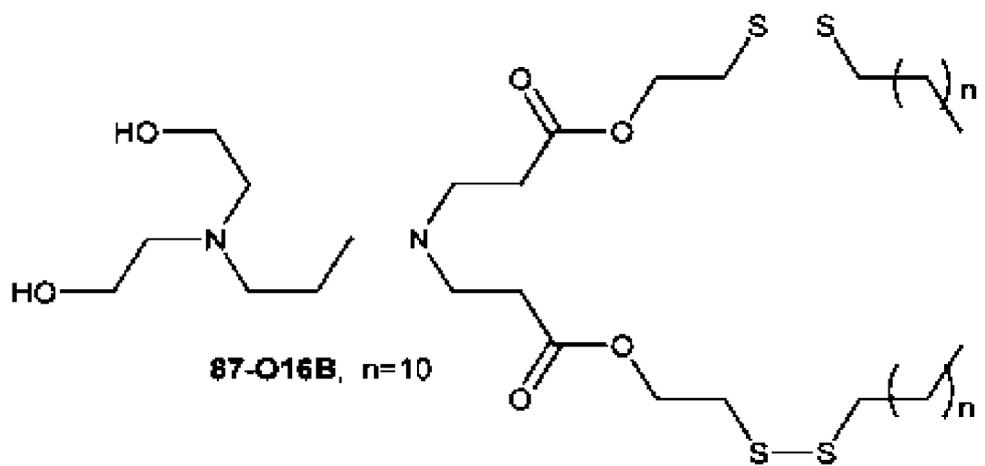
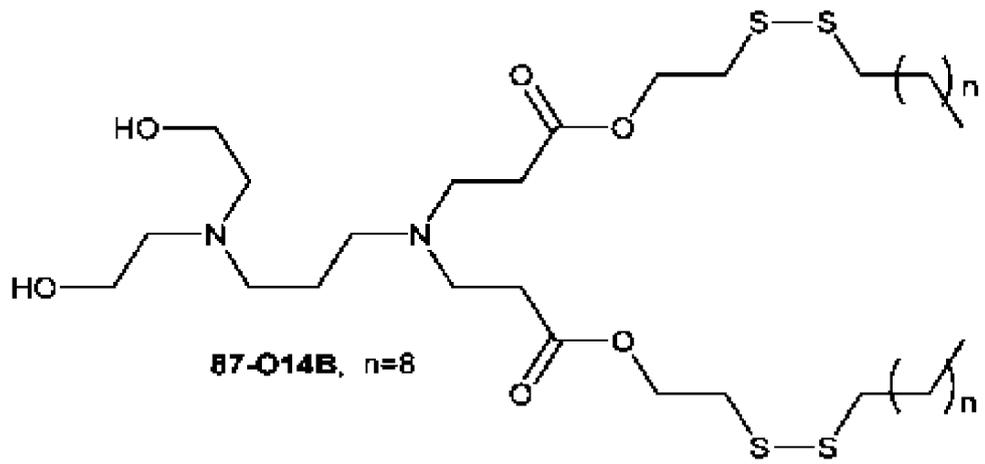
амид, карбамат, карбамид, карбонат, фосфат, фосфит, сульфат, сульфит и тиосульфат.

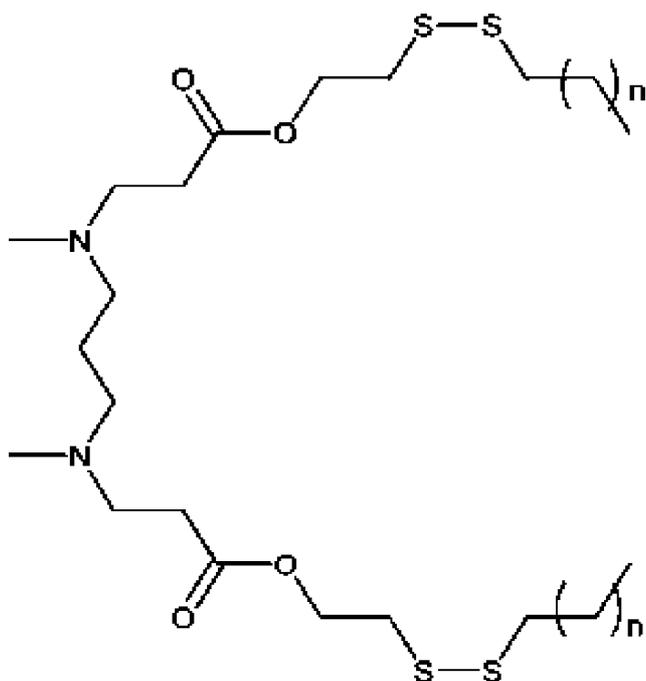
Примеры включают:



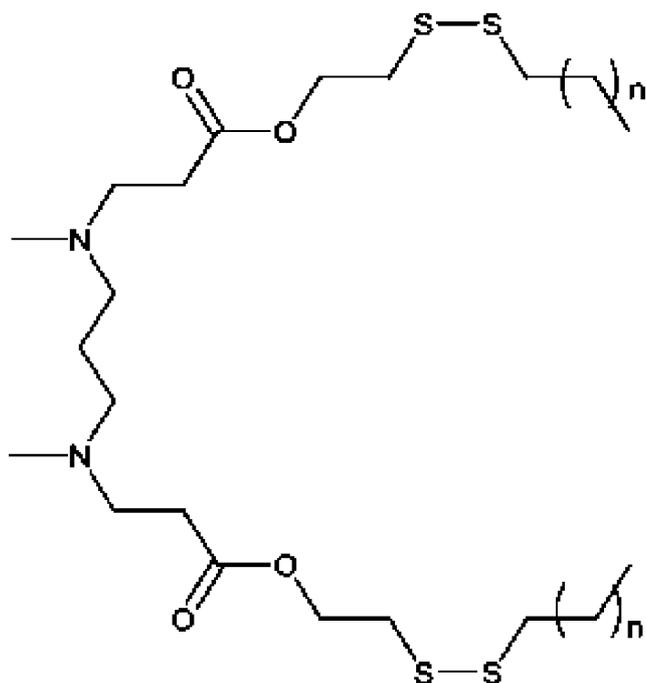
[0571] Ниже показаны иллюстративные липидподобные соединения согласно этому изобретению:





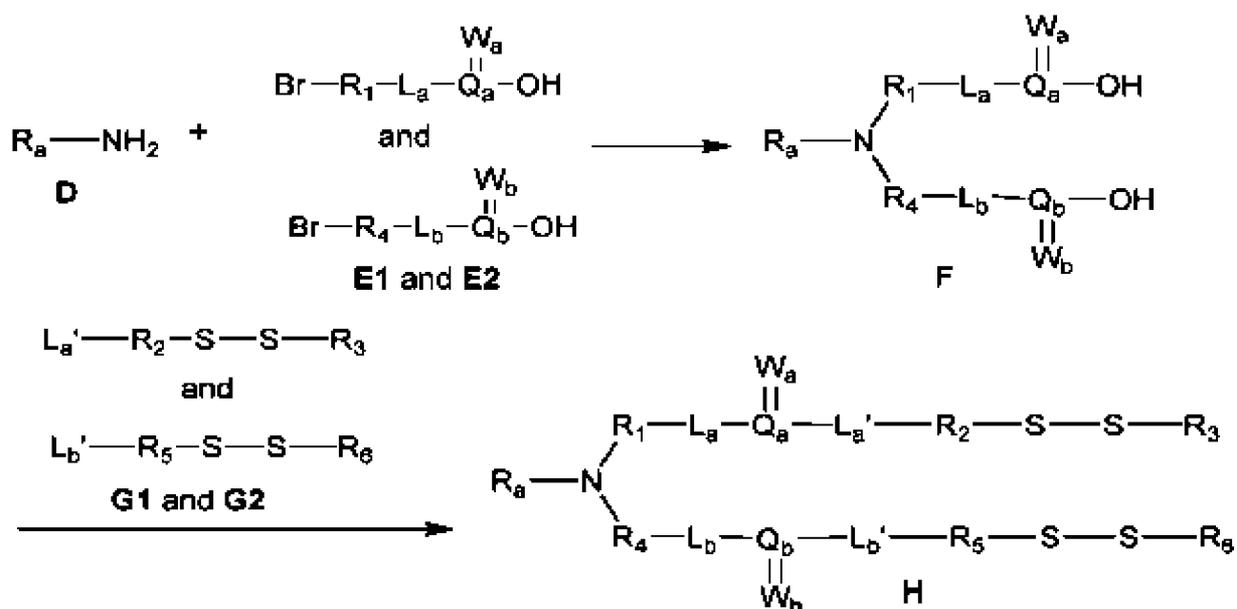


1-O16B, n=10



1-O18B, n=12

[0572] Липидподобные соединения со структурой XXIII могут быть получены способами, хорошо известными в данной области. См. Wang et al., ACS Synthetic Biology, 1, 403-07 (2012); Manoharan, et al., International Patent Application Publication WO 2008/042973; и Zugates et al патент США 8071082. Показанный ниже способ дает пример синтеза этих липидподобных соединений:



[0573] Каждый из La, La', L и L' может быть одним из L1-L10; каждый из Wa и Wb независимо представляет собой W или V; и Ra и R1-R6 определены выше, а также L1-L10, W и V.

[0574] В этом иллюстративном способе синтеза соединение амина, то есть соединение D, взаимодействует с бромидами E1 и E2 с образованием соединения F, которое затем соединяется как с G1, так и с G2 с получением конечного продукта, то есть соединения H. Одна или обе двойные связи в этом соединении (показанные выше) могут быть восстановлены до одной или двух одинарных связей с получением различных липидоподобных соединений структуры XXIII.

[0575] Другие липидоподобные соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием других подходящих исходных материалов описанным выше способом синтеза и другими способами, известными в данной области. Способ, изложенный выше, может включать дополнительную стадию (стадии) для добавления или удаления подходящих защитных групп, чтобы в конечном счете сделать возможным синтез липидоподобных соединений. Кроме того, различные этапы синтеза могут быть выполнены в альтернативной последовательности или порядке для получения желаемого материала. Синтетические химические преобразования и методы защитных групп (защита и снятие защиты), используемые при синтезе применимых липидоподобных соединений, известны в данной области, включая, например, R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations* (2nd Ed., VCH Publishers 1999); P. G. M. Wuts and T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* (4th Ed., John Wiley and Sons 2007); L. Fieser и M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis* (John Wiley and Sons 1994); и L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (2nd ed., John Wiley and Sons 2009) и последующие их издания. Некоторые липидоподобные соединения могут содержать неароматическую двойную связь и один или несколько центров асимметрии. Таким образом, они могут встречаться в виде рацематов и рацемических смесей, отдельных энантиомеров, индивидуальных диастереомеров, диастереомерных смесей и цис- или

транс-изомерных форм. Рассматриваются все такие изомерные формы.

[0576] Как упоминалось выше, эти липидоподобные соединения применимы для доставки фармацевтических средств. Их эффективность в доставке фармацевтических средств может быть предварительно проверена с помощью анализа *in vitro*, а затем подтверждена экспериментами на животных и клиническими испытаниями. Другие способы также будут очевидны специалистам в данной области.

[0577] Не ограничиваясь какой-либо теорией, липидоподобные соединения структуры XXIII облегчают доставку фармацевтических средств путем образования комплексов, например, наноккомплексов и микрочастиц. Гидрофильная головная группа такого липидоподобного соединения, положительно или отрицательно заряженная, связывается с противоположно заряженным фрагментом фармацевтического средства, а его гидрофобный фрагмент связывается с гидрофобным фрагментом фармацевтического средства. Любое связывание может быть ковалентным или нековалентным.

[0578] Описанные выше комплексы могут быть получены с использованием процедур, описанных в таких публикациях, как Wang et al., *ACS Synthetic Biology*, 1, 403-07 (2012). Как правило, их получают путем инкубации липидоподобного соединения и фармацевтического средства в буфере, таком как ацетатно-натриевый буфер или фосфатно-солевой буфер ("PBS").

Гидрофильные группы

[0579] В некоторых вариантах осуществления выбранная гидрофильная функциональная группа или фрагмент может изменять или иным образом придавать свойства соединению или переносчику, компонентом которого является такое соединение (например путем повышения эффективности трансфекции липидной наночастицы, в которой соединение является компонентом). Например, включение гуанидиния в качестве гидрофильной головной группы в соединения, раскрытые в настоящем документе, может способствовать слиянию таких соединений (или переносчика, компонентом которого являются такие соединения) с клеточной мембраной одной или нескольких клеток-мишеней, повышая тем самым, например, эффективность трансфекции таких соединений. Было высказано предположение, что азот из гидрофильного гуанидинового фрагмента образует переходное состояние шестичленного кольца, которое обеспечивает стабильность взаимодействия и, таким образом, позволяет клеткам поглощать инкапсулированные материалы. (Wender, et al., *Adv. Drug Del. Rev.* (2008) 60: 452-472.) Аналогичным образом, включение одной или нескольких аминогрупп или фрагментов в раскрытые соединения (например в качестве головной группы) может дополнительно способствовать разрушению эндосомальной/лизосомальной мембраны клетки-мишени за счет использования фузогенности таких аминогрупп. Это основано не только на *pK_a* аминогруппы композиции, но и на способности аминогруппы претерпевать гексагональный фазовый переход и сливаться с поверхностью клетки-мишени, то есть с мембраной везикул. (Koltover, et al. *Science* (1998) 281: 78-81.) Считается, что результат способствует разрушению мембраны везикул и высвобождению содержимого липидных наночастиц в клетку-мишень.

[0580] Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления включение, например, имидазола в качестве гидрофильной головной группы в соединения, раскрытые в настоящем документе, может способствовать эндосомальному или лизосомальному высвобождению, например, содержимого, которое инкапсулировано в переносчике (например в липидной наночастице) согласно изобретению. Такое усиленное высвобождение может быть достигнуто с помощью одного или обоих механизмов разрушения, опосредованного протонной губкой, и/или механизма усиленной фузогенности. Механизм протонной губки основан на способности соединения и, в частности, функционального фрагмента или группы соединения буферизовать подкисление эндосомы. На это можно воздействовать или иным образом контролировать рКа соединения или одной или нескольких функциональных групп, содержащих такое соединение (например имидазол). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фузогенность, например, соединений на основе имидазола, раскрытых в настоящем документе (например HGT4001 и HGT4004), связана со свойствами разрушения эндосом, которым способствуют такие имидазольные группы, которые имеют более низкую рКа по сравнению с другими традиционными ионизируемыми липидами. Такие свойства разрушения эндосом, в свою очередь, способствуют осмотическому набуханию и разрушению липосомальной мембраны с последующей трансфекцией или внутриклеточным высвобождением в клетку-мишень полинуклеотидных материалов, загруженных или инкапсулированных в ней. Это явление может быть применимо к целому ряду соединений с желательными профилями рКа в дополнение к имидазольному фрагменту. Такие варианты осуществления также включают функциональные группы на основе азота, такие как полиамины, полипептиды (гистидин), и дендритные структуры на основе азота.

[0581] Иллюстративные ионизируемые и/или катионные липиды описаны в международных публикациях патентов PCT WO2015/095340, WO2015/199952, WO2018/011633, WO2017/049245, WO2015/061467, WO2012/040184, WO2012/000104, WO2015/074085, WO2016/081029, WO2017/004 143, WO2017/075531, WO2017/117528, WO2011/022460, WO2013/148541, WO2013/116126, WO2011/153120, WO2012/044638, WO2012/054365, WO2011/090965, WO2013/016058, WO2012/162210, WO2008/042973, WO2010/129709, WO2010/144740, WO20 12/099755, WO2013/049328, WO2013/086322, WO2013/086373, WO2011/071860, WO2009/132131, WO2010/048536, WO2010/088537, WO2010/054401, WO2010/054406, WO2010/054405, WO2010/054384, WO2012/016184, WO2009/086558, WO2010/042877, WO2011/000106, WO2011/000107, WO2005/120152, WO2011/141705, WO2013/126803, WO2006/007712, WO2011/038160, WO2005/121348, WO2011/066651, WO2009/127060, WO2011/141704, WO2006/069782, WO2012/031043, WO2013/006825, WO2013/033563, WO2013/089151, WO2017/099823, WO2015/095346 и WO2013/086354 и публикации патентов США US2016/0311759, US2015/0376115, US2016/0151284, US2017/0210697, US2015/0140070, US2013/0178541, US2013/0303587, US2015/0141678, US2015/0239926, US2016/0376224, US2017/0119904, US2012/0149894,

US2015/0057373, US2013/0090372, US2013/0274523, US2013/0274504, US2013/0274504, US2009/0023673, US2012/0128760, US2010/0324120, US2014/0200257, US2015/0203446, US2018/0005363, US2014/0308304, US2013/0338210, US2012/0101148, US2012/0027796, US2012/0058144, US2013/0323269, US2011/0117125, US2011/0256175, US2012/0202871, US2011/0076335, US2006/0083780, US2013/0123338, US2015/0064242, US2006/0051405, US2013/0065939, US2006/0008910, US2003/0022649, US2010/0130588, US2013/0116307, US2010/0062967, US2013/0202684, US2014/0141070, US2014/0255472, US2014/0039032, US2018/0028664, US2016/0317458 и US2013/0195920, все содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. Международная заявка на патент WO 2019/131770 также полностью включена в данный документ посредством ссылки.

8. PEG-липиды

[0582] Применение и включение модифицированных полиэтиленгликолем (PEG) фосфолипидов и производных липидов, таких как производные церамиды (PEG-CER), включая N-октаноил-сфингозин-1-[сукцинил(метоксиполиэтиленгликоль)-2000] (C8 PEG-2000 церамид) в липосомальные и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, предполагается, предпочтительно в комбинации с одним или несколькими соединениями и липидами, раскрытыми в настоящем документе. Предполагаемые PEG-модифицированные липиды включают без ограничения цепь полиэтиленгликоля длиной до 5 кДа, ковалентно присоединенную к липиду с алкильной цепью (цепями) длиной C6-C20. В некоторых вариантах осуществления PEG-модифицированный липид, используемый в композициях и способах согласно изобретению, представляет собой 1,2-димиристоил-sn-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль (2000 MW PEG) «DMG-PEG2000». Добавление PEG-модифицированных липидов к переносчику липидов может предотвратить агрегацию комплекса, а также может обеспечить средства для увеличения продолжительности нахождения в кровотоке и увеличения доставки липидно-полинуклеотидной композиции в ткани-мишени (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), или они могут быть выбраны для быстрой замены состава *in vivo* (см. Патент США № 5885613). Особенно полезными способными к обмену липидами являются PEG-церамиды, имеющие более короткие ацильные цепи (например C14 или C18). PEG-модифицированный фосфолипид и производные липидов согласно настоящему изобретению могут иметь молярное соотношение от примерно 0% до примерно 20%, от примерно 0,5% до примерно 20%, от примерно 1% до примерно 15%, от примерно 4% до примерно 10%, или примерно 2% от общего количества липидов, присутствующих в липосомальных липидных наночастицах.

[0583] В одном варианте осуществления PEG-модифицированный липид описан в международной патентной заявке № PCT/US2019/015913, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления переносчик содержит один или несколько PEG-модифицированных липидов.

[0584] Неограничивающие примеры PEG-модифицированных липидов включают PEG-модифицированные фосфатидилэтаноламины и фосфатидные кислоты, конъюгаты PEG-церамид (например PEG-CerC14 или PEG-CerC20), PEG-модифицированные

диалкиламины и PEG-модифицированные 1,2-диацилоксипропан-3-амины. В некоторых дополнительных вариантах осуществления PEG-модифицированный липид может представлять собой, например, PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC или PEG-DSPE.

[0585] В некоторых дополнительных вариантах осуществления PEG-модифицированный липид включает без ограничения 1,2-димиристоил-sn-глицеринметоксиполиэтиленгликоль (PEG-DMG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)] (PEG-DSPE), PEG-дистерилглицерин (PEG-DSG), PEG-дипальметолеил, PEG-диолеил, PEG-дистеарил, PEG-диацилгликамид (PEG-DAG), PEG-дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (PEG-DPPE) или PEG-1,2-димиристилоксипропил-3-амин (PEG-c-DMA).

[0586] В различных вариантах осуществления PEG-модифицированный липид также может называться «пегилированным липидом» или «PEG-липидом».

[0587] В одном варианте осуществления PEG-липид выбирают из группы, состоящей из PEG-модифицированного фосфатидилэтаноламина, PEG-модифицированной фосфатидной кислоты, PEG-модифицированного церамида, PEG-модифицированного диалкиламина, PEG-модифицированного диацилглицерина, PEG-модифицированного диалкилглицерина и их смесей.

[0588] В некоторых вариантах осуществления липидный фрагмент PEG-липидов включает фрагменты, имеющие длину от примерно C14 до примерно C22, например, от примерно C14 до примерно C16. В некоторых вариантах осуществления фрагмент PEG, например mPEG-NH₂, имеет размер примерно 1000, примерно 2000, примерно 5000, примерно 10000, примерно 15000 или примерно 20000 дальтон. В одном варианте осуществления PEG-липид представляет собой PEG_{2k}-DMG.

[0589] В одном варианте осуществления липидные наночастицы, описанные в настоящем документе, могут содержать липид, модифицированный недиффундирующим PEG. Неограничивающие примеры недиффундирующих PEG включают PEG-DSG и PEG-DSPE.

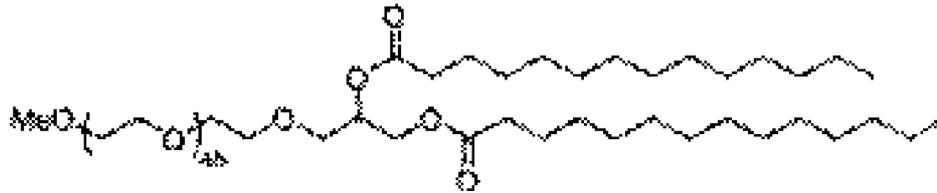
[0590] В данной области известны PEG-липиды, такие как описанные в патенте США № 8158601 и международной публикации патента № WO2015/130584 A2, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0591] В различных вариантах осуществления липиды (например PEG-липиды), описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы, как описано в международной публикации патента № PCT/US2016/000129, который полностью включен посредством ссылки.

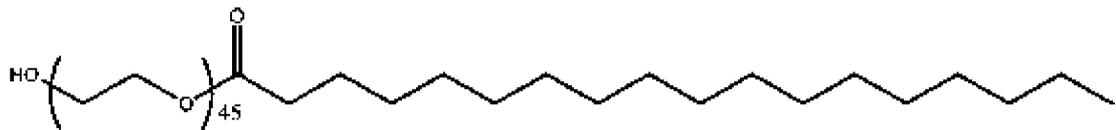
[0592] Липидный компонент композиции липидных наночастиц может включать одну или несколько молекул, содержащих полиэтиленгликоль, таких как PEG или PEG-модифицированные липиды. Такие виды могут также называться пегилированными липидами. PEG-липид представляет собой липид, модифицированный полиэтиленгликолем. PEG-липид может быть выбран из неограничивающей группы,

включающей PEG-модифицированные фосфатидилэтаноламины, PEG-модифицированные фосфатидные кислоты, PEG-модифицированные церамиды, PEG-модифицированные диалкиламины, PEG-модифицированные диацилглицеролы, PEG-модифицированные диалкилглицеролы и их смеси. Например, PEG-липид может представлять собой липид PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC или PEG-DSPE.

[0593] В некоторых вариантах осуществления PEG-модифицированные липиды, представляют собой модифицированную форму PEG-DMG. PEG-DMG имеет следующую структуру:

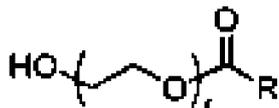


[0594] В некоторых вариантах осуществления PEG-модифицированные липиды представляют собой модифицированную форму PEG-C18 или PEG-1. PEG-1 имеет следующую структуру



[0595] В одном варианте осуществления PEG-липиды, применимые в настоящем изобретении, могут представлять собой пегилированные липиды, описанные в Международной публикации № WO2012099755, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Любой из этих иллюстративных PEG-липидов, описанных в настоящем документе, может быть модифицирован с включением гидроксильной группы в цепь PEG. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой липид PEG-OH. В некоторых вариантах осуществления липид PEG-OH содержит одну или несколько гидроксильных групп в цепи PEG. В некоторых вариантах осуществления PEG-OH или гидрокси-пегилированный липид содержит группу -OH на конце цепи PEG. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

[0596] В некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение Формулы (P1):



или его соль или изомер, где:

r представляет собой целое число от 1 до 100;

R представляет собой C10-40 алкил, C10-40 алкенил или C10-40 алкинил; и необязательно одна или несколько метиленовых групп R независимо заменены C3-10-карбоциклиленом, 4-10-членным гетероциклиленом, C6-10-ариленом, 4-10-членным

гетероариленом, $N(R^N)-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^N)-$, $-NR^NC(O)-$, $-NR^NC(O)N(R^N)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-OC(O)O-$, $-OC(O)N(R^N)-$, $-NR^NC(O)O-$, $-C(O)S-$, $-SC(O)-$, $-C(=NR^N)-$, $-C(=NR^N)N(R^N)-$, $-NR^NC(=NR^N)-$, $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$, $-C(S)-$, $-C(S)N(R^N)-$, $-NR^NC(S)-$, $-NR^NC(S)N(R^N)-$, $-S(O)-$, $-OS(O)-$, $-S(O)O-$, $-OS(O)O-$, $-OS(O)_2-$, $-S(O)_2O-$, $-OS(O)_2O-$, $-N(R^N)S(O)-$, $-S(O)N(R^N)-$, $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$, $-OS(O)N(R^N)-$, $-N(R^N)S(O)O-$, $-S(O)_2-$, $-N(R^N)S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R^N)-$, $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$, $-OS(O)_2N(R^N)-$ или $-N(R^N)S(O)_2O-$; а также

каждый пример RN независимо представляет собой водород, C1-6 алкил или защитную группу азота.

[0597] Например, R представляет собой C17-алкил. Например, PEG-липид представляет собой соединение формулы (P1-a):



или его соль или изомер, где r представляет собой целое число от 1 до 100.

[0598] Например, PEG-липид представляет собой соединение следующей формулы:



9. Вспомогательные липиды

[0599] В некоторых вариантах осуществления переносчик (например LNP), описанный в настоящем документе, содержит один или несколько некатионных вспомогательных липидов. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой фосфолипид. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой заменитель или замену фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид или заменитель фосфолипида может представлять собой, например, один или несколько насыщенных или (поли)ненасыщенных фосфолипидов или заменителей фосфолипида или их комбинацию. Обычно фосфолипиды содержат фосфолипидный фрагмент и один или несколько фрагментов жирных кислот.

[0600] Фрагмент фосфолипида может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты, 2-лизофосфатидилхолина и сфингомиелина.

[0601] Фрагмент жирной кислоты может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, миристолеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, стеариновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эруковой кислоты, фитановой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, бегеновой кислоты, докозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты.

[0602] Фосфолипиды включают без ограничения глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозиты, фосфатидглицерины и фосфатидные кислоты. Фосфолипиды также включают фосфосфинголипиды, такие как сфингомиелин.

[0603] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой аналог 1,2-дистеароил-177-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), заменитель DSPC, олеиновую кислоту или аналог олеиновой кислоты.

[0604] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой нефосфатидилхолиновый (PC) цвиттерионный липид, аналог DSPC, олеиновую кислоту, аналог олеиновой кислоты или заменитель DSPC.

[0605] В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид описан в РСТ/US2018/053569. Вспомогательные липиды, подходящие для использования в липидной композиции согласно настоящему изобретению, включают, например, различные нейтральные, незаряженные или цвиттерионные липиды. Такие вспомогательные липиды предпочтительно используют в сочетании с одним или несколькими соединениями и липидами, описанными в настоящем документе. Примеры вспомогательных липидов включают без ограничения 5-гептадецилбензол-1,3-диол (резорцин), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), фосфохолин (DOPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), фосфатидилхолин (PLPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DAPC), фосфатидилэтанолламин (PE), яичный фосфатидилхолин (EPC), дилаурилоилфосфатидилхолин (DLPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин (MPPC), 1-паимитоил-2-миристоилфосфатидилхолин (PMPC), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин (PSPC), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DBPC), 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидилхолин (SPPC), 1,2-диикоконоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC), паимитоилфосфатидилхолин (POPC), лизофосфатидилхолин, диолеоилфосфатидилэтанолламин (DOPE), дилинолеоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламин (POPE), лизофосфатидилэтанолламин и их комбинации. В одном варианте осуществления вспомогательный липид может представлять собой дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) или димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE). В другом варианте осуществления вспомогательный липид может представлять собой дистеароилфосфатидилхолин (DSPC). Вспомогательные липиды стабилизируют и улучшают процессинг переносчиков. Такие вспомогательные липиды предпочтительно используют в сочетании с другими вспомогательными средствами, например, с одним или несколькими описанными в данном документе ионизируемыми липидами. В некоторых вариантах осуществления при использовании в комбинации с ионизируемым липидом вспомогательный липид может иметь молярное соотношение от 5% до примерно 90% или от примерно 10% до примерно 70% от общего липида, присутствующего в липидной наночастице.

10. Структурные липиды

[0606] В одном варианте осуществления структурный липид описан в международной заявке на патент PCT/US2019/015913.

[0607] Переносчики, описанные в настоящем документе, содержат один или несколько структурных липидов. Включение структурных липидов в липидную наночастицу может помочь уменьшить агрегацию других липидов в частице. Структурные липиды могут включать без ограничения холестерин, фекостерол, эргостерол, бассикастерол, томатилин, томатин, урсол, альфа-токоферол и их смеси. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления структурный липид включает холестерин и кортикостероид (такой как, например, преднизолон, дексаметазон, преднизон и гидрокортизон) или их комбинацию.

[0608] В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой стерол. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой стероид. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой аналог холестерина. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой альфа-токоферол.

[0609] Описанные в настоящем документе переносчики содержат один или несколько структурных липидов. Включение структурных липидов в переносчик, например в липидную наночастицу, может помочь смягчить агрегацию других липидов в частице. В некоторых вариантах осуществления структурный липид включает холестерин и кортикостероид (такой как, например, преднизолон, дексаметазон, преднизон и гидрокортизон) или их комбинацию.

[0610] В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой стерол. Структурные липиды могут включать без ограничения стеролы (например фитостеролы или зоостеролы).

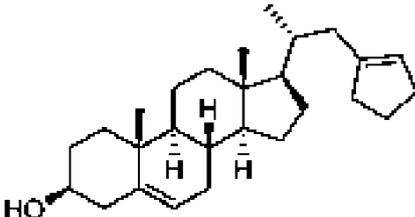
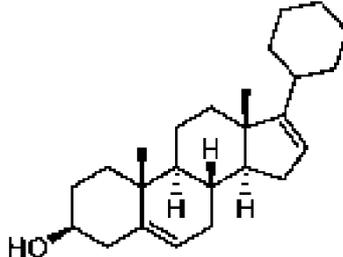
[0611] В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой стероид. Например, стерины могут включать без ограничения холестерин, β -ситостерол, фекостерол, эргостерол, ситостерол, кампестерол, стигмастерол, бассикастерол, эргостерол, томатилин, томатин, урсоловую кислоту или альфа-токоферол.

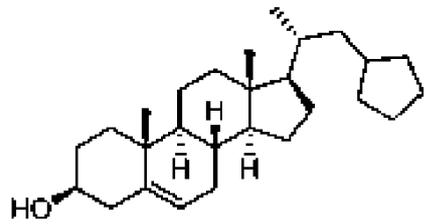
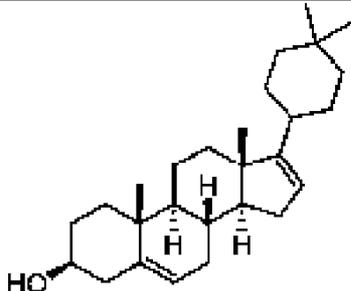
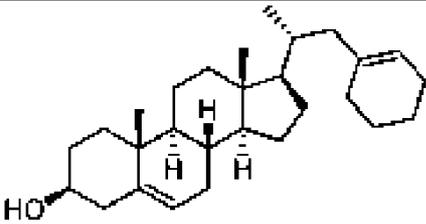
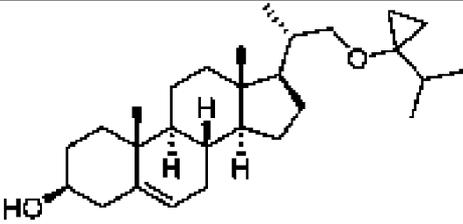
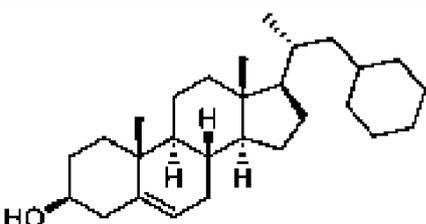
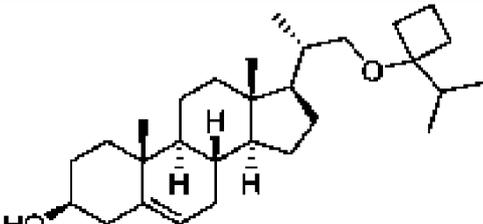
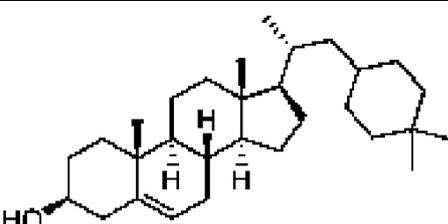
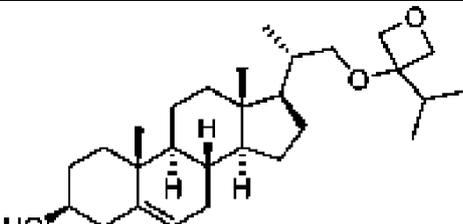
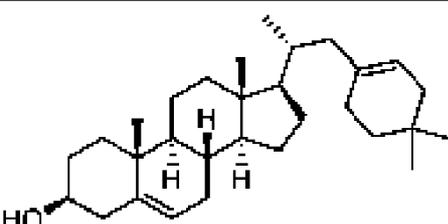
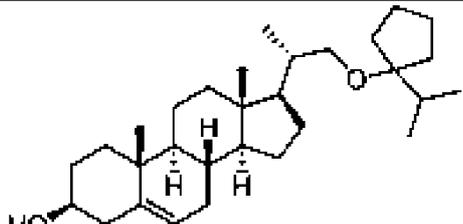
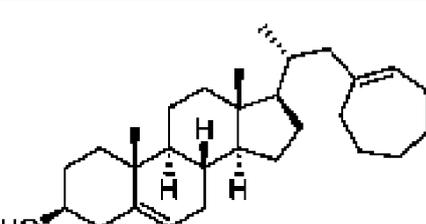
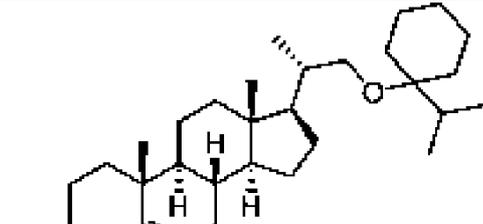
[0612] В некоторых вариантах осуществления переносчик содержит эффективное количество липида, усиливающего доставку иммунных клеток, например, аналога холестерина или аминлипида, или их комбинации, которые при наличии в переносчике, например, липидной наночастице, могут функционировать за счет усиления клеточной ассоциации и/или захвата, интернализации, внутриклеточного переноса и/или процессинга и/или выхода из эндосомы, и/или может усиливать распознавание и/или связывание с иммунными клетками по сравнению с переносчиком, в котором отсутствует липид, усиливающий доставку иммунных клеток. Соответственно, не намереваясь быть связанными каким-либо конкретным механизмом или теорией, в одном варианте

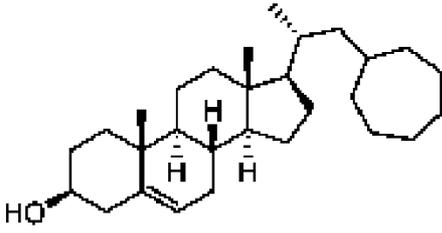
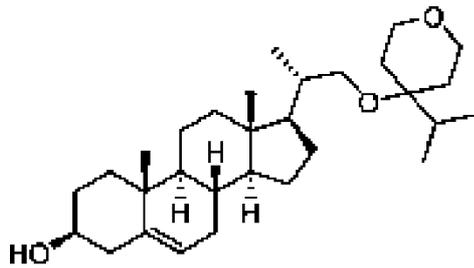
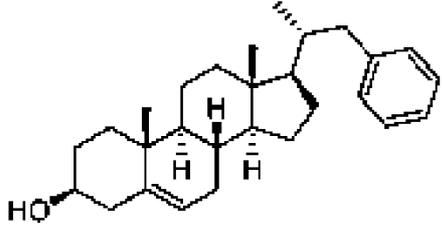
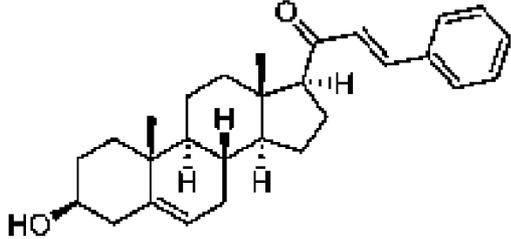
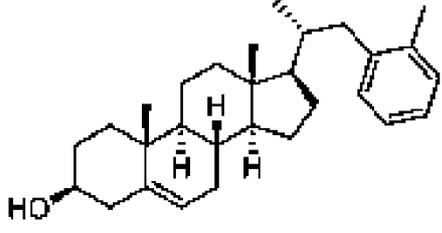
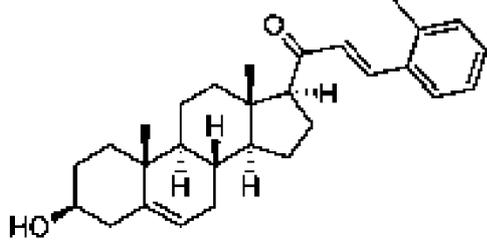
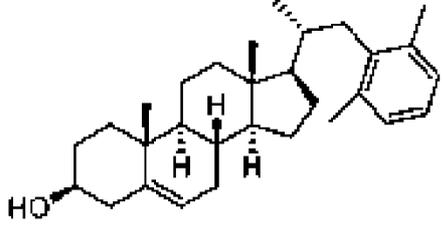
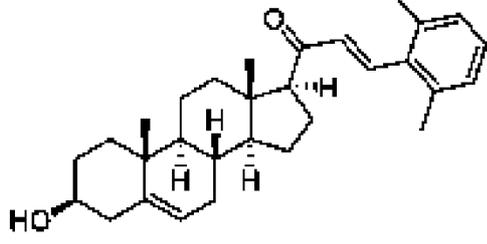
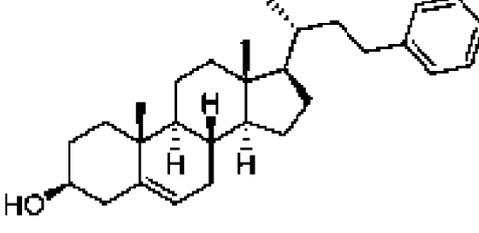
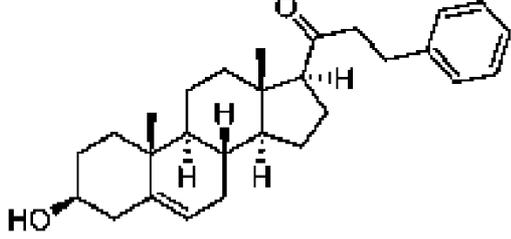
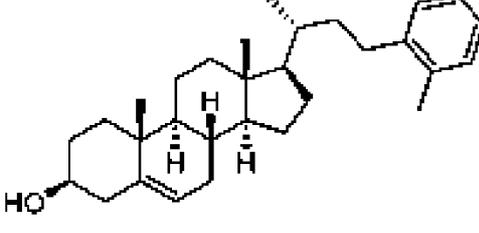
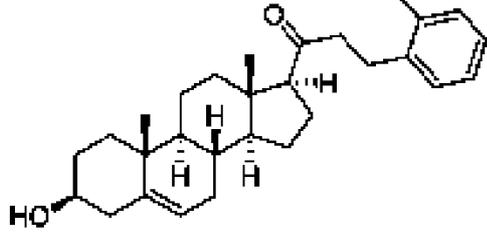
осуществления структурный липид или другой липид, усиливающий доставку иммунных клеток, согласно настоящему изобретению связывается с C1q или способствует связыванию переносчика, содержащего такой липид, с C1q. Таким образом, для применения *in vitro* переносчиков согласно настоящему изобретению для доставки молекулы нуклеиновой кислоты в иммунную клетку используют условия культивирования, которые включают C1q (например используют культуральную среду, которая содержит сыворотку, или добавляют экзогенный C1q в среду, не содержащую сыворотку). Для использования *in vivo* переносчиков согласно раскрытию потребность в C1q удовлетворяют за счет эндогенного C1q.

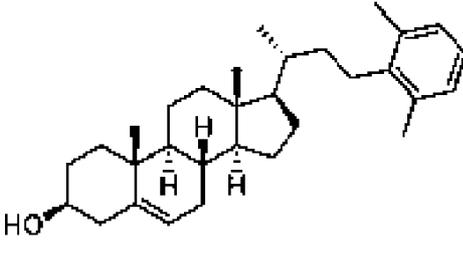
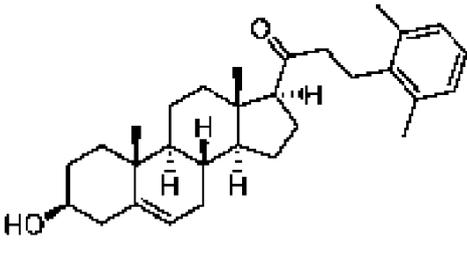
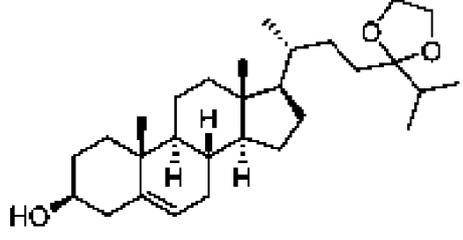
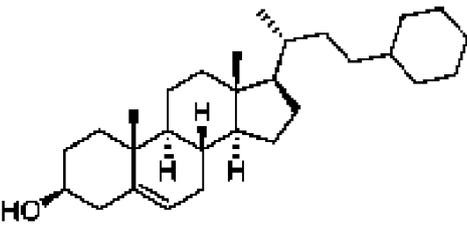
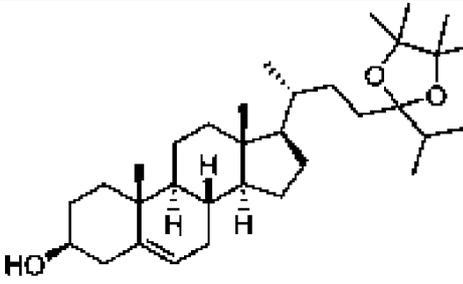
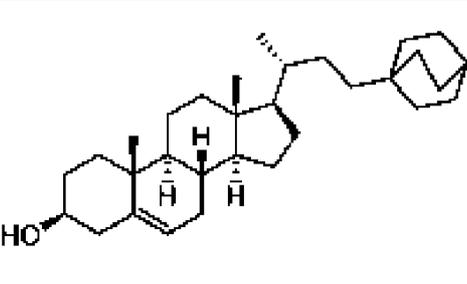
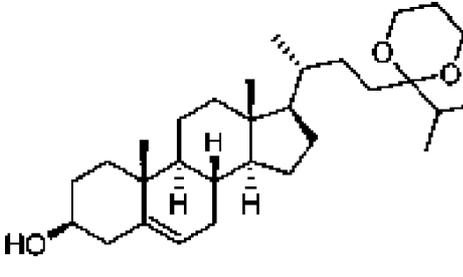
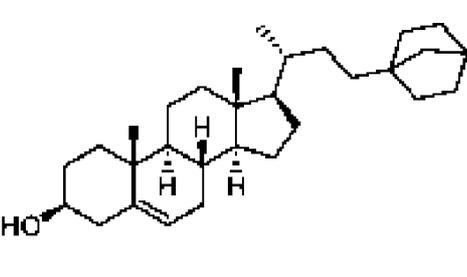
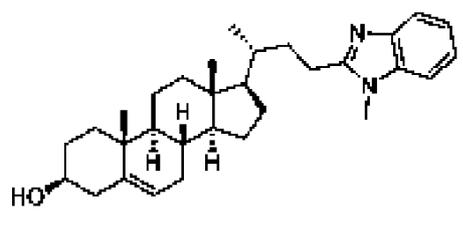
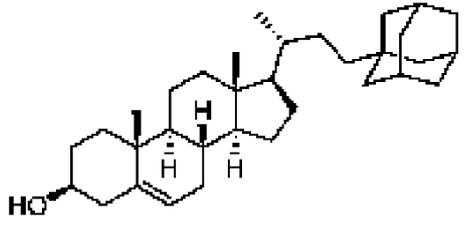
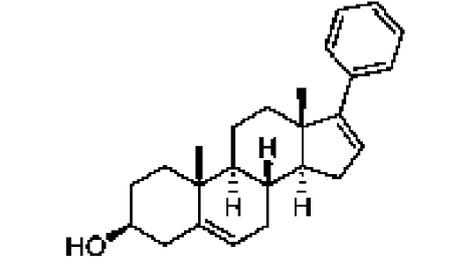
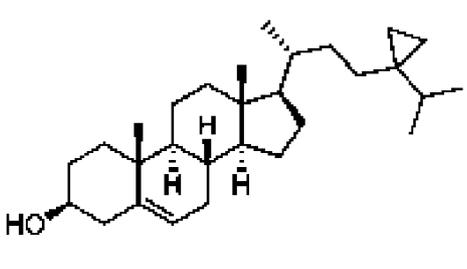
[0613] В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой аналог холестерина. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой липид, указанный в таблице 16:

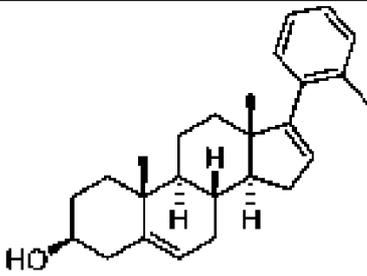
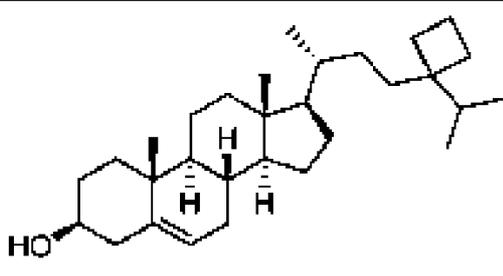
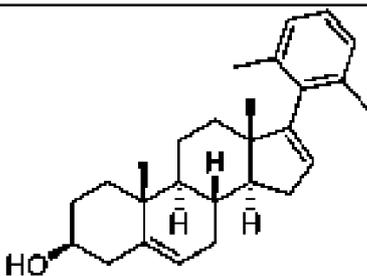
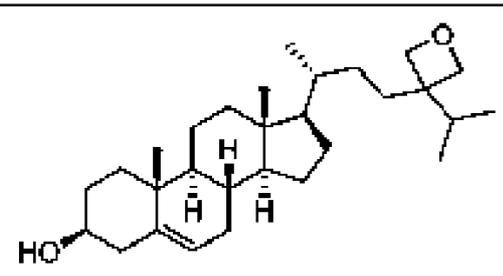
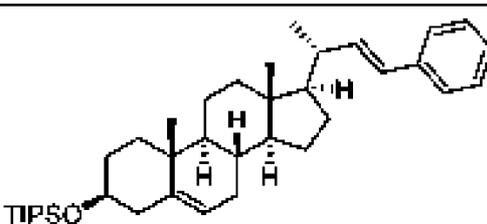
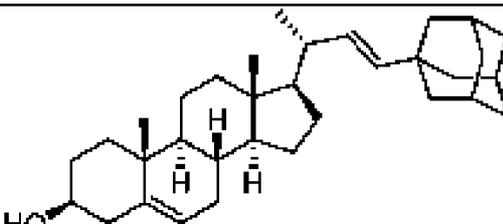
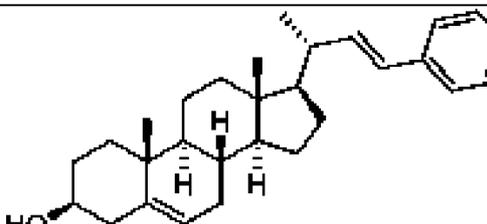
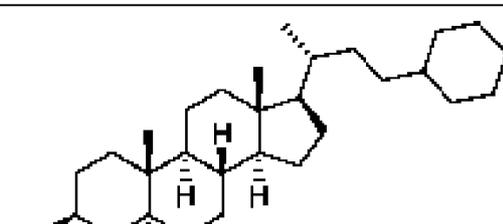
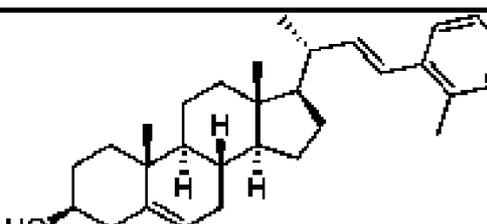
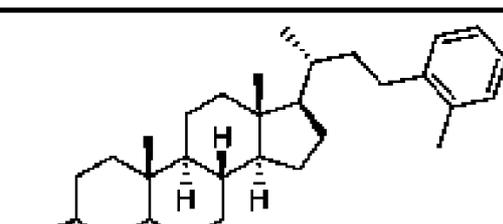
Таблица 16

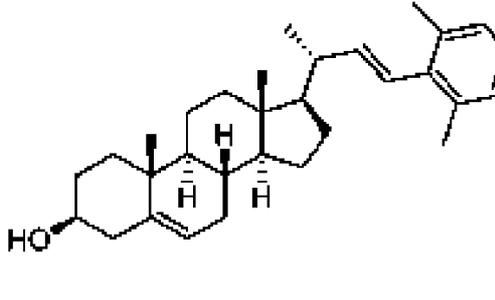
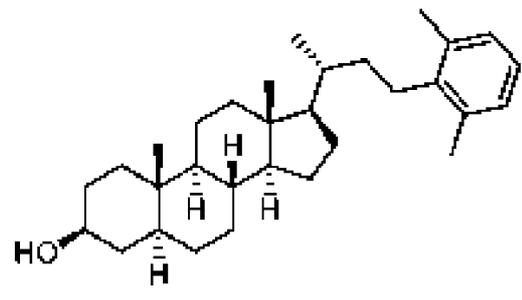
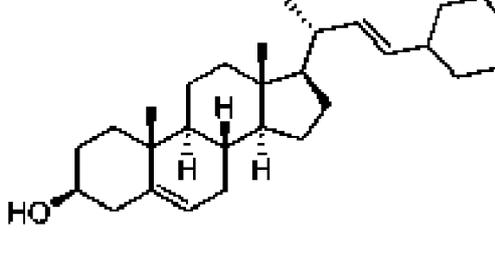
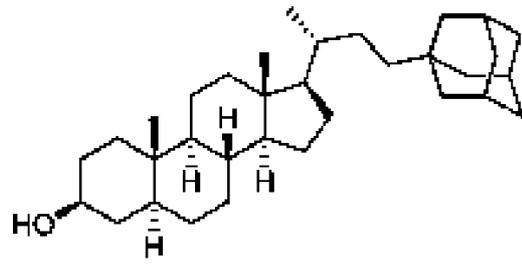
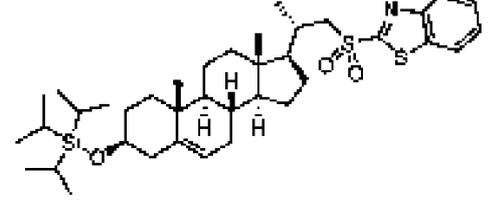
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
1		22	

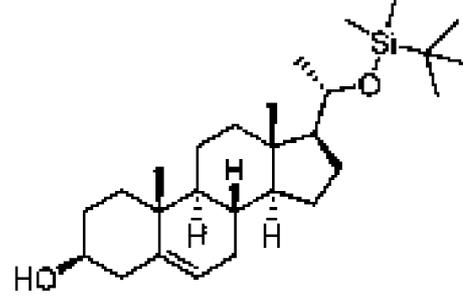
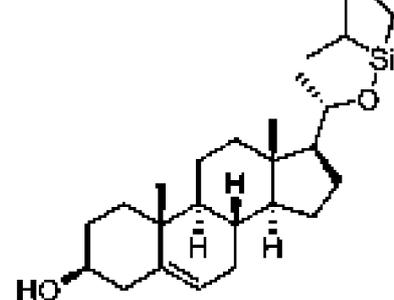
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
2		23	
3		24	
4		25	
5		26	
6		27	
7		28	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
8		29	
9		30	
10		31	
11		32	
12		33	
13		34	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
14		35	
15		36	
16		37	
17		38	
18		39	
19		40	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
20		41	
21		42	
150		165	
154		169	
162		170	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
163		171	
164		172	
184			

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
43		47	

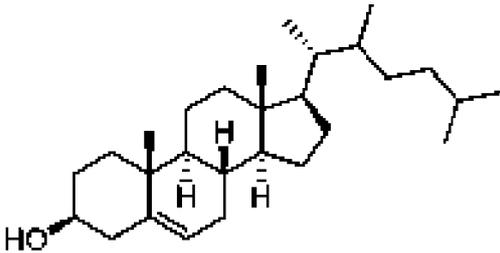
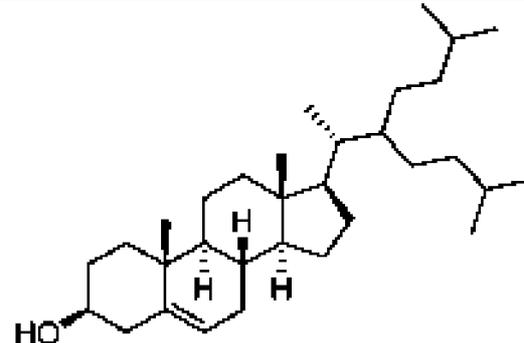
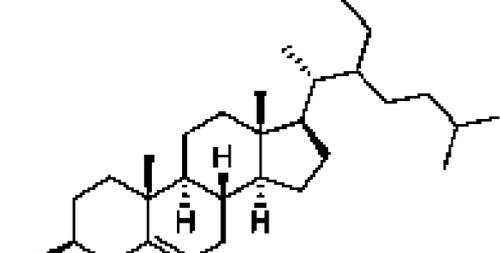
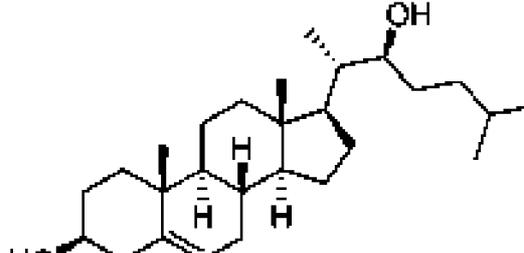
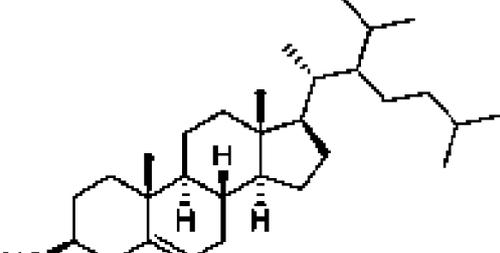
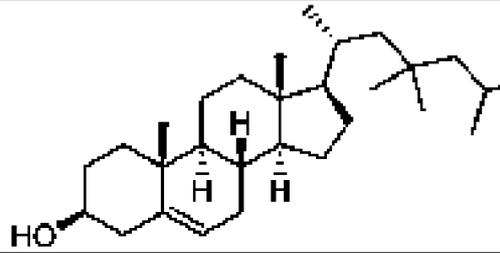
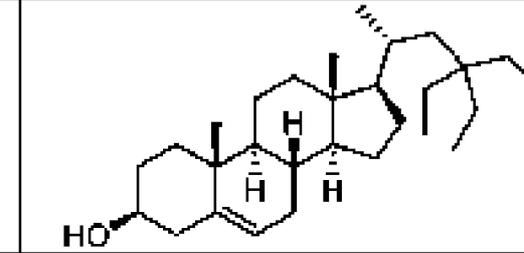
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
44		48	
45		49	
46		50	
175		177	
176		178	

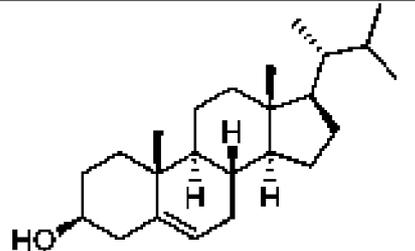
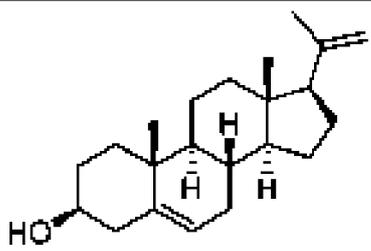
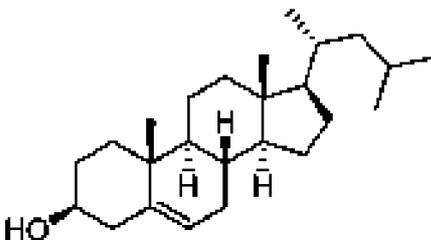
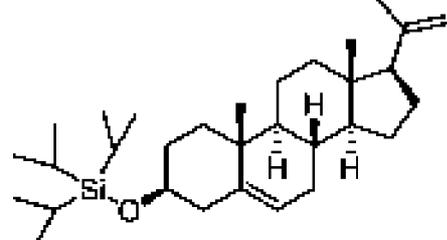
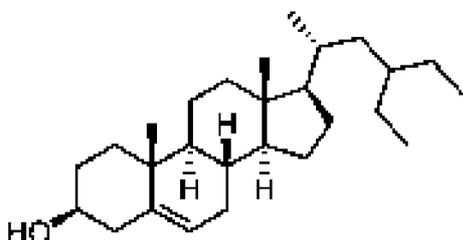
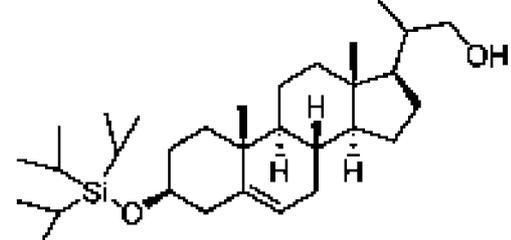
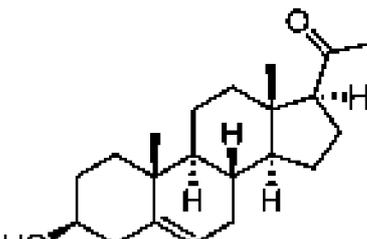
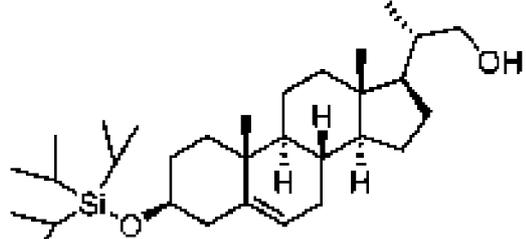
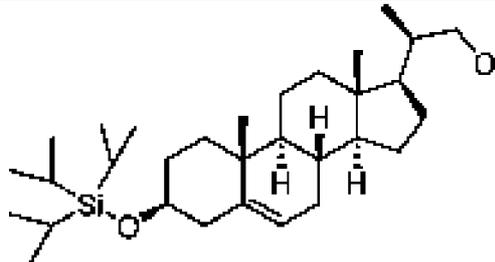
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
51		60	
52		61	
53		62	
54		63	
55		64	
56		65	
57		66	

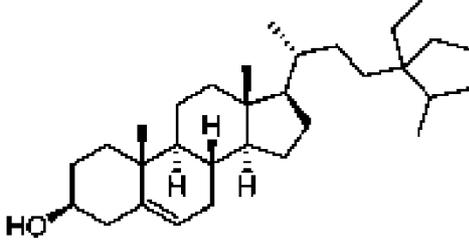
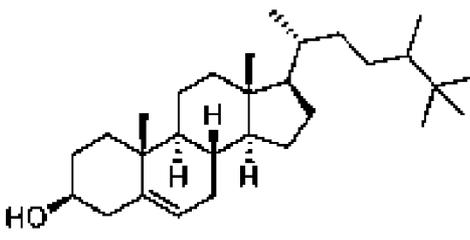
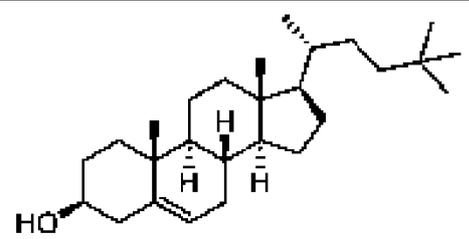
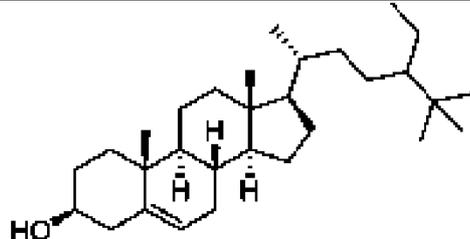
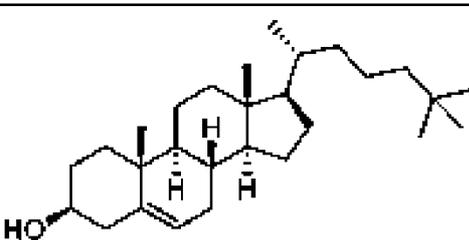
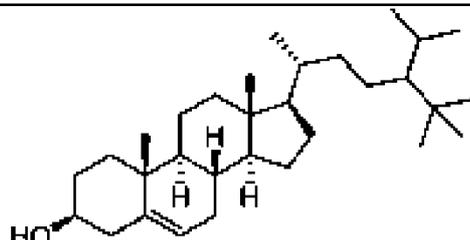
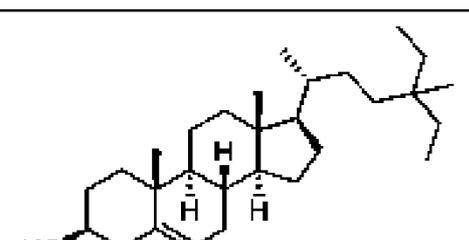
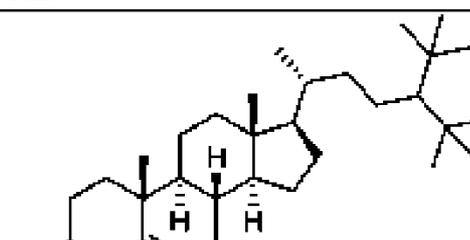
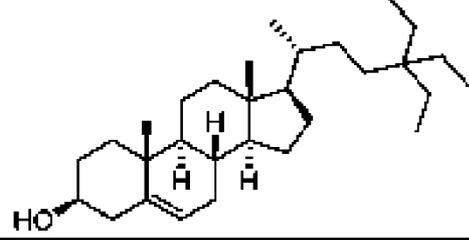
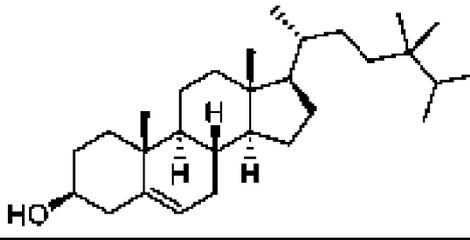
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
58		67	
59		149	
153			

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
68		71	
69		72	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
70		73	

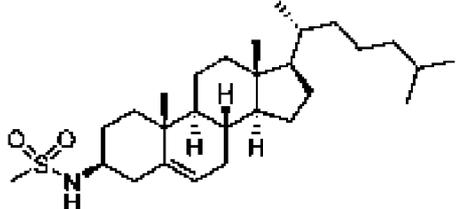
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
74		77	
75		78	
76			
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
79		80	

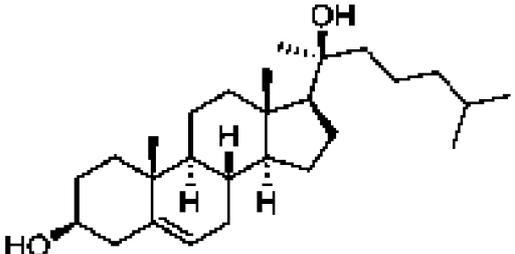
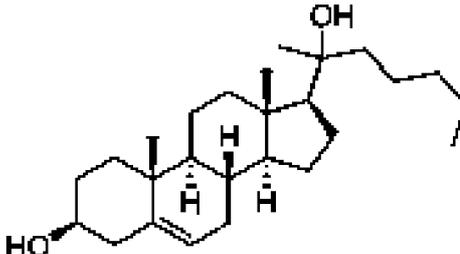
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
81		85	
82		86	
83		87	
84		152	
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
157			

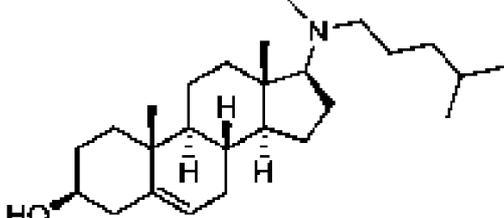
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
88		93	
89		94	
90		95	
91		96	
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
92		97	

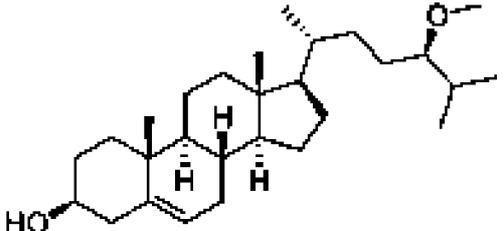
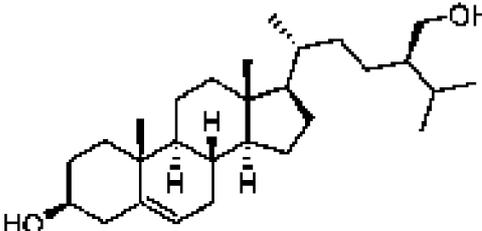
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
98		102	
99		103	
100		104	
101		105	

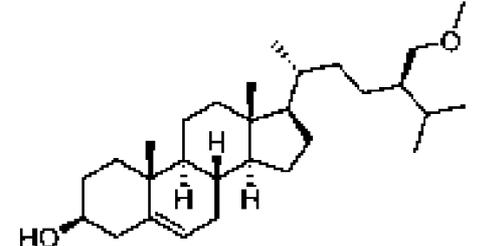
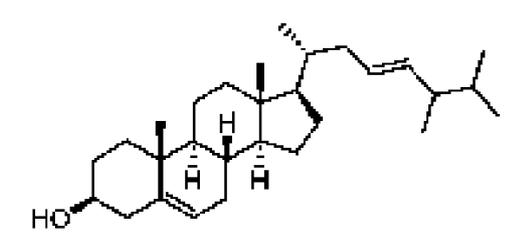
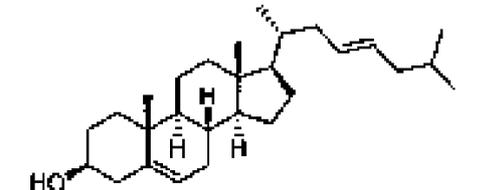
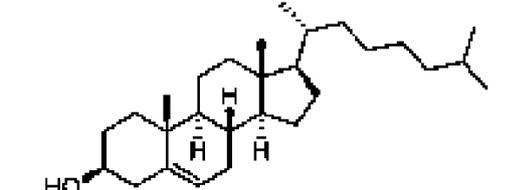
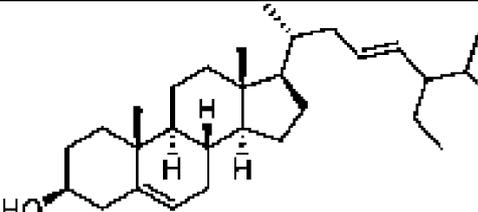
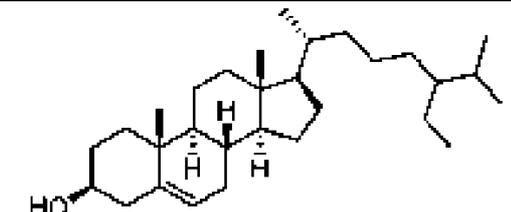
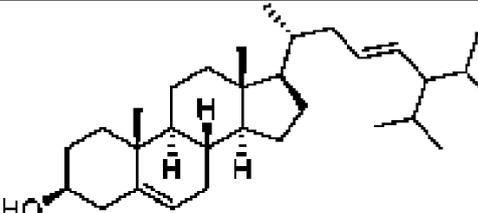
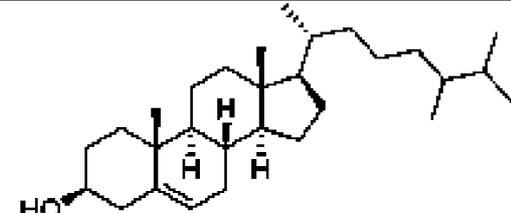
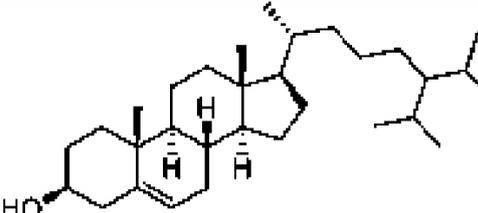
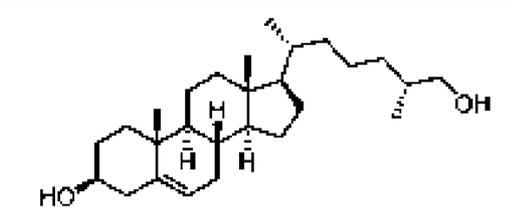
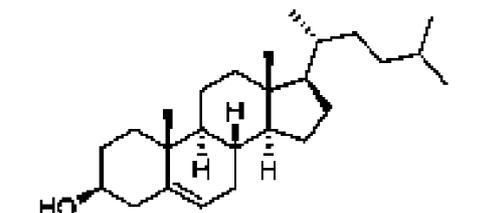
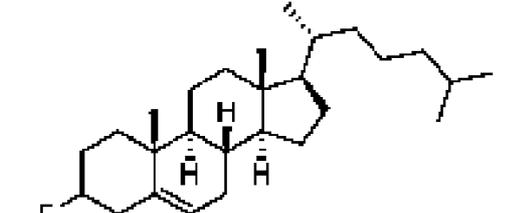
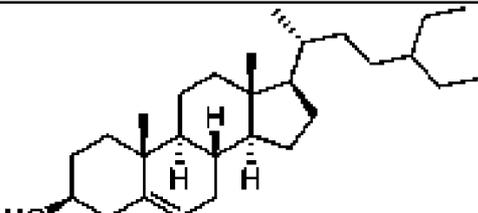
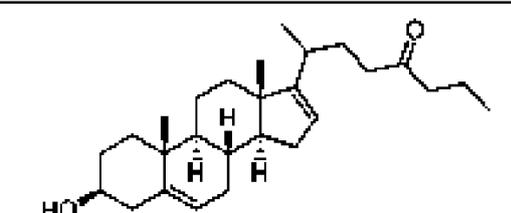
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
180		182	
181			

CMPD No. S-	Structure
106	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
107		108	

CMPD No. S-	Structure
109	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
110		121	

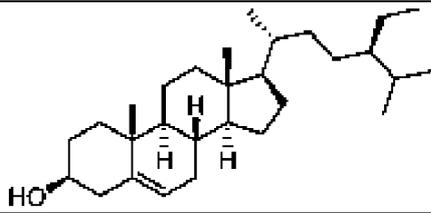
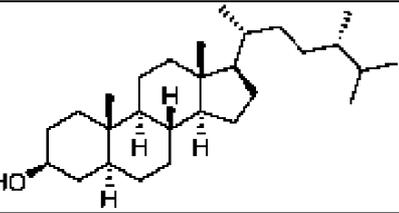
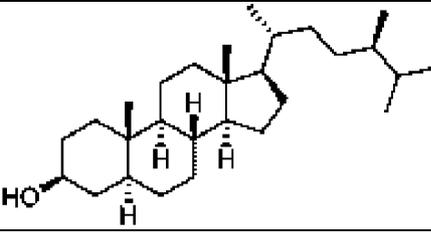
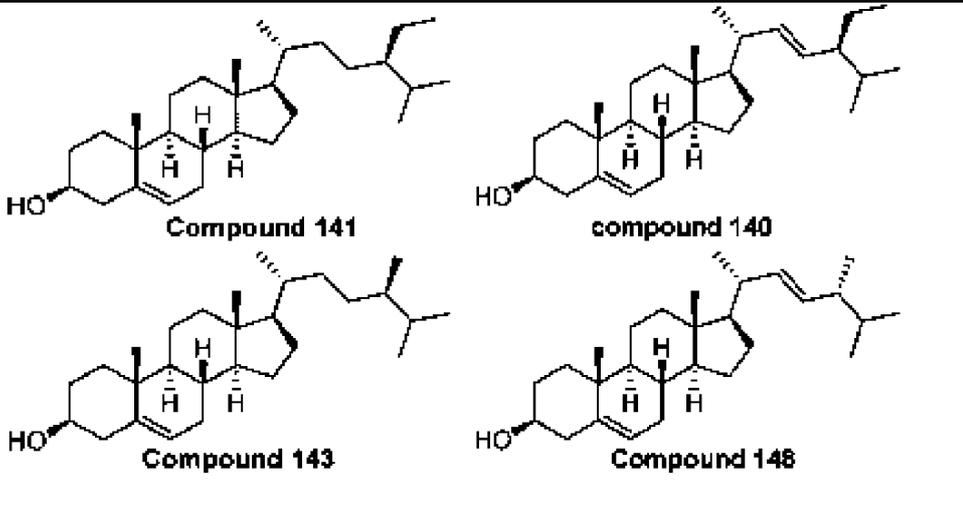
CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
111		122	
112		123	
113		124	
114		125	
115		126	
116		127	
117		128	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
118		129	
119		130	
120		155	
156		167	
158		168	
160		173	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
161		174	
166		179	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
131		133	
132			

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
134		142	
135		143	
136		144	
137		145	
138		146	
139		147	
140		148	

CMPD No. S-	Structure	CMPD No. S-	Structure
141		151	
159			
Composition S- No.	Structure		
183			

11. Содержащие LNP составы

[0614] Формирование липидных наночастиц (LNP), описанных в настоящем документе, может быть осуществлено любыми способами, известными в данной области. Например, как описано в публикации патента США № US2012/0178702 A1, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры композиций липидных наночастиц и способов их получения описаны, например, в Semple et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:172-176; Jayarama et al. (2012), Angew. Chem. Int. Ed., 51:8529-8533; и Maier et al. (2013) Molecular Therapy 21, 1570-1578 (содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[00615] В одном варианте осуществления содержащий LNP состав может быть приготовлен, например, способами, описанными в международной патентной публикации. № WO 2011/127255 или WO 2008/103276, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00616] В одном варианте осуществления содержащие LNP составы, описанные в настоящем документе, могут содержать поликатионную композицию. В качестве неограничивающего примера поликатионная композиция может представлять собой

композицию, выбранную из формул 1-60 публикации патента США № US2005/0222064 A1, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0617] В одном варианте осуществления липидная наночастица может быть приготовлена способами, описанными в публикации патента США № US 2013/0156845 A1 и международной патентной публикации № WO 2013/093648 A2 или WO 2012/024526 A2, каждая из которых полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

[0618] В одном варианте осуществления липидные наночастицы, описанные в настоящем документе, могут быть получены в стерильной среде с помощью системы и/или способов, описанных в публикации патента США № US2013/0164400 A1, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

[00619] В одном варианте осуществления содержащий LNP состав может быть приготовлен в виде наночастицы, такой как частица нуклеиновая кислота-липид, описанная в патенте США № 8492359, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0620] Композиция наночастиц может необязательно содержать одно или несколько покрытий. Например, композиция наночастиц может быть составлена в виде капсулы, пленки или таблетки, имеющей покрытие. Капсула, пленка или таблетка, содержащие композицию, описанную в данном документе, могут иметь любой подходящий размер, прочность на разрыв, твердость или плотность.

[0621] В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы, описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы с использованием способов, включающих микрожидкостные смесители. Иллюстративные микрожидкостные смесители могут включать без ограничения микросмесители с разделением потока на множество параллельных ламинарных потоков, включая без ограничения смесители производства Precision Nanosystems (Vancouver, BC, Canada), Microinova (Allerheiligen bei Wildon, Austria) и/или ступенчатый шевронный смеситель (SHM) (Zhigaltsev, I.V. et al. (2012) *Langmuir*. 28:3633-40; Belliveau, N.M. et al. *Mol. Ther. Nucleic. Acids*. (2012) 1:e37; Chen, D. et al. *J. Am. Chem. Soc.* (2012) 134(16):6948-51, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0622] В некоторых вариантах осуществления способы получения LNP, предусматривающие SHM, дополнительно включают смешивание по меньшей мере двух входных потоков, при этом смешивание происходит посредством индуцированной микроструктурой хаотической адвекции (MICA). В соответствии с этим методом потоки жидкости текут по каналам, расположенным в виде елочки, вызывая вращательный поток и закручивая жидкости вокруг друг друга. Этот способ может также предусматривать поверхность для смешивания жидкости, при этом поверхность меняет ориентацию во время цикла жидкости. Способы получения LNP с использованием SHM включают способы, раскрытые в публикациях патентов США №№ US2004/0262223 A1 и US 2012/0276209 A1, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

[0623] В одном варианте осуществления липидные наночастицы могут быть

получены с использованием микросмесителя, такого как без ограничения микроструктурированный смеситель с разделением потока на множество параллельных ламинарных потоков (SIMM-V2), стандартный микросмеситель с разделением потока на множество параллельных ламинарных потоков (SSIMM) или Caterpillar (CPMM) или Impinging-jet (IJMM) от Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Mainz Germany). В одном варианте осуществления липидные наночастицы получают с использованием микрофлюидной технологии (см. Whitesides (2006) *Nature*. 442: 368-373; и Abraham et al. (2002) *Science*. 295: 647-651; каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). В качестве неограничивающего примера контролируемое получение микрофлюидного состава предусматривает пассивный метод смешивания струй потоков, управляемых постоянным давлением, в микроканалах при низком числе Рейнольдса (см., например, Abraham et al. (2002) *Science*. 295: 647651; который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0624] В одном варианте осуществления *circRNA* согласно настоящему изобретению может быть составлена в виде липидных наночастиц, полученных с использованием чипа микромиксера, например без ограничения от Harvard Apparatus (Holliston, MA), Dolomite Microfluidics (Royston, UK), или Precision Nanosystems (Van Couver, BC, Canada). Чип микромиксера можно использовать для быстрого смешивания двух или более потоков жидкости с помощью механизма разделения и рекомбинации.

[0625] В одном варианте осуществления липидные наночастицы могут иметь диаметр от примерно 10 до примерно 100 нм, например без ограничения от примерно 10 до примерно 20 нм, от примерно 10 до примерно 30 нм, от примерно 10 до примерно 40 нм, от примерно 10 до примерно 50 нм, от примерно 10 до примерно 60 нм, от примерно 10 до примерно 70 нм, от примерно 10 до примерно 80 нм, от примерно 10 до примерно 90 нм, от примерно 20 до примерно 30 нм, от примерно 20 до примерно 40 нм, примерно от 20 до примерно 50 нм, от примерно 20 до примерно 60 нм, от примерно 20 до примерно 70 нм, от примерно 20 до примерно 80 нм, от примерно 20 до примерно 90 нм, от примерно 20 до примерно 100 нм, от примерно 30 до примерно 40 нм, примерно 30 до примерно 50 нм, от примерно 30 до примерно 60 нм, от примерно 30 до примерно 70 нм, от примерно 30 до примерно 80 нм, от примерно 30 до примерно 90 нм, от примерно 30 до примерно 100 нм, от примерно 40 до примерно 50 нм, от примерно 40 до от примерно 60 нм, от примерно 40 до примерно 70 нм, от примерно 40 до примерно 80 нм, от примерно 40 до примерно 90 нм, от примерно 40 до примерно 100 нм, от примерно 50 до примерно 60 нм, от примерно 50 до примерно 70 нм от примерно 50 до примерно 80 нм, от примерно 50 до примерно 90 нм, от примерно 50 до примерно 100 нм, от примерно 60 до примерно 70 нм, от примерно 60 до примерно 80 нм, от примерно 60 до примерно 90 нм, от примерно 60 до примерно 100 нм, от примерно 70 до примерно 80 нм, от примерно 70 до примерно 90 нм, от примерно 70 до примерно 100 нм, от примерно 80 до примерно 90 нм нм, от примерно 80 до примерно 100 нм и/или от примерно 90 до примерно 100 нм. В одном варианте осуществления липидная наночастица может иметь диаметр примерно от 10 до 500 нм. В одном варианте осуществления липидная

наночастица может иметь диаметр более 100 нм, более 150 нм, более 200 нм, более 250 нм, более 300 нм, более 350 нм, более 400 нм, более 450 нм., более 500 нм, более 550 нм, более 600 нм, более 650 нм, более 700 нм, более 750 нм, более 800 нм, более 850 нм, более 900 нм, более 950 нм или более 1000 нм. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

[0626] В некоторых вариантах осуществления наночастица (например липидная наночастица) имеет средний диаметр 10-500 нм, 20-400 нм, 30-300 нм или 40-200 нм. В некоторых вариантах осуществления наночастица (например липидная наночастица) имеет средний диаметр 50-150 нм, 50-200 нм, 80-100 нм или 80-200 нм.

[0627] В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы, описанные в настоящем документе, могут иметь диаметр от менее 0,1 мкм до 1 мкм, например без ограничения менее 0,1 мкм, менее 1,0 мкм, менее 5 мкм, мкм, менее 10 мкм, менее 15 мкм, менее 20 мкм, менее 25 мкм, менее 30 мкм, менее 35 мкм, менее 40 мкм, менее 50 мкм, менее 55 мкм, менее 60 мкм, менее 65 мкм, менее 70 мкм, менее 75 мкм, менее 80 мкм, менее 85 мкм, менее 90 мкм, менее 95 мкм, менее 100 мкм, менее 125 мкм, менее 150 мкм, менее 175 мкм, менее 200 мкм, менее 225 мкм, менее 250 мкм, менее 275 мкм, менее 300 мкм, менее 325 мкм, менее 350 мкм, менее 375 мкм, менее 400 мкм, менее 425 мкм, менее 450 мкм, менее 475 мкм, менее 500 мкм, менее 525 мкм, менее 550 мкм, менее 575 мкм, менее 600 мкм, менее 625 мкм, менее 650 мкм, менее 675 мкм, менее 700 мкм, менее 725 мкм, менее 750 мкм, менее 775 мкм, менее 800 мкм, менее 825 мкм, менее 850 мкм, менее 875 мкм, менее 900 мкм, менее 925 мкм, менее 950 мкм, менее 975 мкм.

[0628] В другом варианте осуществления LNP могут иметь диаметр от примерно 1 нм до примерно 100 нм, от примерно 1 нм до примерно 10 нм, от примерно 1 нм до примерно 20 нм, от примерно 1 нм до примерно 30 нм, от примерно 1 нм до примерно 40 нм, от примерно 1 нм до примерно 50 нм, от примерно 1 нм до примерно 60 нм, от примерно 1 нм до примерно 70 нм, от примерно 1 нм до примерно 80 нм, от примерно 1 нм до примерно 90 нм, от примерно 5 нм до примерно 100 нм, от примерно 5 нм до примерно 10 нм, от примерно 5 нм до примерно 20 нм, от примерно 5 нм до примерно 30 нм, от примерно 5 нм до примерно 40 нм, от примерно 5 нм до примерно 50 нм, от примерно 5 нм до примерно 60 нм, от примерно 5 нм до примерно 70 нм, от примерно 5 нм до примерно 80 нм, от примерно 5 нм до примерно 90 нм, от примерно 10 до примерно 50 нм, от примерно от примерно 20 до примерно 50 нм, от примерно 30 до примерно 50 нм, от примерно 40 до примерно 50 нм, от примерно 20 до примерно 60 нм, от примерно 30 до примерно 60 нм, от примерно 40 до примерно 60 нм, от примерно 20 до примерно 70 нм, от примерно 30 до примерно 70 нм, от примерно 40 до примерно 70 нм, от примерно 50 до примерно 70 нм, от примерно 60 до примерно 70 нм, от примерно 20 до примерно 80 нм, от примерно 30 до примерно 80 нм, от примерно 40 до примерно 80 нм, от примерно 50 до примерно 80 нм, от примерно 60 до примерно 80 нм, от примерно 20 до примерно 90 нм, от примерно 30 до примерно 90 нм, от примерно 40 до примерно 90 нм, от примерно 50 до примерно 90 нм, от примерно 60 до примерно 90 нм и/или от примерно 70 до примерно 90

нм. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

[0629] Содержащая наночастицы композиция может быть относительно гомогенной. Показатель полидисперсности можно использовать для указания на однородность содержащей наночастицы композиции, например, на распределение размера частиц содержащих наночастицы композиций. Небольшой (например менее 0,3) индекс полидисперсности обычно указывает на узкое распределение частиц по размерам. Содержащая наночастицы композиция может иметь индекс полидисперсности от примерно 0 до примерно 0,25, например 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 или 0,25. В некоторых вариантах осуществления индекс полидисперсности содержащей наночастицы композиции может составлять от примерно 0,10 до примерно 0,20. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

[0630] Дзета-потенциал содержащей наночастицы композиции можно использовать для обозначения электрокинетического потенциала композиции. Например, дзета-потенциал может описывать поверхностный заряд содержащей наночастицы композиции. Содержащие наночастицы композиции с относительно низким зарядом, положительным или отрицательным, как правило, желательны, поскольку частицы с более высоким зарядом могут нежелательно взаимодействовать с клетками, тканями и другими элементами в организме. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал содержащей наночастицы композиции может составлять от примерно -20 мВ до примерно +20 мВ, от примерно -20 мВ до примерно +15 мВ, от примерно -20 мВ до примерно +10 мВ, от примерно -20 мВ до примерно +5 мВ, от примерно -20 мВ до примерно 0 мВ, от примерно -20 мВ до примерно -5 мВ, от примерно -20 мВ до примерно -10 мВ, от примерно -20 мВ до примерно -15 мВ от от примерно -20 мВ до примерно +20 мВ, от примерно -20 мВ до примерно +15 мВ, от примерно -20 мВ до примерно +10 мВ, от примерно -20 мВ до примерно +5 мВ, от примерно -20 мВ до примерно 0 мВ, от примерно 0 мВ до примерно +20 мВ, от примерно 0 мВ до примерно +15 мВ, от примерно 0 мВ до примерно +10 мВ, от примерно 0 мВ до примерно +5 мВ, от примерно +5 мВ до примерно +20 мВ, от примерно +5 мВ до примерно +15 мВ или от примерно +5 мВ до примерно +10 мВ. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

[0631] Эффективность инкапсулирования терапевтического средства описывает количество терапевтического средства, которое инкапсулировано или иным образом связано с содержащей наночастицы композицией после приготовления, по отношению к исходному предоставленному количеству. Нужно, чтобы эффективность инкапсуляции была высокой (например близкой к 100%). Эффективность инкапсуляции можно измерить, например, путем сравнения количества терапевтического средства в растворе, содержащем композицию на основе наночастиц, до и после разрушения содержащей наночастицы композиции одним или несколькими органическими растворителями или детергентами.

Флуоресценцию можно использовать для измерения количества свободного терапевтического средства (например нуклеиновых кислот) в растворе. Для содержащих наночастицы композиций, описанных в настоящем документе, эффективность инкапсуляции терапевтического средства может составлять по меньшей мере 50%, например 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 90%. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет значение полиразнообразия менее 0,4. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет суммарный нейтральный заряд при нейтральном pH. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет средний диаметр 50-200 нм.

[0632] На свойства состава липидных наночастиц могут влиять факторы, включая без ограничения выбор катионного липидного компонента, степень насыщения катионным липидом, выбор некаатионного липидного компонента, степень некаатионное насыщение липидов, выбор структурного липидного компонента, характер пегилирования, соотношение всех компонентов и биофизические параметры, такие как размер. Как описано в настоящем документе, чистота липидного компонента PEG также важна для свойств и характеристик LNP.

12. Методы

[0633] В одном варианте осуществления состав липидных наночастиц может быть получен способами, описанными в международных публикациях №№ WO2011127255 или WO2008103276, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления составы липидных наночастиц могут быть такими, как описано в международной публикации № WO 2019131770, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0634] В некоторых вариантах осуществления кольцевую РНК готовят в соответствии со способом, описанным в заявке на патент США 15/809680. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ инкапсулирования кольцевой РНК в переносчиках, включающий этапы формирования липидов в предварительно сформированных переносчиках (то есть сформированных в отсутствие РНК) и последующего объединения предварительно сформированных переносчиков с РНК. В некоторых вариантах осуществления новый процесс приготовления приводит к получению состава РНК с более высокой активностью (экспрессией пептида или белка) и более высокой эффективностью (улучшением биологически значимого конечного результата) как *in vitro*, так и *in vivo* с потенциально лучшей переносимостью по сравнению с таким же составом РНК, полученным без этапа предварительного формирования липидных наночастиц (например путем непосредственного объединения липидов с РНК).

[00635] Для некоторых составов РНК с наночастицами катионных липидных, чтобы

достичь высокой инкапсуляции РНК, РНК в буфере (например цитратном буфере) необходимо нагревать. В этих процессах или способах требуется нагревание до процесса получения состава (то есть нагревание отдельных компонентов), поскольку нагревание после получения состава (после формирования наночастиц) не увеличивает эффективность инкапсуляции РНК в липидных наночастицах. Напротив, в некоторых вариантах осуществления новых способов согласно настоящему изобретению порядок нагревания РНК, по-видимому, не влияет на процент инкапсуляции РНК. В некоторых вариантах осуществления не требуется нагревания (то есть выдерживания при температуре окружающей среды) одного или нескольких растворов, содержащих предварительно образованные липидные наночастицы, раствора, содержащего РНК, и смешанного раствора, содержащего РНК, инкапсулированную в липидные наночастицы, до или после процесса получения состава.

[00636] РНК может быть предоставлена в растворе для смешивания с липидным раствором, так что РНК может быть инкапсулирована в липидные наночастицы. Подходящим раствором РНК может быть любой водный раствор, содержащий инкапсулируемую РНК в различных концентрациях. Например, подходящий раствор РНК может содержать РНК в концентрации примерно 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,06 мг/мл, 0,07 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,09 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл или 1,0 мг/мл или выше. В некоторых вариантах осуществления подходящий раствор РНК может содержать РНК в концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0 мг/мл, 0,01-0,9 мг/мл, 0,01-0,8 мг/мл, 0,01-0,7 мг/мл, 0,01-0,6 мг/мл, 0,01-0,5 мг/мл, 0,01-0,4 мг/мл, 0,01-0,3 мг/мл, 0,01-0,2 мг/мл, 0,01-0,1 мг/мл, 0,05-1,0 мг/мл, 0,05-0,9 мг/мл, 0,05-0,8 мг/мл, 0,05-0,7 мг/мл, 0,05-0,6 мг/мл, 0,05-0,5 мг/мл, 0,05-0,4 мг/мл, 0,05-0,3 мг/мл, 0,05-0,2 мг /мл, 0,05-0,1 мг/мл, 0,1-1,0 мг/мл, 0,2-0,9 мг/мл, 0,3-0,8 мг/мл, 0,4-0,7 мг/мл или 0,5-0,6 мг/мл.

[00637] Как правило, подходящий раствор РНК может также содержать буферное средство и/или соль. Как правило, буферные средства могут включать HEPES, Трис, сульфат аммония, бикарбонат натрия, цитрат натрия, ацетат натрия, фосфат калия или фосфат натрия. В некоторых вариантах осуществления подходящая концентрация буферного средства может находиться в диапазоне примерно от 0,1 мМ до 100 мМ, от 0,5 мМ до 90 мМ, от 1,0 мМ до 80 мМ, от 2 мМ до 70 мМ, от 3 мМ до 60 мМ, от 4 мМ до 50 мМ, от 5 мМ до 40 мМ, от 6 мМ до 30 мМ, от 7 мМ до 20 мМ, от 8 мМ до 15 мМ или от 9 до 12 мМ.

[0638] Примеры солей могут включать хлорид натрия, хлорид магния и хлорид калия. В некоторых вариантах осуществления подходящая концентрация солей в растворе РНК может находиться в диапазоне примерно от 1 мМ до 500 мМ, от 5 мМ до 400 мМ, от 10 мМ до 350 мМ, от 15 мМ до 300 мМ, от 20 мМ до 250 мМ, 30 мМ до 200 мМ, 40 мМ до 190 мМ, 50 мМ до 180 мМ, 50 мМ до 170 мМ, 50 мМ до 160 мМ, 50 мМ до 150 мМ или 50 мМ до 100 мМ.

[0639] В некоторых вариантах осуществления подходящий раствор РНК может

иметь рН в диапазоне примерно 3,5-6,5, 3,5-6,0, 3,5-5,5, 3,5-5,0, 3,5-4,5, 4,0-5,5, 4,0-5,0, 4,0-5,0, 4,9, 4,0-4,8, 4,0-4,7, 4,0-4,6 или 4,0-4,5.

[00640] Для приготовления раствора РНК, подходящего для настоящего изобретения, могут быть использованы различные способы. В некоторых вариантах осуществления РНК может быть непосредственно растворена в описанном в данном документе буферном растворе. В некоторых вариантах осуществления раствор РНК может быть получен путем смешивания маточного раствора РНК с буферным раствором перед смешиванием с липидным раствором для инкапсуляции. В некоторых вариантах осуществления раствор РНК может быть получен путем смешивания маточного раствора РНК с буферным раствором непосредственно перед смешиванием с липидным раствором для инкапсуляции.

[0641] В соответствии с настоящим изобретением липидный раствор содержит смесь липидов, подходящих для образования переносчиков для инкапсуляции РНК. В некоторых вариантах осуществления подходящий липидный раствор основан на этаноле. Например, подходящий липидный раствор может содержать смесь желаемых липидов, растворенных в чистом этаноле (то есть 100% этаноле). В другом варианте осуществления подходящий липидный раствор основан на изопропиловом спирте. В другом варианте осуществления подходящий липидный раствор представляет собой раствор на основе диметилсульфоксида. В другом варианте осуществления подходящий липидный раствор представляет собой смесь подходящих растворителей, включая без ограничения этанол, изопропиловый спирт и диметилсульфоксид.

[0642] Подходящий липидный раствор может содержать смесь нужных липидов в различных концентрациях. В некоторых вариантах осуществления подходящий липидный раствор может содержать смесь нужных липидов в общей концентрации в диапазоне примерно 0,1-100 мг/мл, 0,5-90 мг/мл, 1,0-80 мг/мл, 1,0-70 мг/мл, 1,0-60 мг/мл, 1,0-50 мг/мл, 1,0-40 мг/мл, 1,0-30 мг/мл, 1,0-20 мг/мл, 1,0-15 мг/мл, 1,0-10 мг/мл, 1,0-9 мг/мл, 1,0-8 мг/мл, 1,0-7 мг/мл, 1,0-6 мг/мл или 1,0-5 мг/мл.

13. Нацеливание

[0643] Настоящее изобретение также предусматривает избирательное нацеливание на клетки и ткани-мишени с помощью как пассивных, так и активных средств нацеливания. Феномен пассивного нацеливания использует естественные схемы распределения переносчика *in vivo*, не полагаясь на использование дополнительных вспомогательных средств или средств для улучшения распознавания переносчика клетками-мишенями. Например, переносчики, которые подвергаются фагоцитозу клетками ретикуло-эндотелиальной системы, вероятно, накапливаются в печени или селезенке и, соответственно, могут обеспечивать средства для пассивного направления доставки композиций в такие клетки-мишени.

[0644] В качестве альтернативы, настоящее изобретение предусматривает активное нацеливание, которое включает использование нацеливающих фрагментов, которые могут быть связаны (ковалентно или нековалентно) с переносчиком, чтобы стимулировать

локализацию такого переносчика в определенных клетках-мишенях или тканях-мишенях. Например, нацеливание может быть опосредовано включением одного или нескольких эндогенных нацеливающих фрагментов в переносчике или на нем, чтобы стимулировать распределение в клетках или тканях-мишенях. Распознавание нацеливающего фрагмента тканями-мишенями активно облегчает распределение в тканях и клеточное поглощение переносчика и/или его содержимого в клетках-мишенях и тканях (например включение лиганда-мишени аполипопротеина-Е в переносчик или на нем способствует распознаванию и связыванию переносчика с эндогенными рецепторами липопротеинов низкой плотности, экспрессируемыми гепатоцитами). Как предусмотрено в настоящем документе, композиция может содержать фрагмент, способный усиливать аффинность композиции к клетке-мишени. Фрагменты-мишени могут быть связаны с внешним бислоем липидной частицы во время получения или после получения состава. Эти способы хорошо известны в данной области. Кроме того, в некоторых составах липидных частиц можно использовать фузогенные полимеры, такие как PEAA, гемагглютинин, другие липопептиды (см. заявки на патент США с серийными номерами 08/835281 и 60/083294, которые включены в данный документ посредством ссылки) и другие свойства, полезные *in vivo* и/или для внутриклеточной доставки. В некоторых других вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению демонстрируют повышенную эффективность трансфекции и/или демонстрируют повышенную селективность в отношении интересующих клеток-мишеней или тканей. Таким образом, рассматриваются композиции, которые содержат один или несколько фрагментов (например пептиды, аптамеры, олигонуклеотиды, витамин или другие молекулы), которые способны повышать аффинность композиций и содержание их нуклеиновых кислот в отношении клеток или тканей-мишеней. Подходящие фрагменты могут быть необязательно связаны или связаны с поверхностью переносчика. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент может охватывать поверхность переносчика или быть инкапсулирован внутри переносчика. Подходящие фрагменты выбирают на основе их физических, химических или биологических свойств (например селективной аффинности и/или распознавания маркеров или признаков поверхности клеток-мишеней). Специфичные для клетки сайты-мишени и соответствующие им нацеливающие лиганды могут широко варьироваться. Подходящие нацеливающие фрагменты выбирают таким образом, чтобы использовать уникальные характеристики клетки-мишени, что позволяет композициям проводить различие между клетками-мишенями и клетками, не являющимися мишенями. Например, композиции согласно изобретению могут содержать поверхностные маркеры (например аполипопротеин-В или аполипопротеин-Е), которые избирательно усиливают распознавание или аффинность к гепатоцитам (например за счет опосредованного рецептором распознавания и связывания с такими поверхностными маркерами). Например, ожидается, что использование галактозы в качестве нацеливающего фрагмента направит композиции согласно настоящему изобретению на паренхиматозные гепатоциты, или, альтернативно, можно ожидать, что использование маннозосодержащих остатков сахара в

качестве нацеливающего лиганда направит композиции согласно настоящему изобретению в эндотелиальные клетки печени (например маннозосодержащих остатков сахара, которые могут предпочтительно связываться с асиалогликопротеиновым рецептором, присутствующим в гепатоцитах). (См. Hillery A M, et al. "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc.) Презентация таких нацеливающих фрагментов, которые были конъюгированы с фрагментами, присутствующими в переносчике (например липидными наночастицами), таким образом, облегчает распознавание и поглощение композиций согласно настоящему изобретению клетками и тканями-мишенями. Примеры подходящих нацеливающих фрагментов включают один или несколько пептидов, белков, аптамеров, витаминов и олигонуклеотидов.

[00645] В конкретных вариантах осуществления переносчик содержит нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент избирательно опосредует рецептор-опосредованный эндоцитоз в конкретной популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с Т-клеточным антигеном. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с НК-, NKT- или макрофагальным антигеном. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с белком, выбранным из группы CD3, CD4, CD8, PD-1, 4-1BB и CD2. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой фрагмент одноцепочечного Fv (scFv), нанотело, пептид, макроцикл на основе пептида, минитело, переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент выбран из антител с мотивом Т-клеточного рецептора, антител с α -цепью Т-клеток, антител с β -цепью Т-клеток, антител с γ -цепью Т-клеток, антител с δ -цепью Т-клеток, антител к CCR7, антител к CD3, антител к CD4, антител к CD5, антител к CD7, антител к CD8, антител к CD11b, антител к CD11c, антител к CD16, антител к CD19, антител к CD20, антител к CD21, антител к CD22, антител к CD25, антител к CD28, антител к CD34, антител к CD35, антител к CD40, CD45RA антител, антител к CD45RO, антител к CD52, антител к CD56, антител к CD62L, антител к CD68, антител к CD80, антител к CD95, антител к CD117, антител к CD127, антител к CD133, антител к CD137 (4-1BB), антител к CD163, антител к F4/80, антител к IL-4R α , антител к Sca-1, антител к CTLA-4, антител к GITR, антител к GARP, антител к LAP, антител к гранзиме В, антител к LFA-1, антител к рецептору трансферрина и их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой низкомолекулярное средство связывания эктофермента на лимфоцитах. Низкомолекулярные средства связывания эктоферментов включают ингибиторы A2A, ингибиторы CD73, CD39 или адезиновые рецепторы A2aR и A2bR. Потенциальные малые молекулы включают AB928.

[0646] В некоторых вариантах осуществления переносчики составлены и/или нацелены, как описано в Shobaki N, Sato Y, Harashima H. Смешивание липидов для

управления статусом ионизации липидных наночастиц для нацеливания на конкретные ткани. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:8395-8410. Опубликовано 10 декабря 2018 г. В некоторых вариантах осуществления переносчик состоит из 3 типов липидов. В некоторых вариантах осуществления переносчик состоит из 4 типов липидов. В некоторых вариантах осуществления переносчик состоит из 5 типов липидов. В некоторых вариантах осуществления переносчик состоит из 6 типов липидов.

14. Клетки-мишени

[00647] Когда нужно доставить нуклеиновую кислоту в иммунную клетку, иммунная клетка представляет собой клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления композиции согласно изобретению трансфицируют клетки-мишени на избирательной основе (то есть не трансфицируют клетки, не являющиеся мишенями). Композиции согласно изобретению также могут быть приготовлены для предпочтительного нацеливания на различные клетки-мишени, которые включают без ограничения Т-клетки, В-клетки, макрофаги и дендритные клетки.

[0648] В некоторых вариантах осуществления клетки-мишени дефицитны по интересующему белку или ферменту. Например, когда нужно доставить нуклеиновую кислоту в гепатоцит, гепатоцит представляет собой клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления композиции согласно изобретению трансфицируют клетки-мишени на избирательной основе (то есть не трансфицируют клетки, не являющиеся мишенями). Композиции согласно изобретению также могут быть приготовлены для предпочтительного нацеливания на различные клетки-мишени, которые включают без ограничения гепатоциты, эпителиальные клетки, гемопоэтические клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, клетки легких, костные клетки, стволовые клетки, мезенхимальные клетки, нервные клетки (например мозговые оболочки, астроциты, мотонейроны, клетки ганглиев задних корешков и мотонейронов передних рогов), фоторецепторные клетки (например палочки и колбочки), пигментированные эпителиальные клетки сетчатки, секреторные клетки, клетки сердца, адипоциты, гладкомышечные клетки сосудов, кардиомиоциты, клетки скелетных мышц, бета-клетки, клетки гипофиза, клетки синовиальной оболочки, клетки яичников, клетки яичек, фибробласты, В-клетки, Т-клетки, ретикулоциты, лейкоциты, гранулоциты и опухолевые клетки.

[0649] Композиции согласно изобретению могут быть приготовлены для предпочтительного распределения в клетках-мишенях, таких как сердце, легкие, почки, печень и селезенка. В некоторых вариантах осуществления композиции согласно изобретению распределяются в клетки печени или селезенки для облегчения доставки и последующей экспрессии содержащейся в них *circRNA* клетками печени (например гепатоцитами) или клетками селезенки (например иммунными клетками). Клетки-мишени могут функционировать как биологический «резервуар» или «депо», способный продуцировать и системно выделять функциональный белок или фермент. Соответственно, в одном варианте осуществления изобретения переносчик может быть нацелен на

гепатоциты или иммунные клетки и/или предпочтительно распределяться в клетки печени или селезенки при доставке. В одном варианте осуществления после трансфекции гепатоцитов-мишеней или иммунных клеток *circRNA*, загруженные в переносчик, транслируются, и продуцируется, выделяется и системно распределяется функциональный белковый продукт. В других вариантах осуществления местом депо для продукции белка могут служить клетки, отличные от гепатоцитов (например клетки легких, селезенки, сердца, глаз или центральной нервной системы).

[00650] В одном варианте осуществления композиции согласно изобретению способствуют эндогенной выработке субъектом одного или нескольких функциональных белков и/или ферментов. В варианте осуществления настоящего изобретения переносчики содержат *circRNA*, которые кодируют дефектный белок или фермент. После распределения таких композиций в тканях-мишенях и последующей трансфекции таких клеток-мишеней экзогенная кольцевая РНК, загруженная в переносчик (например липидную наночастицу), может транслироваться *in vivo* с образованием функционального белка или фермента, кодируемого экзогенно введенной *circRNA* (например белка или фермента, в которых субъект испытывает дефицит). Соответственно, композиции согласно настоящему изобретению используют способность субъекта транслировать экзогенно или рекомбинантно полученную *circRNA* с получением эндогенно транслируемого белка или фермента и, таким образом, продуцировать (и, где применимо, выделять) функциональный белок или фермент. Экспрессированные или транслированные белки или ферменты также могут характеризоваться включением *in vivo* нативных посттрансляционных модификаций, которые часто могут отсутствовать в рекомбинантно полученных белках или ферментах, тем самым дополнительно снижая иммуногенность транслируемого белка или фермента.

[00651] Введение *circRNA*, кодирующей дефектный белок или фермент, позволяет избежать необходимости доставки нуклеиновых кислот в определенные органеллы в клетке-мишени. Напротив, при трансфекции клетки-мишени и доставке нуклеиновых кислот в цитоплазму клетки-мишени может транслироваться содержимое кольцевой РНК переносчика и экспрессироваться функциональный белок или фермент.

[00652] В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК содержит один или несколько сайтов связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК содержит один или несколько сайтов связывания миРНК, распознаваемых миРНК, присутствующих в одной или нескольких клетках, не являющихся мишенями, или типах клеток, не являющихся мишенями (например клетках Купфера или клетках печени), и не присутствующих в одной или нескольких клетках-мишенях или типах клеток-мишеней (например гепатоцитах или Т-клетках). В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК содержит один или несколько сайтов связывания миРНК, распознаваемых миРНК, присутствующих в повышенной концентрации в одной или нескольких клетках, не являющихся мишенями, или типах клеток, не являющихся мишенями (например клетках Купфера или клетках печени) по сравнению с одной или несколькими клетками-мишенями или типами клеток-мишеней (например гепатоцитами или Т-клетками). *miRNA*, как

полагают, функционируют путем образования пар с комплементарными последовательностями в молекулах РНК, что приводит к молчанию генов.

[0653] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно изобретению избирательно трансфицируют клетки-мишени или распределяются в них (то есть не трансфицируют клетки, не являющиеся мишенями). Композиции согласно изобретению также могут быть получены для предпочтительного нацеливания на различные клетки-мишени, которые включают без ограничения гепатоциты, эпителиальные клетки, гемопоэтические клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, клетки легких, костные клетки, стволовые клетки, мезенхимальные клетки, нервные клетки (например мозговые оболочки, астроциты, мотонейроны, клетки ганглиев задних корешков и мотонейронов передних рогов), фоторецепторные клетки (например палочки и колбочки), пигментированные эпителиальные клетки сетчатки, секреторные клетки, клетки сердца, адипоциты, гладкомышечные клетки сосудов, кардиомиоциты, клетки скелетных мышц, бета-клетки, клетки гипофиза, клетки синовиальной оболочки, клетки яичников, клетки яичек, фибробласты, В-клетки, Т-клетки, ретикулоциты, лейкоциты, гранулоциты и опухолевые клетки.

15. Фармацевтические композиции

[00654] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены композиции (например фармацевтические композиции), содержащие терапевтическое средство, представленное в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой вектор, представленный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой клетку, содержащую кольцевую РНК или вектор, представленные в настоящем документе (например человеческую клетку, такую как человеческая Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый переносчик. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем документе, содержат терапевтическое средство, представленное в настоящем документе, в комбинации с другими фармацевтически активными средствами или лекарственными средствами, такими как противовоспалительные лекарственные средства или антитела, способные нацеливаться на В-клеточные антигены, например, антитела к CD20, например, ритуксимаб.

[0655] Что касается фармацевтических композиций, фармацевтически приемлемый переносчик может быть любым из обычно используемых и ограничен только химико-физическими соображениями, такими как растворимость и отсутствие реакционной способности с активным средством (средствами), а также способом введения. Описанные в данном документе фармацевтически приемлемые носители, например переносчики, адъюванты, вспомогательные средства и разбавители, хорошо известны специалистам в данной области и являются общедоступными. Предпочтительно, чтобы фармацевтически

приемлемый носитель был химически инертным по отношению к терапевтическому средству (средствам) и не обладал вредными побочными эффектами или токсичностью в условиях применения.

[0656] Выбор носителя будет частично определяться конкретным терапевтическим средством, а также конкретным способом, используемым для введения терапевтического средства. Соответственно, существует множество подходящих составов фармацевтических композиций, предложенных в настоящем документе.

[0657] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит консервант. В некоторых вариантах осуществления подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. Необязательно можно использовать смесь двух или более консервантов. Консервант или их смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% по массе от общей массы композиции.

[0658] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит буферное средство. В некоторых вариантах осуществления подходящие буферные средства могут включать, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. Необязательно можно использовать смесь двух или более буферных средств. Буферное средство или их смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% по массе от общей массы композиции.

[0659] В некоторых вариантах осуществления концентрация терапевтического средства в фармацевтической композиции может варьироваться, например, менее примерно 1% или по меньшей мере примерно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или примерно 50% или более по массе, и может быть выбрана в первую очередь по объемам жидкости, и вязкости в соответствии с выбранным конкретным способом введения.

[0660] Следующие составы для перорального, аэрозольного, парентерального (например подкожного, внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, внутрикожного, внутрибрюшинного и подоболочечного) и местного введения являются лишь иллюстративными и никоим образом не ограничивающими. Для введения терапевтических средств, представленных в настоящем документе, можно использовать более одного пути, и в некоторых случаях конкретный путь может обеспечить более немедленный и более эффективный ответ, чем другой путь.

[0661] Составы, подходящие для перорального введения, могут состоять или представлять собой (a) жидкие растворы, например, эффективное количество терапевтического средства, растворенного в разбавителях, таких как вода, физиологический раствор или апельсиновый сок; (b) капсулы, саше, таблетки, таблетки для рассасывания и троше, каждая из которых содержит заданное количество активного ингредиента в виде твердых веществ или гранул; (в) порошки; (d) суспензии в соответствующей жидкости; и (e) подходящие эмульсии. Жидкие составы могут включать

разбавители, такие как вода и спирты, например, этанол, бензиловый спирт и полиэтиленовые спирты, с добавлением или без добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества. Капсулы могут быть обычными желатиновыми с твердой или мягкой оболочкой, содержащими, например, поверхностно-активные вещества, смазывающие вещества и инертные наполнители, такие как лактоза, сахароза, фосфат кальция и кукурузный крахмал. Таблетированные формы могут включать лактозу, сахарозу, маннит, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, микрокристаллическую целлюлозу, гуммиарабик, желатин, гуаровую камедь, коллоидный диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, тальк, стеарат магния, стеарат кальция, стеарат цинка, стеариновую кислоту и другие вспомогательные средства, красители, разбавители, буферные средства, разрыхлители, увлажняющие средства, консерванты, ароматизаторы и другие фармакологически совместимые вспомогательные средства. Таблетки для рассасывания могут включать терапевтическое средство с ароматизатором, обычно сахарозой, аравийской камедью или трагакантом. Пастилки могут содержать терапевтическое средство на инертной основе, такое как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь, эмульсии, гели и тому подобное, в дополнение к таким вспомогательным средствам, которые известны в данной области.

[0662] Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства, представленные в настоящем документе, можно вводить в физиологически приемлемом разбавителе в фармацевтическом носителе, таком как стерильная жидкость или смесь жидкостей, включая воду, физиологический раствор, водную декстрозу и родственные растворы сахаров, спирт, такой как этанол или гексадециловый спирт, гликоль, такой как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, диметилсульфоксид, глицерин, кетали, такие как 2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанол, простые эфиры, поли(этиленгликоль) 400, масла, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот или глицериды, или ацетилированные глицериды жирных кислот с добавлением или без добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, такого как мыло или детергент, суспендирующего средства, такого как пектин, карбомеры, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза, или эмульгаторов и других фармацевтических адъювантов.

[0663] Масла, которые можно использовать в парентеральных составах в некоторых вариантах осуществления, включают вазелин, животные масла, растительные масла или синтетические масла. Конкретные примеры масел включают арахисовое, соевое, кунжутное, хлопковое, кукурузное, оливковое, вазелиновое и минеральное масло. Подходящие жирные кислоты для использования в парентеральных составах включают

олеиновую кислоту, стеариновую кислоту и изостеариновую кислоту. Этилолеат и изопропилмиристан являются примерами подходящих сложных эфиров жирных кислот.

[0664] Подходящие мыла для использования в некоторых вариантах осуществления парентеральных составов включают соли жирных щелочных металлов, аммония и триэтаноламина, а подходящие детергенты включают (а) катионные детергенты, такие как, например, диметилдиалкиламмонийгалогениды и галогениды алкилпиридиния, (b) анионные детергенты, такие как, например, алкил, арил и олефиновые сульфонаты, алкил, олефин, эфир и моноглицеридсульфаты и сульфосукцинаты, (с) неионогенные детергенты, такие как, например, жирный аминоксиды, алканоламины жирных кислот и сополимеры полиоксиэтилена и полипропилена, (d) амфотерные детергенты, такие как, например, алкил-β-аминопропионаты и четвертичные аммониевые соли 2-алкилимидазолина, и (е) их смеси.

[00665] В некоторых вариантах осуществления парентеральные составы будут содержать, например, от примерно 0,5% до примерно 25% по массе терапевтического средства в растворе. Можно использовать консерванты и буферы. Чтобы свести к минимуму или устранить раздражение в месте инъекции, такие композиции могут содержать одно или несколько неионогенных поверхностно-активных веществ, имеющих, например, гидрофильно-липофильный баланс (HLB) от примерно 12 до примерно 17. Количество поверхностно-активного вещества в таких составах обычно составляет, например, от примерно 5% до примерно 15% по массе. Подходящие поверхностно-активные вещества включают полиэтиленгликоль, сорбитан, сложные эфиры жирных кислот, такие как моноолеат сорбитана, и высокомолекулярные аддукты этиленоксида с гидрофобным основанием, образованные конденсацией пропиленоксида с пропиленгликолем. Парентеральные составы могут быть представлены в однократных или многократных запечатанных контейнерах, таких как ампулы или флаконы, и могут храниться в лиофилизированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого вспомогательного средства, например воды, для инъекций, непосредственно перед применением. Растворы для инъекций и суспензии для немедленного приема можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных ранее.

[00666] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предусмотрены инъекционные составы. Требования к эффективным фармацевтическим носителям для инъекционных композиций хорошо известны специалистам в данной области (см., например, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., стр. 238-250). (1982) и Справочник ASHP по инъекционным наркотикам, Toissel, 4-е изд., стр. 622-630 (1986)).

[00667] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предусмотрены составы для местного применения. Составы для местного применения, в том числе те, которые пригодны для чрескожного высвобождения лекарственного средства, подходят в контексте определенных вариантов осуществления, представленных в

настоящем документе, для нанесения на кожу. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство отдельно или в сочетании с другими подходящими компонентами может быть приготовлено в виде аэрозольных составов для введения посредством ингаляции. Эти аэрозольные составы могут быть помещены в приемлемые газы-вытеснители под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и тому подобное. Они также могут быть получены в виде фармацевтических средств для составов без давления, например, в небулайзере или распылителе. Такие составы в виде спрея также можно использовать для распыления на слизистую оболочку.

[00668] В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства, представленные в настоящем документе, могут быть приготовлены в виде комплексов включения, таких как комплексы включения циклодекстрина, или липосом. Липосомы могут служить для нацеливания терапевтических средств на конкретную ткань. Липосомы также можно использовать для увеличения периода полужизни терапевтических средств. Для приготовления липосом доступно множество способов, описанных, например, в Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9, 467 (1980) and U.S. Patents 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, and 5,019,369.

[0669] В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства, представленные в настоящем документе, составлены в виде систем доставки с медленным высвобождением, отсроченным высвобождением или пролонгированным высвобождением, так что доставка композиции происходит до и с достаточным временем, чтобы вызвать сенсбилизацию подлежащего лечению участка. Такие системы позволяют избежать повторного введения терапевтического средства, повышая тем самым удобство для субъекта и врача, и могут быть особенно подходящими для некоторых вариантов осуществления композиции, представленных в настоящем документе. В одном варианте осуществления композиции согласно изобретению составлены таким образом, что они подходят для пролонгированного высвобождения содержащейся в них *circRNA*. Такие композиции с пролонгированным высвобождением можно удобно вводить субъекту с увеличенными интервалами дозирования. Например, в одном варианте осуществления композиции согласно настоящему изобретению вводят субъекту два раза в день, ежедневно или через день. В одном варианте осуществления композиции согласно настоящему изобретению вводят субъекту два раза в неделю, один раз в неделю, каждые десять дней, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, один раз в месяц, каждые шесть недель, каждые восемь недель, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые шесть месяцев, каждые восемь месяцев, каждые девять месяцев или ежегодно.

[00670] В некоторых вариантах осуществления белок, кодируемый полинуклеотидом согласно изобретению, продуцируется клеткой-мишенью в течение продолжительного времени. Например, белок может продуцироваться в течение более одного часа, более четырех, более шести, более 12, более 24, более 48 часов или более 72 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления полипептид экспрессируется на пиковом уровне примерно через шесть часов после введения. В некоторых вариантах

осуществления экспрессия полипептида поддерживается по меньшей мере на терапевтическом уровне. В некоторых вариантах осуществления полипептид экспрессируется по меньшей мере на терапевтическом уровне в течение более одного, более четырех, более шести, более 12, более 24, более 48 или более 72 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления полипептид обнаруживается на терапевтическом уровне в ткани пациента (например в печени или легком). В некоторых вариантах осуществления уровень детектируемого полипептида зависит от непрерывной экспрессии композиции *circRNA* в течение периодов времени более одного, более четырех, более шести, более 12, более 24, более 48 или более 72 часов после введения.

[00671] В некоторых вариантах осуществления белок, кодируемый полинуклеотидом согласно изобретению, продуцируется на уровнях выше нормальных физиологических уровней. Уровень белка может быть повышен по сравнению с контролем. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой исходный физиологический уровень полипептида у нормального индивидуума или в популяции нормальных индивидуумов. В других вариантах осуществления контроль представляет собой исходный физиологический уровень полипептида у индивидуума с дефицитом соответствующего белка или полипептида или у группы индивидуумов с дефицитом соответствующего белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления контроль может представлять собой нормальный уровень соответствующего белка или полипептида у индивидуума, которому вводят композицию. В других вариантах осуществления контроль представляет собой уровень экспрессии полипептида при другом терапевтическом вмешательстве, например, при прямой инъекции соответствующего полипептида в один или несколько сопоставимых моментов времени.

[00672] В некоторых вариантах осуществления уровни белка, кодируемого полинуклеотидом согласно изобретению, обнаруживаются через 3 дня, 4 дня, 5 дней или 1 неделю или более после введения. Повышенный уровень белка может наблюдаться в ткани (например в печени или легком).

[0673] В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает устойчивый период полужизни в циркуляции белка, кодируемого полинуклеотидом согласно изобретению. Например, белок можно обнаружить на несколько часов или дней дольше, чем период полураспада, наблюдаемый при подкожной инъекции белка или мРНК, кодирующей белок. В некоторых вариантах осуществления период полураспада белка составляет 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней или 1 неделю или более.

[0674] Многие типы систем доставки высвобождения доступны и известны специалистам в данной области. Они включают системы на основе полимеров, такие как поли(лактид-гликолид), сополиоксалаты, поликапролактоны, полиэфирамиды, полиортоэфиры, полигидроксимасляная кислота и полиангидриды. Микрокапсулы вышеуказанных полимеров, содержащие лекарства, описаны, например, в патенте США 5075109. Системы доставки также включают неполимерные системы, которые представляют собой липиды, включая стеролы, такие как холестерин, сложные эфиры

холестерина и жирные кислоты или нейтральные жиры, такие как моно-ди- и триглицериды; системы высвобождения гидрогеля; силастические системы; системы на основе пептидов: восковые покрытия; прессованные таблетки с использованием обычных связующих веществ и наполнителей; частично слитые имплантаты; и тому подобное. Конкретные примеры включают без ограничения: (а) эрозионные системы, в которых активная композиция содержится в форме в матрице, такой как описанные в патентах США 4,452,775, 4,667,014, 4,748,034 и 5,239,660, и (b) диффузионные системы в в котором активный компонент проникает с регулируемой скоростью из полимера, такого как описано в патентах США 3832253 и 3854480. Кроме того, могут использоваться аппаратные системы доставки на основе помп, некоторые из которых адаптированы для имплантации.

[00675] В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство может быть конъюгировано прямо или косвенно через связывающий фрагмент с нацеливающим фрагментом. Способы конъюгации терапевтических средств с молекулами-мишенями известны в данной области. См., например, Wadwa et al., J, Drug Targeting 3:111 (1995) и патент США 5,087,616.

[0676] В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства, представленные в настоящем документе, составлены в форме депо, так что способ, которым терапевтическое средство высвобождается в организм, в который его вводят, контролируется в отношении времени и местоположения в организме, см., например, патент США 4450150). Депо-формы терапевтических средств могут представлять собой, например, имплантируемую композицию, содержащую терапевтические средства и пористый или непористый материал, такой как полимер, где терапевтические средства инкапсулированы в материал или диффундируют по всему материалу и/или за счет разложения непористого материала. Затем депо имплантируют в нужное место в организме, и терапевтические средства высвобождаются из имплантата с заданной скоростью.

16. Терапевтические методы

[00677] В некоторых аспектах в настоящем документе предложен способ лечения и/или профилактики состояния, например, аутоиммунного заболевания или рака.

[0678] В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства, представленные в настоящем документе, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (например в одной и той же фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях). В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство, представленное в настоящем документе, можно вводить первым, а одно или несколько дополнительных терапевтических средств можно вводить вторыми, или наоборот. Альтернативно, терапевтическое средство, представленное в настоящем документе, и одно или несколько дополнительных терапевтических средств можно вводить одновременно.

[0679] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим, упомянутым в настоящем документе, может быть любое млекопитающее, включая без ограничения

млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, или млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики. Млекопитающие могут быть из отряда Carnivora, включая Felines (кошки) и Собачийс (собаки). Млекопитающие могут быть из отряда Artiodactyla, включая крупный рогатый скот (коров) и кобанов (свиней), или из отряда Perssodactyla, включая лошадиных (лошадей). Млекопитающие могут относиться к отряду Primates, Ceboids, или Simoids (обезьяны) или к отряду Anthropoids (люди и человекообразные обезьяны). Предпочтительно млекопитающим является человек.

17. Последовательности

Таблица 17. Последовательности IRES.

SEQ ID NO	IRES	Последовательность
1	EMCV-A	ccccctctccctccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtt tgtctatatgtattttccaccatattgccgtcttttgcaatgtgagggcccgaaacctggccctg tcttcttgacgagcattcctaggggtctttccctctcgcaaaggaatgcaaggctgttgaatgt cgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaacaacgtctgtagcgaccctttgca ggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcgcgccaaaagccacgtgtataagat acacctgcaaagggcgacacacccagtgccacgtgtgagttggatagttgtggaagagtc aaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtat gggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaacgtcta ggccccccgaaccacggggacgtggtttcctttgaaaacacgatgataataggccacaacc
2	EMCV-B	ctccccctcccccttactatactggccgaagccacttgaataaggccggtgtgcgtttgtct acatgctattttctaccgcattaccgtcttatggtaatgtgagggctccagaacctgaccctgtctctt gacgaacactcctaggggtctttccctctcgacaagaggagtgaaggctgttgaatgtcgtga aggaagcagttcctctggaagcttctaaagacaacaacgtctgtagcgaccctttgcaggcag cggaacccccacctggtgacaggtgcctctcgcgccaaaagccacgtgtataagatacact gcaaagggcgacacacccagtgccacgtgtgagttggatagttgtggaagagtcfaatgg ctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggat ctgatctggggcctcggtgcacgtgctttacacgtgttgagtcgaggtgaaaaacgtctaggcc ccccgaaccacggggacgtggtttcctttgaaaaccacgattacaat
3	EMCV-Bf	ttgccagtctgctcgatcgcaggctgggtccgtgactaccactcccccttcaacgtgaagg ctacgatagtccagggcgggtactgccgtaagtccaccccaacaacaacaacaaacaa actccccctcccccttactatactggccgaagccacttgaataaggccggtgtgcgtttgtc tacatgctattttctaccgcattaccgtcttatggtaatgtgagggctccagaacctgaccctgtctct tgacgaacactcctaggggtctttccctctcgacaagaggagtgaaggctgttgaatgtcgtga aggaagcagttcctctggaagcttctaaagacaacaacgtctgtagcgaccctttgcaggcag cggaacccccacctggtgacaggtgcctctcgcgccaaaagccacgtgtataagatacact gcaaagggcgacacacccagtgccacgtgtgagttggatagttgtggaagagtcfaatgg ctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggat ctgatctggggcctcggtgcacgtgctttacacgtgttgagtcgaggtgaaaaacgtctaggcc ccccgaaccacggggacgtggtttcctttgaaaaccacgattacaat
4	EMCV-Cf	ttgccagtctgctcgatcgcaggctgggtccgtgactaccactcccccttcaacgtgaagg ctacgatagtccagggcgggtactgccgtaagtccaccccaacaacaacaacccccct ctccctccTccccctaacttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtc

		tatatgtattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtctt ctfgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgt gaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaacaacgtctgtagcaccctttgcagg cagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcgggccaaaagccacgtgtataagatac acctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaa atggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatg ggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtttagtcgaggttaaaaaacgtctag gcccccgaaaccacggggacgtggtttctttgaaaaacacgatgataat
5	EMCV pEC9	cccccccctaactgtactggccgaagccgcttggaaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgtt atttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtctcttgacg agcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaagga agcagttcctctggaagcttctgaagacaacaacgtctgtagcaccctttgcaggcagcgg aacccccacctggcgacaggtgcctctcgggccaaaagccacgtgtataagatacacctgca aaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctct cctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctga tctggggcctcggtgcacatgctttacatgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccg aacccacggggacgtggtttctttgaaaaacacgatgataat
6	Picobirnavirus	gtaaattaatgctatttaciaaaattaaacagaaaggagagatgttatgaaccggtttacaaggtt tcatacatcgaaaatagcactacctggggcagccgacacactaacatcgtctgtttaaccagaag tgttactgaaaggaggttat
7	HCV QC64	acctgcccctaataagggcgacactccgcatgaatcactcccctgtgaggaactactgtcttca cgcagaaagcgtctagccatggcgtagtatgagtgctgacagcctccaggccccccctcc gggagagccatagtggtctcggaaccggtgagtaaccggaattgccgggaagactgggtc ctttcttgataaacactctatgcccggacattggggcgtgccccgcaagactgctagccga gtagcgttgggttgcgaaaggccttgggtactgcctgatagggtgcttgcgagtgccccggga ggtctcgtagaccgtgcatc
8	Человеческий Cosavirus E/D	ctacaagctttgtgtaacaaacttttggcttttcaagcttctctacatcaggccccaaaga tgtcctgaaggtaccccgtgtatctgaggatgagcaccatcgactacccggacctgcaaaat gcaaacgcatgtggtatcccagccccctctctcggggagggggctttgctcactcagcag gatctgatcaggagatccacctccggtgctttacaccggggcgtggattaaaaattgcccaagg cctggcgcaaacctaggggactaggtttcttataatftaaagctgtcaat
9	Человеческий Cosavirus F	gtcttaggacgacgcatgtggatcccagccccgctacattggcgggggctttgaaagcacc agacactggatctgatcaggaggaggtagctgctttacagcccctttaaattgcccaaggt ccggccaccaacctaggggactaggtttctttatfttaattgtcatt
10	Человеческий Cosavirus JMY	acatgggggagactgcatgtggcagcttgaacgtgtggttgacgtctaccttatatggcagtg ggtggagtagtcaaaagatgtaccgtgctttacacggttttgaacccacaccggctgtttgac gctcgtagggcagcaggtttatfttaaaattcttactttctagctgatgattctatcagcag acggagtatactcccgttcttctggacaggtgcctccagcccttgggtatctaaaggtgac caagtactgggttggaggtgaagatagagagtcctcttgggaatgcatgtggctgtccagg gggttagcagatgccattcgtgtgctgagattctctctggtgacacgagcctcagggc aaagccccgtccgaaaggaccgaatgtggagtgaccctgactccccctgcatagttttgga ttaggaactgaggaattctgtcataatctctatcacatcaggccccaaagatgtcctgaaggta ccctgttatctgaggatgagcaccaccgactacccggactgcatagcagacacatgtgggtg cccagccccacttctcagaggtggggcttctcactcagcagagatctgatcaggagccc gctcgtgtgctttacactcgacgcggggttaaaattgcccaaggcctggcacaacaacctagg

		ggactaggtttctattttgtaaattatgtcaat
11	Rhinovirus NAT001	gtgacaatcagccagattgftaacgggtcaagcacttctgtttccccgggtacccttgatacgcctca cccgaggcgaaaagtgaggttatcgttatccgcaaagtgcctacgagaagcctagtagcactttt gaagcctatggctggctcgtcaactgtttaccagcagtagacctggcagatgaggctagatgtt ccccaccagcgtggtgatctagcctgcgtggctgcctgcacactctattgagtgtgaagccag aaagtggacaaggtgtgaagagcctattgtgctcactttgagctcctccggcccctgaatgtggct aatcctaaccgtagctgttgcataatccaacatgtctgcagctgaatgggcaactatggga tggaaaccaactcttgggtgtccgtgtttctgttttctttatgcttgcttatggtgacaactgtagt attacattgttacc
12	HRV14	ttaaacagcggatgggtatcccaccattcgaccattgggtgtagtactctggtactatgtacctt tgfacgcctgtttctcccaaccaccttctttaaattcccaccatgaaacgttagaagcttgac attaaagtacaataggtggcgccatatccaatgggtgtctatgtacaagcacttctgtttcccaggag cgaggtataggctgtaccactgcaaaagccttaaccgttatccgcaaccaactacgtaaca gtagtagcattctgttctgactggacgttcgatcaggtggattttccctccactagtttgctgatg aggctaggaattcccacgggtgaccgtgtcctagcctgcgtggcgccaaccagcttatgct gggacgccccttaaggacatgggtgtgaagactcgcagtgcttgggtgtgagctcctccggcccc tgaatgggctaaccctaaccctagagccttatgccagatccagtggttgaaggtcgaatgag caattccgggacgggaccgactacttgggtgtccgtgtttctattttctcatattgtcttatggct acagcatatatacatatactgtgatc
13	HRV89	ttaaactgggagtgggtgttcccactcactccaccatgcgggtgtgactctgttattacggtaa ctttgtacgccagttttcccaccttcccataatgtaactagaagttgtacaatatgaccaatag gtgacaatcatccagactgtcaaagggtcaagcacttctgtttccccgggtcaatgaggatagcttta ccaaggcaaaaaccttagagatcgttatcccacactgcctacacagagcccagtagcattttt gatataattgggttggctgcctcctgcaaaccagcagtagacctggcagatgaggctggacatt ccccactggcgacagtgggtccagcctgcgtggctgcctgctcacccttcttgggtgagaagcct aattattgacaaggtgtgaagagccgcgtgtcagtgcttctcctccggcccctgaatgtggct aacctaaccctgcagccgttcccataatccaatgggttgcggctgtaatgcgtaagtgcggg atgggaccaactacttgggtgtccgtgtttctgttttctttgattgcatttatggtgacaattata gtgtatagattgtcatc
14	HRVC-02	ttaaactgggtacaggtgttcccactgtatcaccacgtgggtgtgctctgtattccggta cacttgacgcccagtttgcaccctcaccctgcgtaacttagaagctaaactcgaccaacag gcgggtgtaaacataccacttacggtaagcactcctgtttccccgggtatgcgaggaatagact cctacaggggtgaagcctcaagatcgttatccgattggtactacgcaaagcttagtagtgcctt gaaagtcccttgggtgctcctcctagttcccctagtagacctggcagatgaggcaggacac tcccactggcgacagtggctcctgcctgcgtggctgcctgcgacccttaggggtgcaagcc aagtgacagacaaggtgtgaagagcccgtgtgctaccaatgagctcctccggcccctgaatgc ggctaatecaacccacagctattgcacacaagccagtgatgtagtgcgaatgagcaattgt gggacggaaccgactacttgggtgtccgtgtttctttattcttattctgcttatggtgacaat actgtgaaatagttgttacc
15	HRV-A21	taaaactggatccaggtgttcccactggatctcctattgggagttgactctattattccggtaatt ttgtacgccagttttatcttcccctcccataatgtaactagaaggttatcaatacgaccaataggt ggtagttagccaaactacaaaggtcaagcacttctgtttccccgggtcaaaagttgatagctccaa cagggcaaaaactagatcgttatccgcaaagtgctacgcaaagcctagtaacaccttg aagattatgggtgctcctcctatttccatagtagacctggcagatgaggctagaaatcccc cactggcgacagtgtctagcctgcgtggctgcctgcgacccttgggtgcaagccatacat

		<p>tggacaaggtgtgaagagccccgtgtgctcactttgagtcctccggcccctgaatgtggctaacc ttaaccctgcagctagtgcatgtaatccaacatgttgctagtcgtaatgagtaattgcgggacggg accaactactttgggtgtccgtgttccactttttcctttaatattgcttatggtgacaatatatagcta tatatattgacacc</p>
16	Salivirus A SH1	<p>ttcccctgcaaccattacgcttactcgcattgtgagtggtgcatgtgtgaacaaacagctac actcacatggggggcgggttttcccgcctacggcttctcgcgaggcccaccctcccctttctcc cataactacagtgtttgtaggtaagcatcctgatccccgcggaagctgctcacgtggcaact gtggggaccagacaggttatcaaaaggcaccggctttccgccttcaggagtatccctgctag cgaattctagtagggctctgcttgggtccaacctccccaaatgcgcgctgcccggagtgctcttc cccaactcaccctagatcctctcatgtgtgtgcttgggtcagcatatctgagacgatgtccgctgt cccagaccagtccagtaatggacggccagtgctgctgtagcttccgcttgcggcgcgat gtttggtgaaccgggtggggtgtaagggtggtggtgcccacgcccgtactcaggggatacctcaagg caccaggaatgccagggaggtaccccgttcacagcgggatctgacctggggtaaatgtct gccccgggtcttctggcccacttctcagacttttcagg</p>
17	Salivirus FHB	<p>acatgggggggtctcgggacggcttcggcccaccgcgacaagaatgccgtcatctgtcctcatt accgtattccttcccctccccgcaaccaccacgcttactcgcgcacgtgttgagtgccacgtg cgtgttccaaacagctacaccacaccttcggggcgggtttgtcccgcctcgggttctctcgc ggaacccccctcccctctctcttctatccgcctcacttccataactacagtgtttgtagg tgagcaccctgacccccgcggaagctgtaacgtggcaactgtggggatccaggcaggttat caaaggcaccgggtctttccgccttcaggagtatctgcccgggtgaattccggtagggctctgctt ggtgccaacctccccaaatgcgcgctgcccggagtgcttccccaaactcatcttagtaacctct catgtgtgtgcttgggtcagcatatctgaggcgacgttccgctgtcccagaccagtccagcaatgg acgggccagtgctgtagctgcttccgggtttccggcgcgatgttggcgaaacgctgaggtgaa gttgggtgcccacgcccgaatttgggtgatacctcaagaccaccaggaatgccagggaggt accccacttcgggtgggatctgacctgggctaattgtctacgggtgttcttcttcttccacttctctt tttctggcatg</p>
18	Salivirus NG- J1	<p>tatggcaggcgggctgtggacggcttcggcccaccacagcaagaatgcatcatctgtcctc acccccaaatcttccccttcccctgcaaccattacgcttactcgcattgtgagtggtgcatg tgtgaacaaacagctacactcacatggggggcgggttttcccgcctacggcctctcgcgaggc ccacccttccccttataactacagtgtttgtaggtaagcactcctgatccccgcggaag ctgctcacgtggcaactgtggggaccagacaggttatcaaaaggcaccggctttccgccttc aggagtatccctactagtaattctagcggggctctgcttgggtccaacctccccaaatgcgcg ctgcccggagtgcttccccaaactcacctagatcctctcatgtgtgtgcttgggtcagcatatctg agacgatgtccgctgtcccagaccagtccagtaatggacggccagtgctgtagctgcttcc ggcttgcggggcatgtttggtgaaccgggtgggtaagggtggtggtgcccacgcccgtacttt ggtgacacctcaagaccaccaggaatgccagggaggtaccccactcacgggtgggatctga ccctgggctaattgtctacgggtgttcttcttcttccacttcttcttctgttcacg</p>
19	Человеческий Parechovirus 1	<p>tttgaagggtctcctagagagcttggccgtcgggccttataccccgacttctgagtttctcta ggagagcccctttcccagccctgaggcggctggtcaataaaagcctcaaacgtaactaacct aagaagatcatgaaacctatgcctggtctccactattcgaaggcaacttgaataagaagagt gggatcaagacgctaaagcatagagacagtttcttttctaacccacatttgtgtggggtggcag atggcgtgcataacttaatagtgagataaccacgcttgtggacctatgtcacacagccatcct ctagtaagtttgtagacgtctggtgacgtgtgggaacttattggaaacaacatttctgcaaa catcctactgccagcggaaaaacacctgtaacaggtgcctctggggccaaaagccaaggtt aacagacctttaggattggttctaaacctgagatgttgggaagatatttagtacctgctgatctg</p>

		gtagttatgcaaactagttgtaaggcccatgaaggatgccagaaggtaccgtaggtaaca agtgacactatggatctgattggggccagatacctctatcttggatctggttaaaaaacatcta atgggccaacccgggggggatccccggttctcttattctatcaatgccact
20	Crohivirus B	gtataagagacaggtgttgccttgcctcggactggcatcttgggaccaacccccctttccca gcatgggtaaatggcaataaaggacgtaacaactttgtaaccattaagcttgaatgtgtaacc actaagcttgtgcacataatgtaaccatcaagctttagtcccagcaggaggttgcattgctgt agccgaaatggggctcgacccccatagtaggatactgatttgcattccattgtggacctgcaa actctacacatagaggcttgccttgcactaaacacctgagtagctgtgtacctagaccctatag tacgggaggaccgttgttctcaataaccctacataataggctaggtgggcatgccaattgca aagatcccagactggggctggctcggcagggttagatccctgtagctactgctgataggg tggtgctcaaccatgtgtagttaaattgagctgttcatatacc
21	Yc-3	actgaagatcctacagtaactactgccccaatgaacgccacagatgggtctgctgatgactacct atcttagtgctagttgagttgaaagtgagccggttttgaagaaccagtttctgaacattatcatc cccagcatctattctatacgcaagaatagatagctatcagcagacacatctgtgctactgctgat agagttgctggctggtaacttagattggtataaccagttgagtgga
22	Rosavirus M-7	tatgcatcactggacggcctaacctcggctcgtggcttcttgcgattcagcgtaccaggcttct ggctcggcaggcgttgattagtaggtgactgtctaaagtgaagacagcagtgctctctgtgaaa agttgatgacactctcaggtttagcgtactcaaggctagcggattccccgtggtgtaaca cacgcctctaggccagaaggcacggtgttgacagcacccttgagtggtgcttccccacc agcactgatttggattctcctagtaacggacaagcatggctgctttaaagcattcagtgctc cggggctgaaggatgccagaaggatcccgcaggtaacgataagctcactgtggatctgatct ggggctcggggctgggtgtcttccaccagccaaaacccgtaaacggtagtcgcagttaaa aaacgtctaggccccccccccaggatggggggttcccttaaacctcacaagtcaac
23	Shanbavirus A	tgaaaagggggcgagggtggtggtggttactaaataaccaccatcgcctgcacttccctttc ccctgtggctcagggtcacttagcccccttgggttaccagtagtttctacccctgggcacag ggtaactatgcaagacggaacaacaatctttagtccccctcggcagatagggctcagcccc catgtgtaggagtgataaggacggagtgagccgatacggggaagagtgctcgggtcacacc ttaattccatgagcgtcgaagaaggaagctggaacaatggcgacctgaaccgtacacatgg agctccacaggcatgtactcgttagactacgcagcctggtgggagtggggtataacctgggtg agccgccagtgatggagttcactggtaacacacactgcctgatagggtcagggcctcctgt ccccgccgtaatgaggttagaccatagcc
24	Pasivirus A	gctggctggatattctggcctgcaactgctttgaccagtggtctgggtaacttagccaaagtgt ccttcccttccctattatgtttatggcttctggtctttagttatataaagatccttccg ccgatatagacctcgacagctagtgtaggaggttggatattaattgccccagaagagtga ccgtgacacatagaaccatgagtagatgtgtatccgtggaggatcgggggactggattcca tateccattgccatccaacaagcggagggtataccactatgtgcacgtctgagtgaggagtct gcagatttagtactgctgatagggtgtggcctgcactctggggactcaggctgtttatata at
25	Pasivirus A 2	gctggacttctggctcgcgaactgcttttaaccagtggtctgggttacttagccaaaacccctt tccccgacctagttgtgtgtattattttgttggttttgtaaaatttatataagatccttccg ccgatatagacctcgacagctagtgtaggaggttggatattaatgccccagaagagtga ccgtgacacatagaaccatgagtagatgtgtatccgtggaggatcgggggactggattcca tateccattgccatccaacaacggagggtataccgctatgtgcgcgtctacagtggaatct gtagatttagtactgctgatagggtgtggcctgcactctggggactcaggctgtttatata at

26	Echovirus E14	<p>ttaaaacagcctgtgggtgttcccatccacagggcccactgggcgccagcactctggtattgcg gtacctagtgcgctgtttatataaccgcccccaacgtaacttagacgcgatgcaacgaaga ccaatagtaagcgcagcacaccagctgtgtccgggtcaagcacttctgttaccgggaccgagt atcaataagctactcacgtggctgaaggagaaaacgttcgttaccgaccaattacttcaagaaa cctagtaacacccatgaaggtgctgcagtggttcgctccgcacaaccccagtgtagatcaggctga tgagtcaccgcattccccacgggtgaccgtggcggtggctgcgctggcggcctgccatggg gaaacccatgggacgctcaactgacatggtgcaagagtctattgagctaattggtagtctc cggccccctgaatgctgtaactcctaactgaggagcagataccacacaccagtgggcagctg tcgtaacgggcaactctgcagcggaaaccgactacttgggtgtccgtgtttctttatccttact ggctgcttatggtgacaattgagagattgtaccatagctattggattggccatccgggtgacaaa tagagcaattgtgtattgtttgttggttcgtgccattaaattacaaggttctaaacaccctaatctta ttatagcattcaacacaacaaa</p>
27	Человеческий Parechovirus 5	<p>gtacattagatgcgtcatctgcaactttagcaataaattacctccaatgtcattaccaacattcccta cctttcactaacctaaagacaacaagtacctatgctggtctccactattcgaaggcaacttgca ataagaagagtggaattaagacgcttaaagcatagagctagtattcttttaaccacaaagttt gtgggtggcagatggctgcccataactctattagtgagataccatgctgtggtatctatgctca cacagccatcctctagtaagtgataaggtgtctggtgatgtgggaactcatgaaccattaat ttaccgtaaggatcctatagccagcggaaatcacatctggtgacagatgcctctggggccgaaa gccaaggtttaacagaccctataggattggttcaaacctgaattgatgtggattgtgtatagtac ctgtgatctggtaacagtgtcaactagttgtaaggcccacgaaggatgccagaaggtacc cgtaggtaacaagtgacactatggatctgatctggggccagctacctctatcatggtgagttggt aaaaaacgtctagtgggccaacccaggggggatccctggttccctttacctaatcaaaagccac t</p>
28	вирус Aichi	<p>ttgaaaaggggtggggggcctcggccccctcacctctttccgggtggtctggtcccggac caccgttactccattcagcttctcggaaacctgttcggaggaattaaacgggcaccatactccc ccacccccctttgtaactaagtatgtgtctcgtgatcttgactcccacggaacggaccgatccg ttggtgaacaaacagctaggtccacatcctccctccctgggagggccccgcctcccacat cctccccagcctgacgtatcacaggctgtgtgaagccccgcgaaagctgctcacgtggca attgtgggtccccctcatcaagacaccaggtctttctcctaaggctagccccggcgtgtgaa ttacgttgggcaactagtggtgtcactgtgcgctcccaatctcggccgaggagtgtgttccc aagccaaacccctggcccttactatgtgctggcaagcатаctgagaaggtgtccgctgtgg ctgccaacctggtgacaggtgcccagtggtgtaaccttctcgtctccggacggtagtgatt ggttaagattggtgtaaggtcatgtccaacgcctgtgcgggatgaaacctctactgccctag gaatgccaggcaggtacccacctccgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggta gttccattccaatcctttatgtcggagtc</p>
29	вирус гепатита А НА16	<p>ttcaagaggggtctccggagtttccggaacccctcttggaaagtccatggtgaggggacttgata cctcaccgctgttgcctaggctataggctaaattcccttccctgtccttcccctatttctttgtt tgttgtaaataattaattcctgcaggttcagggtctttaaactgtttctctataagaactcaattttc acgctttctgtctcttctccaggctctcccccttgcctaggctctggcctgtgcgccggcgg ggtcaactccatgattagcatggagctgtaggagtctaaattggggacgcagatgtttgggacgt cgccttgcaagttaacttggcttcatgaaccttcttgatctccacaaggggtaggctacgggtg aaacctttaggctaataactcaatgaagagatgccttggatagggtaacagcggcggatattgg tgagttgtaagacaaaaaccattcaacgccggaggactggctctcatccagtggatgattgag ggaattgattgtcagggtgtctctagggttaatctcagacctctgtgcttagggcaaacactatt tggccttaaatgggatcctgtgagaggggtccctccattgacagctggactgttcttggggcct</p>

		tatgtggtgttgcctctgaggtactcagggcatttaggttttctcattctaaataata
30	Phopivirus	gggagtaaacctcaccaccgttggcgtggttacggctacctaattttggatgtaaataattaatctc gcaggttcaggtctctgaattatgtccacgctagtgccactctcttaccataagtgaacgcttag cggaacctttctacacttgatgtggttaggggtacattattccctgggctctttggccctttcc cctgcactatcattcttctccgggctctcagcatgccaatgttccgaccgggtgcgcccgggg gttaactccatggtagcatggagctgtaggccctaaaagtctgacactggaactggactattg aagcatacactgttaactgaaacatgtaactccaatcgatctctacaaggggtaggctacgggt gaaacccttaggttaatactcatattgagagatactctgataggtaaggtgctggataatggt gagttaacgacaaaaccattcaacagctgtgggccaacctcatcaggtagatgctttggagc caagtgcgtaggggtgtgtgtggaaatgcttcagtggaaaggtgccctcccgaaggtcgtagg ggtaatcaggggcagttaggttccacaattacaattttaa
31	CVA10	gctctccgatctgggtgttcccaccacagggcccactgggcccagcactctgattccacg gaatctttgtgcgctgtttacaaccctccaatttgaacgtagaagcaatacacactactgatc aatagtaggcatggcgcgccagtcgatgatcaagcacttctgttccccggactgagtatc aatagactgctcacggttgaaggagaaaacgcttaccgggtaactacttcgagaaacct agtagcaccatggaagctgaggagtgttccgctcagcacttccccgttagatcaggtcgtatga gtcactgcaatccccacgggagaccgtggcagtggtgctggtggcggcctgctatggggcaa cccataggacgctctaattgtggacatggtgcgaagagtctattgagctagttagctctccgg cccctgaatgaggtaatcctaactgaggagcacatgcctcaaccaggaggtggtgtgtcgt aacgggtaacttcgagcggaaaccgactactttgggtgctcgtgttctttatcttataattggt gcttatggtgacaatcacggaattgttccatatactattggattggccatccggtgctaacaga gctattgtatacctatttgttgattactcccctatcatacaaatctctgaacactttgtcttatact gaacttaaacacacgaaa
32	Enterovirus C	ttaaaacagctctggggtgttcccacccagaggcccacgtggcggcagtagtaccgggtacc acggtagcctgtacgctgtttatactcccctcccgtaaactagaagcacgaaacacaagttc aatagaaggggttacagaccagtagcaccacgaacaagcacttctgttccccgggtgaggtca catagactgtcccacgggtcaaaagtactgatccgttatccgctcagtagtctcgaaagccta gtaccaccttgaatctacgatgctgtgctcagcactcagccccggaggtgtagcttaggctga tgagtctggaggttcccactggtgacagtggtccaggctgctgtggcggcctacctgtggtcca aaaccacaggacgctagtagtaacaaggtgtgaagagcccactgagctacctgagaatcctc cggccccgaatgaggtaatccaaccacggagcaggtaatcgaaaccagcggtagcct gtcgtaacgcgtaagtctgtggcgaaccgactactttgggtgctcgtgttctttatattatggt ggctgcttatggtgacaatcatagattgttatcataaagcaaatggattggccatccggagtgag ctaaactatctatttctgagtggtgattcgttaccacattctgaacaatcagcctcattagtg taccctgttaataagacgatcatcag
33	Enterovirus D	ttaaaacagctctggggtgttcccacccagaggcccacgtggcggcagtagtaccgggtacc cggtagcctgtacgctgtttatactccccttccaagtaactttagaagaataaactaatgttca acaggaggggtacaaaccagtagcaccacgaacacacacttctgttccccgggtgaagttgca tagactgtaccacgggtgaaagcgtgaatccgttaccgcttaggtacttcgagaagcctagt atcatcttgaatcttcgatgctgtgcatcagcactctacccgagtgtagcttgggtcgtaggt ctggacacccacaccggcagctggtccaggctgctgtggcggcctaccatggctagcac catgggacgctagttgtgaacaaggtgcgaagagcctattgagctacctgagagtcctccggcc cctgaatgaggtaatccaaccacggagcaaatgctcacaatccagtgagtggttgcgtaat gcgcaagtctgtggcgaaccgactactttgggtgctcgtgttctttatattatggctgctta tggtgacaatctgagattgtatcatatagctattggattagccatccgggtgatatcttgaatttgc

		cataactttttcaciaaatcctacaacattactactactttctcttgaataattgagacaactcata
34	Enterovirus J	<p>ttaaataagcctcagggtgtgtccaccctgagggccacgtggtgtagtactctggtattacggt acctttgtacgcctattttataccccctccccaagtaatttagaagcaagcacaaccagttcagt agtaagcagtacaatccagtactgtaatgaacaagtactctgttaccgggaagggtctatcggt aagctgtaccacggctgaagaatgacctaccgtaaccggctactactcogagaagcctagt aatgccgttgaagttttattgacgttacgctcagcactaccccggtgtagtttggctgatgagt cacggcactccccacgggcaccgtggccgtggctgcgttggcggccaaccaaggagtgca agctcctggacgtcataattacagacatgggtgtagagcctattgagctaggtggtagctccg gcccctgaatgcggctaactcctaccggagcatatcggtgcgaaccagcacttgggtgtgtgt aatacgtaatctggagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgttctgttttaactttatggct gcttatggtgacaatttaacattgttacatatactgttgggtggccatccggattttgtataaaa ccatttctcgtgccttgaccttaacacattgtgaacttcttaaatccccctttattagcttaataac taaga</p>
35	Человеческий Pegivirus 2	<p>aactgtgtgtgtagcaatgcgcatattgctacttcggtacgcctaattggtaggcggccggcagc cggccccgcaagggcctagtaggacgtgtgacaatgccatgagggatcatgacctgggggtg agcggaggcagcaccgaagtgggtgaactgcactcccagtcgaccacctggcttggctggt catggagggcatgccacgggaacgctgatcgtgcaaagggatgggtccctgcaactggtgcc atgcggcaccactccgtacagcctgataggggtggcggggccccccagtgtagcgtcc gtggagcgaac</p>
36	GBV-C GT110	<p>tgactggggggggtgatTTTccccccggcactgggtgcaagccccagaaaccgacgc ctatctaagtagacgcaatgactcggcgccgactcggcgaccggccaaaaggtggtggatgg gtgatgacaggggtgtaggtcgtaaatcccggatcctctgtagccactataggtgggtcttaa gagaaggtcaagattcctcttacgctgcggcgagaccgcgcacggccacaggtgtggccc taccggtgtgaataagggcccacatcaggc</p>
37	GBV-C K1737	<p>gacgtggggggggtgatcccccccTTTggcactgggtgcaagccccagaaaccgacgcc tattaaacagacgtaagaaccggcgccgaccggcgaccggccaaaaggtggtggatggg tgatgccaggggtgtaggtcgtaaatcccggatcctctgtagccactataggtgggtcttaagg gttggttaaggtccctctggcgttggcgagaaagcgcacgggtccacaggtgtggccctac cgggtgtaataagggcccagctcaggtcgtcgtaaacgagccactaccacctgggca aacaacgcccacgtacgggtccacgtcgccttcaatgtctcttgaccaataggcttagccggc gagttgacaaggaccagtgggggctggcggtaggggaaggaccctgccgctgcccttccc ggtggagtgggaaatgc</p>
38	GBV-C Iowa	<p>tgactggggggggtgatccGccccccggcactCggtgcaagccccataaacgacgcc tatctaagtagacgcaatgactcggcgccgactcggcgaccggccaaaaggtggtggatgggt ggtgacaggggtgtaggtcgtaaatcccggatcctctgtagccactataggtgggtcttaaga gaaggtcaagactcctctgtgctcggcgagaccgcgcacgggtccacaggtgtggcccta ccggtgtgaataagggcccagctcaggtcgtcgtaaacgagcccgtcaccacctgggc aacgacgcccacgtacgggtccacgtcgccttca</p>
39	Pegivirus A 1220	<p>ttagcaatgcgcatattgctacttcggtacgcctaattggtaggcggccggcaccggcccc gcaagggcctagtaggacgtgtgacaatgccatgcgggatcatgacctggggtagcggag gcagcaccgaagtcgggtgaactcactcccagtcgaccacctggcttggctgtcatggag ggcatgccacgggaacgctgatcgtgcaaagggatgggtccctgcaactgggtgcatgcgcg gcaccactccgtacagcctgataggggtggcggggccccccagtgtagcctcgtggagc gcaac</p>
40	Pasivirus A 3	atfttctggccgtgtagctgctttgaccagtggtctgggttacttagccaaatcccccttcttca

		cctttaaatttgatggctgtgtgtttgtttgtcttcttaataatataagatccttcccgcgat acagacctcgacagtctgggtgtaggagggtgggtgttattaattgccccagaagagtgaccgtg acacatagaaacatgagtacatgtgtatccgtggaggatcgccgggactggattccatataccc attgccatccaacaagcggagggtatacccactatgtgcgcgtttgcagtgggaatctgcaaat ttagtcaactgcctgatagggtgtggcctgcactctggggtactcaggctgttcatataat
41	Sapelovirus	cccctccacccttaaggtgggtgtatcccacatacccaccctcccttccaagtgacggacaa ctggattttgactaacggcaagtctgaatggatgattggatagctttaaaccggcagtagcgtgg cgagctatggaaaaatcgcaattgtcgtatagccatgtagtgacgcgcttcggcgtgctccttgg tgattcggcgactggttacaggagataggcagtgagctatgggcaaacctctacagtattactt agaggggaatgtgcaattgagactgacgagcgtctctttgagatgtggcgcatgctcttggcatta ccatagtgagcttccaggttgggaaacctggactgggcctataactcctgatagggtcgcggct ggccgcctgtaactagatagtcagttgaaaccccc
42	Rosavirus B	gtctcttagtctatgcttcagagagcgggtgaactgacaccgttgccttcttcacagcccttctg gccggtcttccggttctcgacagcgttgggcatcatggctagttaggctaagatagtgatgac tagtgaacagtttggattgttggagttttagcgtatgtagttagtggacctcccacgt ggtaacacgtgccccacaggccaaaagccaaggtgtgaaagcaccctactagtcaccagact caccatctgggaactcctctcatgaaaaatcttagtaacttttgattcggtattcatcaacctctc agtcaagggtgaaggatgccggaaaggtaccgcaggtaacgataagctcactgtggatctg atccgggcttgggtgcgaccgtctgtccggcgtagccagagtaaaaaacgtctaggccctcc acccaagggttgggttcccccaatcattgaaagttcact
43	Вирус Bakunsa	tttgaacgccacctcggagcgatatccggggaccccctccccttttcttctactcttctccaa attccctctcccttgttatttgggttggatttctggacatgactcggacggatctatctcatttgc tgtgtctgctccaccagtggcatggctgaaagatcatcaactggacgtgactgtaatggcca aacgtgcccacaggggaaacctgcccggctgctgtagcggcgggtggacgtggtggaccct ctcctgctcataactttgggtaggtgaagggttcaagcgacgcttgcctgtagggcgcatcc ggatggtgggaaccaacaactaggtgtaatggccgacctcaggtggatgagctagggctgc tgacaaaagggactcgattcgatatcccggcctggtagcctagtcagtgactcgtagttg ggaatctacgactggcctagtaggggtgatagccccgttcccacgccacctgttaggga cccccccc
44	Tremovirus A	ttgaaagaggcctccggagtgtccggaggctctcttccgaccaaccatactggggggtgtgt gggacctacctggagtgcacggtatataatgattcccgcattggcaaggcgctgctaccttggc ccttgacgcatggatgctcatcatttgccttggtaagccccatagaaacgaggcgctcacgtgc cgaaaatccccttgcgttccacagaacctcctaaccatgggtgtagtatgggaatcgtgtatggg gatgattaggatctctcgtagaggataggtgtgccattcaaatccaggagtagctctggctctga cattgggacatttgatgaaccggacctggtcagatccgggtgtcctgtattgttacgggtgatc cgtcttggcactgaaagggtatttgggtaatccttctactgcctgatagggtggcgtgccc ggccacgagagattaagggtagcaattfaaac
45	Swine Pasivirus 1	gctttgaccagtggctctgggttacttagccaagtccttctcttatttactagttatgtgtgtg ttgtctgtttgttttttaattgtatacaagatccttcccgcgacacagacctgacagtctggt gtaggagggtgggtgatattaattgccccaaaagagtaccgtgatacgtggaaacctagagta catgtgtatccgtggaggatcgccgggactggattccatatacccattgccatccaacaacgg agggtatacccaccacgtgcgcgttgcagtgggaatctgcaaatagtcatactgcctgatag gggtgggcctgcacttggggtactcaggctgttcatataat
46	PLV-CHN	acatggggtatgttctgtcctgtttgttgaacaatataagatccttccgccgatatagacct cgacagtctagttaggaggattgggtgatagtaactgccccagaagagtaccgtgacacata

		gaaacatgagtagcatgtgtatccgtggaggatcgcccgggactggattccatatcccattgcca tccaacaacggagggtatacccactatgtgcgcgttfgcagtgaggagcctgcaaatfagta tactgcctgatagggtgtgggctgcactctggggactcaggctgtttatataat
47	Pasivirus A (длинный)	tgaaaagtgggtgtgcagctggatttccggctgtgcaactgctttgaccagtggctctgggta cttagccaaattccttcccttatccctattggttgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtttttgcttaactatat acaagatcctcccgcgatacagacctcgacagctctggtgtaggggggtgtttattatgtg ccccaaaagagtgaccgtgacacgtggaaacatgagtagatgtgtatccgtggaggatcgcc cgggactggattccatatacccattgccatccaacaacggagggtatacccaccacgtgcgcg tttgagtgggaatctgcaatfagtcatactgcctgatagggtgtgggctgcactttggggta tcaggctgtttatataat
48	Sicivirus	gtgtcattaagggtgtgttggaaagttcgaattagctggttgggtgattagtagaccctggagg taccatcggatctgaccagggaccgctgactataaccgctccggaattcgggttaaaacaat gaacgtcaccacacaattctttctcattttatctcattctcctattaccgattactcgtat ttccttgatgttctggagatttccctggtacctggaccctcattattgtgtgtttcaccagcga gctgtccaattgcttattattgccttaacctcgtcctaataatcttggtgatcgggtgattg agctcccgggtatcctgcatcaac
49	Hepacivirus K	gggaacaatggtccgctccgccaacgactctagccatgagtagtagcagtgccgctgaccacc attagcacaacaccactgactgagccacacccctccggaaatctgagtagcaggacattcgt cggacgacgcatgagcctccatgccgagaaaattgggtatacccacgggtaaggggtggcca cccagcgggaatctggggctggtcactgactatggtagcagcctgatagggtgctccgcagc gtcagtggtagcggctgtcatggaac
50	Hepacivirus A	acctcgtgtaggcacgggtcgctgtcagcgttttgcgctgcatgcgctacacgcgctgcca acgggagggaactcacatccatgtgtcactccccctatggagggttccaccccgttaca cggaaatgggtaaccataccaaagtacgggtatcgggctccttagggccccccggcag gtcgaggagctggaattcgtgaattcgtgagtacacgaaaatcgcggttgaactcttgacc ttcggagccgaaatgggctgccccagaaaggcggggcggtgttgggcggcgc cccccttatcccacggctgataggatgcttcgagggcacctgcccgtctcgtagaccatagga c
51	BVDV1	gtatacgagaatttgcctaggacctgtttacaatattgggcaatctaaattataattaggcctaag ggacaaatcctcctcagcgaaggccgaaaagaggctagccatgcccttagtaggactagcaaa ataagggggtagcaacagtgtgagttcgttggatggctgaagccctgagtagcagggtagtc gtcagtggttcgacgttcggaggacaagcctcagataccactggacgagggcatgccca cagcacatctaacctggacgggggtcgttcaggtgaaaacggttaaccaaccgctacgaata cagcctgatagggtgctgcagaggcccactgtattgctactgaaaatctctgctgtacatggcac
52	Вирус пограничной болезни	gtatacgggtagtagctcatgcccgtatacaaatggatattccaaaactcattgggttaggga gccctcctagcagcggccaaccgtgttaaccatacacgtagtaggactagcagacgggagg actagccatcgtgtgagatccctgagcagctctaatcctgagtagcaggatagtcgtagtattc aacgcaggcacgggttctgcttgatgctacgtggacgagggcatgcccaagacttgcttfaat ctcggcgggggtcgcggagggtgaaaacactaacggtgttgggggtacagcctgatagggtgc tcagaggcccacgaataggctagtataaaaatctctgctgtacatggcac
53	BVDV2	gtatacagagattagctaaagtactcgtatattgattggacgtcaacaatttttaattggcaacgta gggaacctcccctcagcgaaggccgaaaagaggctagccatgcccttagtaggactagcaa aagttaggggactagcggtagcagtgattcgttggatggccgaacccctgagtagcaggga gtcgtcaatggttcgacactcattagtcgaggagctcagatgccatgtggacgagggcatg cccacggcacatctaacccatgcgggggtgcatgggtgaaagcgctaactcgtggcgtatgg

		acacagcctgataggggtgtagcagagacctgctattccgctagtaaaaaactctgctgtacatggcac
54	CSFV-PK15C	gtatacagaggttagttcattctcgtatgcaftattggacaaatcaaaattcaatttggttcagggcctccctccagcgacggccgaactgggctagccatgccatagtaggactagcaaacggagggactagccgtagtggcgagctccctgggtgttctaagtctgagtagcaggacagtcgtagtagttcgacgtgagcagaagcccacctcgagatgctatgtggacgagggcatgccaagacgcaccttaaccctagcgggggtcgtaggggtgaaatcacaccacgtgatgggagtcggacctgataggggtctgcagaggctcactattaggctagtataaaaatctctgctgtacatggcac
55	SF573 Діцистровірус	aaaaccgaccccagagatcagaaagtcggtgacgcgatctttattagaggacggttgcgctggcgcgagcttaattagcagacgccaataaacaacaaaatgctgatcgcgagacttaattgtcagacgattggccaaatccgatgtgatctttgctgctcccagattgccgaaataggagtagtag
56	Вірус наподібие Picorna Hubei	ccccaaaaccccccttaaaactcaactgtagtggattcattttccgttgcaaaacaaacatta ctaccgcattatgtaggctctgtgtttctatgcgaccgttacattaatctctactctgaccacta gttataaaaccgaagacctgaatgaaacgattttccttttcaaccttaacgaacctctgacggcttgagaaacctgaagttagtaattatgtttaaagaaggaaagcaaacgcgatgactcttaca tccctattccataccgttgcaccacaatgtgagcgatgcgaggtcgggactgcagtagtaggggga acgagctacatggagagtaattatctctcccctctacgggagctctcatgtgagctgtagaaagc ggttggcacctctcgttacctgcctgtacatgatcc
57	CRPV	aaaagcaaaaatgtgatcttgcttgaataacaatfttgagaggttaataaattacaagtagtgctat tttgtatttaggttagctatttagctttacgttccaggatgcctagtgccagccccacaatatccag gaagccctctctcgggttttcagattaggtagtcgaaaaacctaagaaatttacct
58	Salivirus A BN5	ttctctcttcgaccgccttacggcagggcgggtccgcgacggcttcggcctaccgcgacaa gaatcccgctcatctgtccttatcccatattcttccctcccccaacctcacgcttactcgcg cacgtgttagtgacgtgcgttgcctcaaacagttacactcacaccttggggcgggttgtcc cgcctcgggttctcgcggaacctcctctctctcctttctatccgcttactttccataac tacagtctttggtaggtaagcatctgacccccgcggaagctgccaacgtggcaactgtggg gatccaggcaggttatcaaggcaccggctttccgcttcaggagatccctgcccgtgaatt ccgacagggctctgcttgggtgccaacctccccaaatgcgcgctgcccggagtgctcttccccaa ctcatcttagtaacctctcatgtgtgtccttggtcagcatatctgagggacgttccgctgtccag accagtcagcaatggacgggcccagtgctgtagtcgcttccggttccggcgcatgtttggc gaaacgctgaggttaaggttggtgtgccaatgcccgaatttggtgacacctcaagaccacca ggaatgccagggaggtaccccactcgggtggatctgacctgggctaattgtctacggtggtc ttcttctccactctctttttctggcatg
59	Salivirus A BN2	tatggcagggcgggctgtggacggcttcggcccaccacagcaagaatgccatcatctgtcctc accccatgttccctttcttccctgcaaccgttacgcttactcgcaggtgcatttgagtggtgca cgtgtgaataaacagctacactcacatggggcggggtttccgcccctcggcctctcgcgag gccaccctccccctctccataactacagtgctttggtaggtaagcatcctgatccccgcg gaagctgctcacgtggcaactgtggggaccagacaggttatcaaggcaccggctttccg cctcaggagatccctgctagtgaattctagtagggctctgcttgggtgccaacctccccaaatg cgcgctcgggagtgcttccccaaactaccctagtagtctctcatgtgtgtgcttggtagcat atctgagacgatgtccgctgtccagaccagtcagtaatggacgggcccagtgctgtagtcg tcttccggctttccggcgcatgtttgggaaccgggtgggtaaggttggtgtgccaacgccctg actttgggtgatacctcaagaccaccaggaatgccagggaggtaccccgttcacagcgggat ctgacctgggctaattgtctacggtggttcttcttcttactgttc
60	Salivirus A	tttcgaccgccttatggcagggcgggctgtggacggcttcggcccaccacagcaagaatgcc

	02394	<p>atcatctgtcctcacccttctcccctcctccctgcaaccattacgcttactcgcattgcatgtgcat gagtgggtgcacgtgtgaacaaacagctacactcacgtggggcggggtttcccgccctcggc ctctcgcgagggcccaccctcccctcctccataactacagtgctttgtaggtaagcatctgat ccccgcggaagctgctcgcgtggcaactgtggggaccagacaggtatcaaaggcaccgg gtctttccgcctccaggagtatccctgctagtgaattctagtggggctctgcttgggtgccaacctcc cccaaatgcgcgctcgggagtgcttcccactaccctagatcctctcatgtgtgtgcttg gtcagcatalctgagacgatgttcgctgtcccagaccagtccagcaatggacgggccaagtgtg cgtagtcgtcttccggctgtccggcgcagtggttggaaccgggtgggtaagggtggtgtgccc aacgcccgtactttggtgacaactcaagaccaccaggaatgccagggaggtacccgcctca cggcgggatctgacctgggctaattgtctacgggtgttcttctgcttccatttcttctgttc</p>
61	Salivirus A GUT	<p>tatggcagggggctgtggacggttccggcccaccacagcaagaatgccatcatctgtcctc accccaatttcccttctcccctgcaatcatcacgcttactcgcattgagtggtgcatgt gttgaacaaacagctacactcacatggggcggggtttcccgccctacggcctctcgcgagggc caccctcccctcccctataactacagtgctttggcaggttaagcatctgatccccgcggaag ctgctcacgtggcaactgtggggaccagacaggttatcaaaggcaccggctttccgccttc aggagcatccccactagtgcaattctagtggggctctgcttgggtgccaacctcccccaatgcgc gctcgggagtgcttcccacccatcctagatcctctcatgtgtgtgcttggtcagcatalct gagacgacgttccgctgtcccagaccagtccagtaatggacgggccaagtgtgcgtagctctt ccggctgtccggcgcagtggttggaaccgggtgggtaagggtggtgtgccaacgcccgtac ttggtgacacctcaagaccaccaggaatgccagggaggtacccgcctcacggcgggatct gacctgggctaattgtctacgggtgttcttctgcttccacttcttctt</p>
62	Salivirus A CH	<p>ttcctcgaaccattacgcttaatcgcattgagtggtgcatgtgttgaacaaacagctac aatcacatggggcggggtttccgccccacggcttctcgcgagggccatccctccctttctcc cataactacagtgctttgtaggtaagcatcccgatctcccgcggaagctgctcacgtggcaact gtggggaccagacaggttatcaaaggcaccggctttccgccttcaggagtatccctgctag cgaattctagtagggctctgcttgggtgccaacctcccgaatgcgcgctcgggagtgctcttc cccaatcaccagatcctctcatgtgtgtgcttggtcagcatalctgagacgatgtccgctgt cccagaccagtccagtaatggacgggccaagtgtgcgtagctcctccggcttgcggcgcag gtttggtgaaccgggtgggtaagggtggtgtgccaacgcccgaatcaggggatactcaagg caccaggaatgccagggaggtatccgcctcacagcgggatctgacctggggtaaatgtct gcggggggtctcttggcccaattctcagtaatttcagg</p>
63	Salivirus A SZ1	<p>tctgtctcaccctatctcccttcttctcaccggttacgcttactcgcattgagtggtgc acgtgcttgaacaaacagctacactcacatggggcggggtttcccgccctcggcctctcgcg aggcccaccctcccctcctccataactacagtgctttgtaggtaagcatcctgatccccgc ggaagctgctcacgtggcaactgtggggaccagacaggttatcaaaggcaccggctttcc gccttcaggagtatccctgctagtgaattctagtagggctctgcttgggtgccaacctcccccaat gcgcgctcgggagtgcttcccactaccctagatcctctcatgtgtgtgcttggtcagca tatctgagacgatgtccgctgtcccagaccagtccagtaatggacgggccaagtgtgcgtagtc gtcttccggcttccggcgcagtggttggaaccgggtgggtaagggtggtgtgccaacgccc gtactttggtgatactcaagaccaccaggaatgccagggaggtacccgcttcacagcggg atctgacctgggctaattgtctacgggtgttcttctgcttccacttcttactgttcatg</p>
64	Salivirus FHB	<p>acatggggggtctcggacggcttccggcccaccgcgacaagaatgccgtcatctgtcctcatt accgtattccttcccctccccgcaaccaccacgcttactcgcgcacgtgttgagtgacgctg cgtgtccaacagctacaccacaccttccggggcggggttgtcccgcctcgggttctcgc ggaacccccctcccctctctcttctatccgcctcacttccataactacagtgctttgtagg</p>

		<p>tgagcacctgacccccgcggaagctgtaacgtggcaactgtggggatccaggcaggtat caaaggcaccggctttccgcctcaggagatctctgccggtgaattccggtagggctctgct gggccaacctccccaaatgcgcgtgcgggagtgtcttccccaaactcatcttagtaacctct catgtgtgtgcttggtcagcatatctgaggcgacgttccgctgtccagaccagtccagcaatgg acggggcagtgctgtagctgctttccgggtttccggcgcatgtttggcgaaacgctgaggtaaag gttgggtgcccacgcccgaatttgggtgatacctcaagaccaccaggaatgccagggaggt acccacttcggggatctgacctgggctaattgtctacggtggttcttctgcttccacttctctt tttctggcatg</p>
65	CVB3	<p>ttaaacagcctgtgggtgatccaccacaggcccattgggcgctagcactctggtatcacg gtacctttgtgcgctgtttataccccctccccaaactgtaacttagaagtaacacacaccgatca acagtcagcgtggcacaccagccacgtttgatcaagcacttctgttaccgggactgagatca atagactgctcacgcggtgaaggagaaagcgttcgttatccggccaactacttcgaaaaaccta gtaacaccgtggaagtgcagagtgttcgctcagcactaccaggtgtagatcaggtcagatgag tcaccgattccccacgggcgaccgtggcggtggctgcgttggcgccctgccatggggaaa cccatgggacgctctaatacagacatggtgcgaagagtctattgagctagttgtagtctccgg cccctgaatgcggctaatacctaactgcggagcacacaccctcaagccagagggcagtggtcgcg taacgggcaactctgcagcggaaaccgactcttgggtgtccgtgtttcattttattctatactggc tgcttatggtgacaattgagagatcgtaccatagctattggattggccatccggtgactaatag agctattatatacctttgttgggttataccacttagcttgaaagaggttaaacactacaattcatt gtaagttgaatacagcaaa</p>
66	CVB1	<p>ttaaacagcctgtgggtgttccaccacaggcccattgggcgctagcactctggtatcacgg tacctttgtgcgctgtttatccccctccccaaattgtaattagaagttcacacaccgatcatta gcaagcgtggcacaccagccatgtttgatcaagcacttctgttaccgggactgagatcaata gaccgctaacgcggtgaaggagaaaacgcttcgttaccggccaactacttcgaaaaacctagt aacaccatggaagtgcggagtgttcgctcagcactaccaggtgtagatcaggtcagatgagtc accgcttccccacgggcgaccgtggcggtggctgcgttggcgccctgcctacggggaaacc cgtaggacgctctaatacagacatggtgcgaagagtctattgagctagttggtaatcctccggcc cctgaatgcggctaatacctaactgcggagcacataccctcaaaccagggggcagtggtcgtgta cgggcaactctgcagcggaaaccgactcttgggtgtccgtgtttcattttattctatactggctg cttatggtgacaattgacaggtgttaccatagctattggattggccatccggtgactaacagag caattatatacctttgttgggttataccacttagcttgaaagaggttaaacactacatctcatcat taactaaatacaacaaa</p>
67	Echovirus 7	<p>ttaaacagcctgtgggtgttccaccacaggcccattgggcgctagcacctggtatcac ggtacctttgtgcgctgtttatccccctccccaaattgtaacttagaagaaacacacaccgatca acagcaagcgtggcacaccagccatgtttggtcaagcacttctgttaccgggactgagatca atagactgctcacgcggtgaaggagaaagcgtccgttatccggccagctacttcgagaaacct agtaacaccatggaagtgcggagtgttcgctcagcactaccaggtgtagatcaggtcagatga gtcaccgcttccccacgggcgaccgtggcggtggctgcgttggcgccctgcctatgggggaa cccataggacgctctaatacagacatggtgcgaagagtctattgagctagctggtattcctccgg cccctgaatgcggctaatacctaactgtggagcacatgccctaatacaggggtagtggtcgtgta atgagcaattccgcagcggaaaccgactcttgggtgtccgtgtttccttattcttactggctg cttatggtgacaattgagagattgtaccatagctattggattggccatccggtgactaatagag ctattgtatctcttggattgtaccactaatttgaagaaatcaggacactacgctacatctt actattgaacaccgcaaa</p>
68	CVB5	<p>ttaaacagcctgtgggtgtaccaccacaggcccactgggcgctagcactctggtatcac</p>

		<p>ggtacctttgtgcgctgttttatgccccctcccccaattgaaacttagaagttacacacaccgat caacagcggcgctggcataaccagccgctcttgatcaagcactcctgtttccccggaccgagta tcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgttcgttaccggctaactacttcgagaaac ctagtagcatcatgaaagttgcgaagcgttcgctcagcacatccccagtgtagatcaggtcgat gagtcaccgcattccccacggcgaccgtggcgggtggctgcgttggcggcctgcctacgggg caaccgtaggacgcttaatacagacatggtgcgaagagtcgattgagctagttagtagtcctc cggccccgaatccggctaactcctaactgcggagcacataccctcaaccaggggggcattgtgt cgtaacgggtaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgtttcctttattctataatg gctgcttatggtgacaattgaaagattgttaccatatactattggattggccatccggtgtctaaca gagctattatatacctctttgttgattgtaccacttgatctaaaggaagtaagacactacaattca tcatacaattgaacacagcaaa</p>
69	EVA71	<p>ttaaacagcctgtgggtgcaccactcacagggccactgggcgcaagcactctggcacttc ggtacctttgtgcgctgtttatataccccctcccccaattgaaattagaagcagcaaacccgatca atagcaggcataacgctccagttatgtcttgatcaagcacttctgtttccccggactgagatcaat agactgctcacgcggttgaaggagaaaacgttcgttatccggctaactacttcggaagcctagt aacaccatggaagttgcggagagttcgttcagcacttccccagtgtagatcaggtcgatgagtc accgcattccccacggcgaccgtggcgggtggctgcgttggcggcctgccatggggtaacc catgggacgcttaatacggacatggtgtgaagagctactgagctagttagtagtcctccggcc cctgaatcgggtaatcccaactgcggagcacacgcccacaagccagtgaggtagtgtcgtga acgggcaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgtttcctttattcttatgttgctg cttatggtgacaattaaagagttgttaccatatactattggattggccatccggtgtgcaacagag cgatcgtttacctattattgtttgtaccattgacactgaagctctgtgatcacccctaattttatcttaa ccctcaacacagccaaac</p>
70	CVA3	<p>ttaaacagcctgtgggtgtaccaccacagggccactgggcgctagcactctgttattac ggtacctttgtgcgctgtttatatacccccccccaacctgaaacttagaagtaagcaaacccgat caatagcaggtgcggcgaccagtcgatcttgatcaagcacttctgtaacccggaccgagta tcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgttcgttaccggctaactacttcgagaaac ccagtagcatcatgaaagttgcagagtgttcgtcagcactacccccgtgtagatcaggccgat gagtcaccgcacttccccacggcgaccgtggcgggtggctgcgttggcggcctgcctatggg gcaaccataggacgcttaatacggacatggtgcgaagagctattgagctagttagtagtcct ccggccccgaatcgggtaatcctaactgcggagcacatacccttaatccaagggcagtggtg tcgtaacgggtaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttaattttactgg ctgcttatggtgacaattgaggaattgttccatatactattggattggccatccggtgactaaca gagctattgtgtccaattgttgatttaccgctcacactcacagtcgtaagaaccctcattac gtgtatttctcaactcaagaaa</p>
71	CVA12	<p>ttaaacagcctgtgggtgtaccaccacagggccactgggcgctagcactctgttactac ggtacctttgtgtgctgttttaagcccctacccccactcgtaacttagaaggcttctcactcgc atcaatagtaggtgtggcacgccagtcacaccgtgatcaagcacttctgttaccgggtctgagt accaataagctgtaacgcggctgaaggggaaaacgatcgttatccggctaactacttcgagaa accagtagcaccatgaacgttgcaggggtttcgtcggcacaacccagtgtagatcaggtc gatgagtcaccgtattccccacggcgaccgtggcgggtggctgcgttggcggcctgccatgg ggtagccatgggacgcttaatactgacatggtgcgaagagctattgagctagttagtagtcct ccggccccgaatcgggtaatcctaactgcggagcacatacccttaatccaagggcagtggtg tcgtaacgggcaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgtttcctttattcttacatt ggctgcttatggtgacaattgaaagttgttaccatatactattggattggccatccggtgacaaa</p>

		tagagctattgtatatcttttggttacgtacccttaattacaaagtggtttcaactttgaaataca tcctaactaaattgtagaaa
72	EV24	ttaaacagcctgtgggtgcaccacccacagggcccacagggcgctagcactctggtatca cggtaaccttgtgcgctgtttattacccttcccattgaaaattagaagcaatgcacaccgat caacagcagcgctggcgaccagtcacgtctcgatcaagcacttctgtttccccggaccgagta tcaatagactgctcacggttgaaggagaaagtgttcggtatccggtaaccacttcgagaaac ccagtaacacatgaaagttgcagggtgttcgctcagcacttccccagtgtagatcaggtcgat gagtcaccgcttccccacggcgaccgtggcggtggtgctgctggcgccctgcctatgggtt aacctataggacgctctaatacagacatggtgcgaagagttattgagctgggttagtatccctccg gcccctgaatgcggctaactcactgcggagcagctgcctccaatccaggggggttgcattgctg taacgggtaactctgcagcgaaccgactacttgggtgtccgtgttcttttattcttatactggct gcttatggtgacaatcgaggaattgtaccatatactattggattggccatccgggtgtaacaga gcgattatatactcttggatttatgcagctcaataccaccaactttaacacattgaaatatact taaagttaaacacagcaaa
348	AP1.0	attctcgggctacggcctggagccactccggctcctaaagattagaagttgagcacaccgc ccactagggccccatccaggggggcaacgggcaagcacttctgtttccccggtatgatctga taggctgtaaccacggctgaaacagagattatcggtatccgcttactacttcgagaagcctagta atgatgggtgaaattgaatccgtgatccgggtctccccacaccagaaactcatgatgaggggt gccatccccggctacggcgacgtagcgggcatccctgcgctggcatgaggcctcttaggagga cggatgatatggatctgtcgtgaagagcctattgagctagtgtcactcctccgcccccgat gaggtaactcctaaccggagcaggtgggtccaatccagggcctggcctgtcgtaatgcgta agtctgggacggaaccgactacttccgggaaggcgtgttccattgttattttgtgtttatgg tgacaactctgggtaaacgttctattgcgtttattgagagattccaacaattgaacaaacgagaa ctacctgtttattaaatttacacagagaagaattaca
349	CK1.0	gtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttcactccttccggactgttggggaggaacaca cagggtcccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgctatctggtggcggc aagacacacgggtcttccctctaagcacaattgtgtgtgttccaggctcctctgcgtacgg gcccggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcctggcaagactatgac gtcgtatgtccgctgcggatgccagccgggtaaccggttcccagtggtgtgtagtgcgatctc caggctcctcgttggcgttgcagaaactgctcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggtgattcttaccaccttaggaatgctccggaggtaccccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtggttcttttcttttccacaactctactgctgacaactcac tgactatccactgctctgTcacG
350	PV1.0	aacaaaaggctacaccacttgggctacggcccgcgccacttgtggcgcaaagacattagaag aatagcataccgccactagggcctgcagccagcagggtaacgggcaagcacttctgtctcc ccggtagaacgggtataggctgtaccacggccgaaaactgaactatcgttaccgactccgtac ttcgaaagcttagtaggaaactgaaagttcgagttattgaccggaggtgttccccactcca gaaacgcgtgatgaggggtgccacccgacctggcgacatgggtgggcatcctgcgctggc acggcgcctctaagaggataactcgtcctactggtaaccgaagagccccgtgagctacgggtt attcctccgctcctgaatcgggctaactcctaaccatgagcagttgccatagatccataggtg gactgtcgtaacgcgtaagtgtggggcgaaccgactacttgggatggcgtgttctgtttct ccatttgtgtgatggtgacaagttagatctcgatctatagcgttcttgagagatttcaaacat ttattcaagtcgtacaattctgtgttaagcagtagcagtgtaacc
351	SV1.0	tctgtctcaccctacttcccttcttctgcaccgttacgcttactcgcattgagtggtgc acgtgcttgaacaaacagctacactcacatggggcggggtttcccgcctgcggcctctcgcg

		aggcccaccctcccctcctccataactacagtgcttggtaggtaagcatcctgatccccgc ggaagctgctcacgtggcaactgtggggaccagacaggtatcaaaggcaccggctcttcc gccttcaggagatccctgctagtgaattctagtagggctctgcttgggccaacctccccaaat gcgcgctgcgggagtgtcttcccactaccctagatcctctcatgtgtgtgcttggcagca tatctgagacgatgtccgctgtcccagaccagtccagtaattggacgggccaagtgtgctagtc gtcttccggctgtccggcgcatgttgggaaccgggtgggtaagggtgggtgtgccaacgccc gtacttgggtgatacctcaagaccaccaggaatgccaggagggtaccgccctcacagcggg atctgacctgggctaattgtctacgggtgttcttcttcttccacttcttctactgttccacc
352	Козий Kobuvirus 5Δ40	gtggccacgcccgggcccaccgatacttccctcactccttcgggactgttggggaggaacaaa cagggtcccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgccgatctggtggcggc aagacacacgggtcttccctctaaagcacaattgtgtgtgtgtccaggtcctctgctgacggt gcgggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcattgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccgggtcccagtggtgtgtagtgatcttc caggtcctctggttggcgttgcagaaactgcttcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggttgattcttaccaccttaggaatgctccggagggtaccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtgtgttcttttctttcacacaactctactgtgacaactcac tgactatccactgtctctgtgcttctgctctggttcaagtccttgattgttttgactgttttcc tgctttcttccacaatcctgtcagttcaagtc
353	Козий Kobuvirus 5Δ40/3Δ122	gtggccacgcccgggcccaccgatacttccctcactccttcgggactgttggggaggaacaaa cagggtcccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgccgatctggtggcggc aagacacacgggtcttccctctaaagcacaattgtgtgtgtgtccaggtcctctgctgacggt gcgggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcattgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccgggtcccagtggtgtgtagtgatcttc caggtcctctggttggcgttgcagaaactgcttcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggttgattcttaccaccttaggaatgctccggagggtaccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtgtgttcttttctttcacacaactctactgtgacaactcac tgactatccactgtctctaaagtc
354	Козий Kobuvirus 5Δ40/3Δ86_D istal	gtggccacgcccgggcccaccgatacttccctcactccttcgggactgttggggaggaacaaa cagggtcccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgccgatctggtggcggc aagacacacgggtcttccctctaaagcacaattgtgtgtgtgtccaggtcctctgctgacggt gcgggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcattgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccgggtcccagtggtgtgtagtgatcttc caggtcctctggttggcgttgcagaaactgcttcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggttgattcttaccaccttaggaatgctccggagggtaccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtgtgttcttttctttcacacaactctactgtgacaactcac tgactatccactgtctctaaagtc
355	Козий Kobuvirus 5Δ40/3Δ 122_Kozak	gtggccacgcccgggcccaccgatacttccctcactccttcgggactgttggggaggaacaaa cagggtcccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgccgatctggtggcggc aagacacacgggtcttccctctaaagcacaattgtgtgtgtgtccaggtcctctgctgacggt gcgggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcattgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccgggtcccagtggtgtgtagtgatcttc caggtcctctggttggcgttgcagaaactgcttcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggttgattcttaccaccttaggaatgctccggagggtaccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtgtgttcttttctttcacacaactgcccacc

356	Козий Kobuvirus 5Δ40/3Δ86 Proximal	gtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttactccttcgggactgttggggaggaacacaa cagggctcccctgtttccattccttccccctttccaacccaaccgcccgtatctggtggcggc aagacacacgggtctttccctctaagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtcctctgcgtacggt gctgggagtgtccccaccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcattgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccggttcccagtggtgtgtagtgcgatcttc caggtcctcctggttggcgttgcagaaactgctcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggttgattctttaccaccttaggaatgctccggaggtacccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtggtttctttttttcacacaacttctactgcttttctctcac aatccttgctcagttcaaagtc
357	Parabovirus	tgaaccgttacgcaccactcagttggtgtttggtggcaccatgatggaacaaaaggctacacca cttgggctacggcccgcgccacctgtggcgcaaagacattagaagaatagcataccgcccac tagggccctgcagccagcagggtaacgggcaagcacttctgtctccccggtagaacggatag gctgtaccacggccgaaaactgaactatcgttaccgactccgtacttcgcaaagcttagtagg aaactggaaagttcaggtattgaccggaggttccccccactccagaaacgcgtgatgaggg ttgccaccccgaccatggcgacatggtgggcatcctgcgctggcacgccccttaagagga taactcgtcctactggtaacgaagagccccgtgagctacggttattctcccgctccctgaat gcccctaactcctaaccatgagcagttgccatagatccataggtggactgtcgtaacgcgtaag tttggggcggaaccgactacttgggatggcgtgttcttcttttctccattgtgtgtatggtgac aagttatagatctcgatctatagcgttcttgagagatttcaaacatttattcaagtcgtacaattctt gtgttaagcagtagtaagg
358	Parabovirus 5Δ48	aacaaaaggctacaccacttgggctacggcccgcgccacctgtggcgcaaagacattagaag aatagcataccgcccactagggccctgcagccagcagggtaacgggcaagcacttctgtctcc ccggtagaacggataggtgtaccacggccgaaaactgaactatcgttaccgactccgtac ttcgcaaagcttagtaggaaactggaaagttcaggtattgaccggaggttccccccactcca gaaacgcgtgatgaggggtgccaccccgaccatggcgacatggtgggcatcctgcgctggc acgccccttaagaggataactcgtcctactggtaacgaagagccccgtgagctacggttt attctccgctccctgaatgcccctaactcctaaccatgagcagttgccatagatccataggtg gactgtcgtaacgcgtaagttgtggggcggaaccgactacttgggatggcgtgttcttctttct ccattgtgtgtatggtgacaagttatagatctcgatctatagcgttcttgagagatttcaaacat ttattcaagtcgtacaattctgtgttaagcagtagtaagg
359	Parabovirus 5Δ67	tgggctacggcccgcgccacctgtggcgcaaagacattagaagaatagcataccgcccacta gggcccctgcagccagcagggtaacgggcaagcacttctgtctccccggtagaacggataggg ctgtaccacggccgaaaactgaactatcgttaccgactccgtacttcgcaaagcttagtagga aactggaaagttcaggtattgaccggaggttccccccactccagaaacgcgtgatgaggggt gccaccccgaccatggcgacatggtgggcatcctgcgctggcacgccccttaagaggat aactcgtcctactggtaacgaagagccccgtgagctacggttattctccgctccctgaatg cggctaactcctaaccatgagcagttgccatagatccataggtggactgtcgtaacgcgtaagtt gtggggcggaaccgactacttgggatggcgtgttcttctttctccattgtgtgtatggtgaca agttatagatctcgatctatagcgttcttgagagatttcaaacatttattcaagtcgtacaattcttg tgttaagcagtagtaagg
360	Parabovirus 3Δ60	tgaaccgttacgcaccactcagttggtgtttggtggcaccatgatggaacaaaaggctacacca cttgggctacggcccgcgccacctgtggcgcaaagacattagaagaatagcataccgcccac tagggccctgcagccagcagggtaacgggcaagcacttctgtctccccggtagaacggatag gctgtaccacggccgaaaactgaactatcgttaccgactccgtacttcgcaaagcttagtagg aaactggaaagttcaggtattgaccggaggttccccccactccagaaacgcgtgatgaggg

		<p>ttgccaccccgaccatggcgacatggtgggcatccctgcgctggcacgcgccctctaagagga taactcgctcctactggttaaccgaagagccccgtgagctacggttattcctccgctccctgaat gchgtaaatcctaaccatgagcagttgccatagatccatagtggtggactgtcgtaacgcgtaag ttgtggcggaaccgactactttgggatggcgtgtttcctgttttccattgtgtgtatggtgac aagttatagatctcgatctatagcgtttgtaagg</p>
361	Apodemus Picornavirus	<p>ttgaaaggggtgccgatatcatggcgtttctcgccatgatatccgcacattgcaaacccatattg catacccactgggtatgattatggggaggcccccttcacccctcccccccaattaccctttccc cctctagtaaccatacgtttactcagcgttaactactccgggttacgtgatgaagaagaggctac ggagattctcgggctacggccctggagccactccggctcctaaagattagaagttgagcaca cccgccactagggccccccatccaggggggcaacgggcaagcacttctgtttccccggtatg atctgataggctgtaaccacggctgaaacagagattatcgttatccgcttcactacttcgagaagc ctagtaatgatgggtgaaattgaatccgttgatccggtgtctccccacaccagaaactcatgatg aggggtgccatccggctacggcgacgtagcgggcatccctgcgctggcatgaggcctcttag gaggacggatgatatggatctgtcgtgaagagcctattgagctagtgtcgactcctccgcccc gtgaatgchgtaaatcctaaccggagcaggtgggtccaatccaggccctggcctgtcgtaat gcgtaagtctgggacggaaccgactactttcggaaggcgtgtttccattgttcattattgtgtgt ttatggtgacaactctgggtaaacgttctattgcgtttattgagagattcccaacaattgaacaac gagaactacctgtttattaaattacacagagaagaattaca</p>
362	Apodemus Picornavirus 5Δ105	<p>cccccccccaattaccctttccccctctagtaaccatacgtttactcagcgttaactactccg ggttacgtgatgaagaagaggctacggagattctcgggctacggccctggagccactccggct cctaaagattagaagttgagcacaccgcccactagggccccccatccaggggggcaacgg gcaagcacttctgtttccccggtatgatctgataggctgtaaccacggctgaaacagagattatcg ttatccgcttcactacttcgagaagcctagtaatgatgggtgaaattgaatccgttgatccggtgtct ccccacaccagaaactcatgatgagggtgccatccggctacggcgacgtagcggcatcc ctgcgctggcatgaggcctcttaggagacggatgatatggatctgtcgtgaagagcctattga gctagtgtcgactcctccgccccgtgaatgchgtaaatcctaaccggagcaggtgggtcca atccaggccctggcctgtcgtaatgcgtaagtctgggacggaaccgactactttcggaaggc gtgtttccattgttcattattgtgtttatggtgacaactctgggtaaacgttctattgcgtttattga gagattcccaacaattgaacaacgagaactacctgtttattaaattacacagagaagaattaca</p>
363	Apodemus Picornavirus 5Δ201	<p>attctcgggctacggccctggagccactccggctcctaaagattagaagttgagcacaccg ccactagggccccccatccaggggggcaacgggcaagcacttctgtttccccggtatgatctga taggctgtaaccacggctgaaacagagattatcgttatccgcttcactacttcgagaagcctagta atgatgggtgaaattgaatccgttgatccggtgtctccccacaccagaaactcatgatgagggt gccatccggctacggcgacgtagcggcatccctgcgctggcatgaggcctcttaggagga cggatgatatggatctgtcgtgaagagcctattgagctagtgtcgactcctccgccccgtgaat gchgtaaatcctaaccggagcaggtgggtccaatccaggccctggcctgtcgtaatgcgta agtctgggacggaaccgactactttcggaaggcgtgtttccattgttcattattgtgtttatgg tgacaactctgggtaaacgttctattgcgtttattgagagattcccaacaattgaacaacgagaa ctacctgtttattaaattacacagagaagaattaca</p>
364	Kobuvirus SZAL6	<p>tttacacccttttccgggtggtccggaccagaccaccgtaactccattcagctacttcggtacc tgttcggaggaattaacgggaccctaccaagggttacatgggaccatactcctcccctg taacttaagttttgtcccgtattcttactccaggcggatgtgtgtcggcctctgtgaacaaa cagctagacactttcctcccctcctctgggctgtccggcagtcactcctccccagcgtgta acatgccccgctggagtgatgcacctggaagtcgtggacgtgggttagtaactcggtgaaac ccactataatgacaactgggtgacccccactcaaggactcgagtctttccttaaggctag</p>

		cccggccacatgaatttgagctggcaactagtgagtcaccatgtcccgaacctcggtgcg gagtgctgttcccaagcgtatgccttctctgtaagagtgcgcctggcaagcacatctgagaa gtcgttccgctgcgtcgtgccaacctggcgacaggtgaccagtggtgctgtagacttctccggat tcgtccggctcttcttaggaaacatgcgtgtaagggtcatgtgccaaagcctgcgcgcggtgtt cttctactgccctaggaatgtgccgaggtaccctacttcggtagggatctgagcggtagctaa ttgtctacgggtagttcattccatcttcttccaggtcgacatc
365	Kobuvirus SZAL6 5Δ158	ttgactccaggcggatgtgtgtcgcctcctgtgaacaaacagctagacacttctccctcc ctctgggctgctccggcagtcactccctccccagcgtaacatgccccgctggagtgatgca cctggaagtcgtggacgtgggttagtaactcgggtgaaaaccactataatgacaactggtgac ccccactcaaaggactcgagtcttctcccttaaggctagccccggccacatgaatttgagct ggcaactagtgagtcaccatgtcccgaacctcggtgcgagtgctgttcccaagcgtatg ccttcttctgtaagagtgcgcctggcaagcacatctgagaagtcgttccgctgcgtcgtgcaa cctggcgacaggtgaccagtggtgtagacttctccgattcgtccggctcttcttaggaaa catgcgtgtaagggtcatgtgcaaagcctgcgcgcggtgttcttactgccctaggaatgtgc cgaggtaccctacttcggtagggatctgagcggtagctaatgtctacgggtagttcattcca tcttcttccaggtcgacatc
366	Kobuvirus SZAL6 5Δ76	gaattaaacgggcaccctaccaagggtfacatgggaccatattcctcctcccctgtaactttaaag tttgtgcccgtattcttgactccaggcggatgtgtgtcgcctcctgtgaacaaacagctagac acttctccccctcctctgggctgctccggcagtcactccctccccagcgtaacatgcccc gctggagtgatgcacctggaagtcgtggacgtgggttagtaactcgggtgaaaaccactataat gacaactggtgacccccactcaaaggactcgagtcttctcccttaaggctagccccggccac atgaatttgagctggcaactagtgagtcaccatgtcccgaacctcggtgcgagtgctgtt cccaagcgtatgccttctctgtaagagtgcgcctggcaagcacatctgagaagtcgttccgc tgcgtcgtgccaacctggcgacaggtgaccagtggtgctgtagacttctccgattcgtccggct cttcttaggaaacatgcgtgtaagggtcatgtgccaaagcctgcgcgcggtgttcttactgc cctaggaatgtgccgaggtaccctacttcggtagggatctgagcggtagctaatgtctacgg gtagttcattccatcttcttccaggtcgacatc
367	Kobuvirus SZAL6 3Δ37	tttacacctcttttccgggtggtcggaccagaccaccgtactccattcagctacttcggtagc tgttcggaggaattaaacgggcaccctaccaagggtfacatgggaccatattcctcctcccctg taactttaaagtttgtgcccgtattcttgactccaggcggatgtgtgtcgcctcctgtgaacaaa cagctagacacttctccccctcctctgggctgctccggcagtcactccctccccagcgt acatgccccgctggagtgatgcacctggaagtcgtggacgtgggttagtaactcgggtgaaaac ccactataatgacaactggtgacccccactcaaaggactcgagtcttctcccttaaggctag cccggccacatgaatttgagctggcaactagtgagtcaccatgtcccgaacctcggtgcg gagtgctgttcccaagcgtatgccttctctgtaagagtgcgcctggcaagcacatctgagaa gtcgttccgctgcgtcgtgccaacctggcgacaggtgaccagtggtgctgtagacttctccggat tcgtccggctcttcttaggaaacatgcgtgtaagggtcatgtgccaaagcctgcgcgcggtgtt cttctactgccctaggaatgtgccgaggtaccctacttcggtagggatctgagcggtagctaa ttggacatc
368	Salivirus SZ1	tctgtctcaccctcttcccttcttctgcaccgttacgcttactcgcattgagtggtgc acgtgcttgaacaaacagctacactcacatggggcggggtttcccgcctgcgccctctcgcg aggeccaccctccccttctccataactacagtcttggtaggtaagcatcctgacccccgc ggaagctgctcacgtggcaactgtggggaccagaggtatcaaaggcaccggcttctcc gccttcaggagtatccctgctagtgaattctagtagggctctgcttgggtccaacctccccaaat gcgcgctcgggagtgcttctcccaactaccctagatcctctcatgtgtgtgcttggtagca

		tatctgagacgatgtccgctgtcccagaccagtccagtaatggacgggccaagtgtgcgtagtc gtcttccggcttgcggcgcatgtttggtgaaccgggtgggtaagggtggtgtcccaacgcc gtactttggtgatacctaagaccaccaggaatgccaggaggtaccccgcttcacagcggg atctgaccctgggctaattgtctacgggtgttcttcttcttccacttcttctactgttcatg
369	Crohivirus B	gtataagagacagggtttgccttgtcttcggactggcatcttgggaccaacccccctttccca gccatgggttaaatggcaataaaggacgtaacaactttgtaaccattaagctttgtaattttgtaacc actaagctttgtgcacataatgtaaccatcaagcttgttagtcccagcaggaggttgcatgcttgt agccgaaatggggctcgacccccatagtaggatacttgatttgcattccattgtggacctgcaa actctacacatagaggctttgtcttgcataaacacctgagtacagtgtgtacctagaccctatag tacgggaggaccggtttgttctcaataaccctacataataggctaggtgggcatgcccaatttgc aagatcccagactggggctggcttggcagggttagatccctgttagctactgcctgataggg tgggtctcaaccatgtgtagttaaattgagctgttcatatacc
370	Crohivirus B 5Δ51	ccccctttcccagccatgggttaaatggcaataaaggacgtaacaactttgtaaccattaagc tttgaattttgtaaccactaagctttgtgcacataatgtaaccatcaagcttgttagtcccagcagg aggtttgcattgctttagccgaaatggggctcgacccccatagtaggatacttgatttgcattcc attgtggacctgcaactctacacatagaggctttgtcttgcataaacacctgagtacagtgtgt acctagaccctatagtagcgggaggaccggtttgttctcaataaccctacataataggctaggtgg gcatgcccaatttgaagatcccagactggggctggcttggcagggttagatccctgttagct actgcctgatagggtgggtctcaaccatgtgtagttaaattgagctgttcatatacc
371	CVB3	ttaaacagcctgtgggtgatccaccacagggccattgggcgctagcactctggtatcac ggtacctttgtgcgctgtttataccccctccccactgtaacttagaagtaacacacaccgatc aacagtcagcgtggcacaccagccacgttttgatcaagcacttctgttaccctggactgagatc aatagactgctcacggttgaaggagaaagcgttcgttatccggccaactacttcgaaaaacct agtaacaccgtggaagttgcagagtgttctcgtcagcactaccctagtagatcaggtcgatga gtcaccgcatccccacgggcgaccgtggcggtggctgcgttggcggcctgccatggggaa acctatgggacgctctaatacagacatgggtgcgaagagtctattgagctagtggtagtctccg gcccctgaatgcggctaactcctaactgcggagcacacacctcaagccagagggcagtggtgc gtaacgggcaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgtttcattttattcctatactg gctgcttatgggtgacaattgagagattgttaccatatactattggattggccatccggtgaccaat agagctattatatactctttgttgggttataccacttagcttgaagagggttaaacattacaattca ttgtaagttgaatacagcaaa
372	CVB3 3Δ91	ttaaacagcctgtgggtgatccaccacagggccattgggcgctagcactctggtatcac ggtacctttgtgcgctgtttataccccctccccactgtaacttagaagtaacacacaccgatc aacagtcagcgtggcacaccagccacgttttgatcaagcacttctgttaccctggactgagatc aatagactgctcacggttgaaggagaaagcgttcgttatccggccaactacttcgaaaaacct agtaacaccgtggaagttgcagagtgttctcgtcagcactaccctagtagatcaggtcgatga gtcaccgcatccccacgggcgaccgtggcggtggctgcgttggcggcctgccatggggaa acctatgggacgctctaatacagacatgggtgcgaagagtctattgagctagtggtagtctccg gcccctgaatgcggctaactcctaactgcggagcacacacctcaagccagagggcagtggtgc gtaacgggcaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgtttcattttattcctatactg gctgcttatgggtgacaattgagagattgttaccatatactattggattggccatccggtgaccaat a
373	SAFV	cacttatttaattcggcctttgtgacaagccccctgggtgaaagaacctctctcttttcgacgtggtg gaattgccatcattccgacgaaagtctatcatgcctccccgattatgtgatgtttctgcctgct gggaggagcattctcgggttgagaaacctgaatcttttcttggaaaccttgggtccccggctca

		agccgcttggaatatgacaggggtattttcttgatcttatttctacttttgcgggttctatccgtaaaaa gggtacgtgctgcccccttctctctggagaattcacacggcggtctttccgtctctcaacaagtgt gaatgcagcatgccggaacgggtgaagaaaacagtttctgtggaaatttagagtgcacatcga aacagctgtagcgaacctcacagtagcagcggactcccccttggcgacaagagcctctgcggc caaaagccccgtggataagatccactgctgtgagcggtgcaacccagcaccctggttcgtatg atcattctctatggaaccagaaaatggtttctcaagccctccggtagagaagccaagaatgtcct gaaggtaccccgctgcgggatctgatcaggagaccaattggcggtgctttacactgtcactttg gttataaaattgtcacagcttctccaaaccaagtggcttggtttccaattttgtga
374	SAFV 5Δ46	cctctcttttcgacgtggttgaattgccatcatttccgacgaaagtctatcatgcctccccgat tatgtgatgtttctgccccgtctggcgaggacattctcgggttgagaaaccttgaatcttttcttgg aaccttggttccccgggtctaagccgcttgaatatgacaggggtattttcttgatcttatttctacttt gccccgtctatccgtaaaaagggtacgtgctgcccccttctctctggagaattcacacggcggt cttccgtctcaacaagtgtgaatgcagcatgccggaacgggtgaagaaaacagtttctgtgg aaatttagagtgcacatcgaaacagctgtagcgaacctcacagtagcagcggactcccccttgg cgacaagagcctctgcggccaaaagccccgtggataagatccactgctgtgagcggtgcaac cccagcaccctggttcgtatgatcattctctatggaaccagaaaatggtttctcaagccctccggt agagaagccaagaatgtcctgaaggtaccccgctgcgggatctgatcaggagaccaattggc gggtcttacactgtcactttggttataaaattgtcacagcttctccaaaccaagtggcttggtttc caattttgtga
375	SAFV 5Δ93	gtgctatcatgcctccccgattatgtgatgtttctgcctgctggcgaggacattctcgggttgag aaaccttgaatcttttcttggaaaccttggttccccgggtctaagccgcttgaatatgacaggggt atfttcttgatcttatttctacttttgcgggttctatccgtaaaaagggtacgtgctgcccccttctctc tggagaattcacacggcggtcttccgtctctcaacaagtgtgaatgcagcatgccggaacgggt gaagaaaacagtttctgtggaaatttagagtgcacatcgaaacagctgtagcgaacctcacagta gcagcggactcccccttggcgacaagagcctctgcggccaaaagccccgtggataagatcca ctgctgtgagcggtgcaacccagcaccctggttcgtatgatcattctctatggaaccagaaaatg gttttctcaagccctccggtagagaagccaagaatgtcctgaaggtaccccgctgcgggatct gatcaggagaccaattggcggtgctttacactgtcactttggttataaaattgtcacagcttctcca aaccaagtggcttggtttccaattttgtga
376	SAFV 3Δ47	cactatttaattcggccttttggacaagccctcgggtgaaagaacctctctcttttcgacgtggttg gaattgccatcatttccgacgaaagtctatcatgcctccccgattatgtgatgttttctgcctgct ggcgaggacattctcgggttgagaaaccttgaatcttttcttggaaaccttggttccccgggtcta agccgcttggaaatgacaggggtattttcttgatcttatttctacttttgcgggttctatccgtaaaaa gggtacgtgctgcccccttctctctggagaattcacacggcggtctttccgtctctcaacaagtgt gaatgcagcatgccggaacgggtgaagaaaacagtttctgtggaaatttagagtgcacatcga aacagctgtagcgaacctcacagtagcagcggactcccccttggcgacaagagcctctgcggc caaaagccccgtggataagatccactgctgtgagcggtgcaacccagcaccctggttcgtatg atcattctctatggaaccagaaaatggtttctcaagccctccggtagagaagccaagaatgtcct gaaggtaccccgctgcgggatctgatcaggagaccaattggcggtgctttacactgtcactttg gttataatgtga
377	SAFV Kozak	cactatttaattcggccttttggacaagccctcgggtgaaagaacctctctcttttcgacgtggttg gaattgccatcatttccgacgaaagtctatcatgcctccccgattatgtgatgttttctgcctgct ggcgaggacattctcgggttgagaaaccttgaatcttttcttggaaaccttggttccccgggtcta agccgcttggaaatgacaggggtattttcttgatcttatttctacttttgcgggttctatccgtaaaaa gggtacgtgctgcccccttctctctggagaattcacacggcggtctttccgtctctcaacaagtgt

		gaatgcagcatgccggaacgggtaagaaaacagtttctgtggaaatttagagtgcacatcga aacagctgtagcgacctcacagtagcagcggactccccctctggcgacaagagcctctgcggc caaaagccccgtggataagatccactgctgtgagcgggtgcaacccagcaccctggtcagtg atcattctctatggaaccagaaaatggtttctcaagccctccggtagagaagccaagaatgtcct gaaggtacccccgctgcgggatctgatcaggagaccaattggcgggtgctttacactgtcactttg gttataaaattgtcacagcttctccaaccaagtggtcttggtttccaattttgtgaccgcc
378	GLuc CK dCTG1	gtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttactccttcgggactgttggggaggaacacaa cagggtccccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgccgtatctggtggcggc aagacacacgggtctttccctctaagcacaattgtgtgtgtgtcccagggtcctctgcgtacggg gcgggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcagtgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccggtccccagtggtgtgtagtgcgatcttc caggctcctctggttggcgttgcagaaaactgctcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggtgattctttaccaccttaggaatgctccggaggtaccccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtggttttcttttttccacacaactctacGTctgacaactc actgactatccactgtctctaaagtc
379	GLuc CK dCTG1_2	gtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttactccttcgggactgttggggaggaacacaa cagggtccccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgccgtatctggtggcggc aagacacacgggtctttccctctaagcacaattgtgtgtgtgtcccagggtcctctgcgtacggg gcgggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcagtgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccggtccccagtggtgtgtagtgcgatcttc caggctcctctggttggcgttgcagaaaactgctcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggtgattctttaccaccttaggaatgctccggaggtaccccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtggttttcttttttccacacaactctacGTcGTacaact cactgactatccactgtctctaaagtc
380	GLuc CK dCTG1_2_3	gtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttactccttcgggactgttggggaggaacacaa cagggtccccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgccgtatctggtggcggc aagacacacgggtctttccctctaagcacaattgtgtgtgtgtcccagggtcctctgcgtacggg gcgggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcagtgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccggtccccagtggtgtgtagtgcgatcttc caggctcctctggttggcgttgcagaaaactgctcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggtgattctttaccaccttaggaatgctccggaggtaccccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtggttttcttttttccacacaactctacGTcGTacaact cacGTactatccactgtctctaaagtc
381	GLuc CK dAll	gtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttactccttcgggactgttggggaggaacacaa cagggtccccctgtttccattccttcccccttttccaacccaaccgccgtatctggtggcggc aagacacacgggtctttccctctaagcacaattgtgtgtgtgtcccagggtcctctgcgtacggg gcgggagtgtcccccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcagtgtccgctgcggatgccgaccgggtaaccggtccccagtggtgtgtagtgcgatcttc caggctcctctggttggcgttgcagaaaactgctcaggttaagtggggtgtgccaatccctac aaaggtgattctttaccaccttaggaatgctccggaggtaccccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtggttttcttttttccacacaactctacGTcGTacaact cacGTactatccactgtctctaaagtc
382	CK SZ1-L1S	gggggtggggggggcctcgccccctaccctctttccgggtggccacgcccgggcccaccga tacttcccttactccttcgggactgttggggaggaacacacagggtccccctgtttccattcc tcccccttttccaacccaaccgccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctcta

		aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtcctcctgcgtacggtgcgaggagtgtcccaccaactg ttgtaagcctgtccaacgcctcctcctggcaagactatgacgtcgcgatgtccgctgcggtgccc gaccgggtaaccggttcccagtggtgtgtgtagtgcgatcttccaggtcctcctggttggcgtgtcc agaaactgcttcaggttaagtgggggtgtgcccaatccctacaaaggtgaaccaccaggaatgc cagggaggtaccccgcttcacagcgggatctgacctgggctaattgtctacgggtggttctcttg cttcacttcttctactgttcgccacc
383	CK Aichi Scan (AV-S)	gggggtggggggggcctcggccccctaccctctttccggtggccacgcccgggcccaccga tacttccctcactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggctcccctgttttcccattcc ttccccctttccaacccaaccgcccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctcta aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtcctcctgcgtacggtgcgaggagtgtcccaccaactg ttgtaagcctgtccaacgcctcctcctggcaagactatgacgtcgcgatgtccgctgcggtgccc gaccgggtaaccggttcccagtggtgtgtagtgcgatcttccaggtcctcctggttggcgtgtcc agaaactgcttcaggttaagtgggggtgtgcccaatccctacaaaggtgattctttaccaccttag gaatgctccggaggtaccccagcaacagctgggatctgaccggaggctaattgtctacgggtg gtgtttcattccaatcctttatgtcggagtc
384	CK Aichi Loop (AV-L1)	gggggtggggggggcctcggccccctaccctctttccggtggccacgcccgggcccaccga tacttccctcactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggctcccctgttttcccattcc ttccccctttccaacccaaccgcccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctcta aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtcctcctgcgtacggtgcgaggagtgtcccaccaactg ttgtaagcctgtccaacgcctcctcctggcaagactatgacgtcgcgatgtccgctgcggtgccc gaccgggtaaccggttcccagtggtgtgtagtgcgatcttccaggtcctcctggttggcgtgtcc agaaactgcttcaggttaagtgggggtgtgcccaatccctacaaaggtgaactgccctaggaatg ccaggcaggtaccccactcggggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagtttcc ttttctttcacacaactctactgctgacaactcactgactatccactgctctcttgcctttctgct ctggttcaagttccttgattgttttgactgcttttactgcttttctcacaatccttgcctcagttcaa agtc
385	CK SZ1-L2	gggggtggggggggcctcggccccctaccctctttccggtggccacgcccgggcccaccga tacttccctcactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggctcccctgttttcccattcc ttccccctttccaacccaaccgcccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctcta aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtcctcctgcgtacggtgcgaggagtgtcccaccaactg ttgtaagcctgtccaacgcctgatccccgcggaagctgtcacgttggcaactgtggggaccaca gacaggtatcaaaagccaccgggtcttccgcttcaggagatccctgctagtgaaattcagtag ggctctgcttgcgttgcagaaactgcttcaggttaagtgggggtgtgcccaatccctacaaaggtt gattctttaccaccttaggaatgctccggagggtaccccagcaacagctgggatctgaccggag gctaattgtctacgggtggtgttcttttcttttcacacaactctactgctgacaactcactgactat ccactgctctcttgcctttctgctctgggtcaagttccttgattgttttgactgctttcactgctttt cttctcacaatccttgcctcagttcaagtc
386	CK Aichi TriLoop (AV- L2)	gggggtggggggggcctcggccccctaccctctttccggtggccacgcccgggcccaccga tacttccctcactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggctcccctgttttcccattcc ttccccctttccaacccaaccgcccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctcta aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtcctcctgcgtacggtgcgaggagtgtcccaccaactg ttgtaagcctgtccaacgcctgctcctggcaagcatalctgagaaggtgtccgctgtggtgctgcc aacctggtgacaggtgcccagtgctgtaaccttcttccgctcgggacgggtgctgttgcagaa aactgcttcaggttaagtgggggtgtgcccaatccctacaaaggtgattctttaccaccttaggaat gctccggagggtaccccagcaacagctgggatctgaccggaggctaattgtctacgggtggtgtt

		tccttttcttttcacacaactctactgctgacaactactgactatccacttgctctctgtgcctttct gctctgggtcaagttccttgattgttttgactgctttcactgctttcttctcacaatccttgctcagttc aaagtc
387	CK Scan Deletion (ΔS)	gggggtggggggggcctcggccccctaccctctttccggtggccacgcccgggcccaccga tacttcccttcaactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggctcccctgttttcccattcc ttccccctttcccaacccaaccgcccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctcta aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtctcctcgtacgggtgcccgggagtgtcccaccaactg ttgtaagcctgtccaacgcgctcctcggcaagactatgacgtcgcattgtccgctgcccgatgcc gaccgggtaaccgggtcccagtggtgtgtagtgcgatcttccaggtcctcctggtggcgtgtcc agaaactgctcaggttaagtgggggtgtgcccaatccctacaaaggttgattctttcaccaccttag gaatgctccggaggtaacccagcaacagctgggatctgaccggaggctaattgtctacgggtg gtg
388	CK Loop Deletion ($\Delta L1$)	gggggtggggggggcctcggccccctaccctctttccggtggccacgcccgggcccaccga tacttcccttcaactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggctcccctgttttcccattcc ttccccctttcccaacccaaccgcccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctcta aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtctcctcgtacgggtgcccgggagtgtcccaccaactg ttgtaagcctgtccaacgcgctcctcggcaagactatgacgtcgcattgtccgctgcccgatgcc gaccgggtaaccgggtcccagtggtgtgtagtgcgatcttccaggtcctcctggtggcgtgtcc agaaactgctcaggttaagtgggggtgtgcccaatccctacaaaggttgattcttttctttcaca caactctactgctgacaactactgactatccacttgctctcttctgctttctgctctggttcaagtt ccttgattgttttgactgctttcactgcttttcttctcacaatccttgctcagttcaagtc
389	CK Triloop Deletion ($\Delta L2$)	gggggtggggggggcctcggccccctaccctctttccggtggccacgcccgggcccaccga tacttcccttcaactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggctcccctgttttcccattcc ttccccctttcccaacccaaccgcccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctcta aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtctcctcgtacgggtgcccgggagtgtcccaccaactg ttgtaagcctgtccaacgcgcttgcgaaactgctcaggttaagtgggggtgtgcccaatccc tacaaggttgattctttcaccaccttaggaatgctccggaggtaacccagcaacagctgggatc tgaccggaggctaattgtctacgggtggtgtttccttttcttttcacacaactctactgctgacaact cactgactatccacttgctctctgtgctttctgctctggttcaagttccttgattgttttgactgcttt cactgcttttcttctcacaatccttgctcagttcaagtc
413	RhPV	gataaaagaacctataatcccttcgcacaccgctacaccgctatattgctgctcattaggaat tacggctcctttttgtggatacaatcttctgtatagatatactattgttaattcattgacctttacgc aatcctgcgtaaatgctggatagggtgacttccgatttccgagcctatattggtttgaaaggac cttaagtcctactatactactattgactagcgtaggccacgtaggccgtaagattataactat tttattatattttaccaccccaacattaatcccagttaaagctttataactataagtaagccgtgccg aacgtaaatcggctcgtagtgtgtaacaactgttagtttaattttcaaaattttttcacaatttt agtaagattttgacttgccttaagcagctttatctctgtatatttttaagtttataggagcaaa gttcgcttactcgaatagctattttatttttaggaatattatcacctcgttaatttttaattataaca ttagctttatctattata
414	Halastavi arva (1x mut)	cttgattctaaccctgccgtatgggtgccctaaccgggttcatttaacatgcgatgagggtgctatac cgcattcatttaaggcattcaatgcttcatttaggaattttgtgacgattaaaaggtacccccac aaaaacaaaaccaatcttactgattttcgtttaactgaccactgcgatcccaattttcgccttcta

		tcaaagtatggtgtggtcttgggtgtacaacctgagaactgtctacaactacatattactcgagga agaaattcgggttaagccgtgccttctcacgttagtatatctatctGgacacaccttctcatctct aatccccatctagtctcctgatcagagacgtcgttattaacaataacccccctgtaataagaga caaagtacaatcaagctaagttctctggagttcctgtaggaacttagccattgtgatagagtcata agtctatgtgcatagacagctctagctcaccatttcttcccaacctctttcatcagcttaactct atgaatccgatgcaaaaaccattctaactcttatgggtccttccaagccaaatgagagctcactct tttgagccgctatttaatggacaataaacgttttatagtgatcatcatattgtaaaaaaaa
415	Oscivirus	cctcggtcctcttccgctgccgcccacgacgttaaatgcgggtgtggtgcttaggtgccaca ccactgctatttgggtcccccttccctataatggttgttttattcaattcttgaggattggcac ctccttatgccaatctaaatcgtggaggatccaggcttctggtcttaacagaactccacgtcc aggatcatagaaactggttgtaggctgcctgagtagtccattgctagtagtcccttgtgaacagg gtggctcccgttactgctggtattcccgggtgtaggtgccatgggtgtaacacctcctgcattgt gtgtgaaccagtaccgcaaggatagcaaggatgaacacttgggacgaaatggtaagtatca atcactttcatggccggaaggacgtggcaatcatgccaccaggatccctcctctgggagg atctgagggtgggctaagcagacctgccatgtggctgaactttccctattgtttactttgtaac attatagttgttagtgattgtgtgtgtgcccttgtagctatatccagtataagttcgagctag aagtaatccttcgacatcggctgtattggaa
416	Cadicivirus B	caccaaccttgacctgtaatgtcagtgagacagagtgctcctctgttcccggttaccgtgtccag gacacgattgtaatcctgcgcctcaccagcgtgcgtgcacgtctgcataaggaacgtgccttc cccatgtctctatcaattcttggtagtgaccgccctagttgctcatcctatgggattctctctcat gggttcttggcatgcgaatgtcaccttaattggaggctttaaattagatatccttctcatcttga tatgagtgctggaatttgattcctagctctctgcaaaacaacccacttgatgaattcaactttcaac cgcacaaacataatcaggttttaattgaatgtttctaaattctaaattagtttattaagtagttgc catcttgactcgatgtaaaattgcatacaagtcttctttcttttacacttgaagttgcacttag cagtcgttctgcacagcttctgagtttggatgcacatcgcaactccaccacctctcttttcta gtgtgaaatgcggctaactcctaacccgagagcaataaacccagggttattgtcgtaacgcgcaag tcttgacggaaccgactatacacacacctttacccttagtacaccttggtagc
417	PSIV (2x mut for Xba1)	gcaaaatgggtacgtagtaaccactgcgtatcaggattgcaggccacgaagggtattgcatat cttctatcgggtattacggcttaaacccgtgtatcttGTggttactgcctgtatcactagtggc cattttatttaggttagagaccctgatagtaggagagttacaaactcttataaaattgtgacccg gaaaagatggtagccctgtaagtagttgatAagaagatctatgcgctggcatagtaatccagt gttctctgttttaggatgacctctgaaagtagatgaccgtggaaagtcacgtagtcccccaataag cacgtttgggcagcgtgcgtatcacaaggctgatctccgaggagcccctgttttagctggctg gaagccaatgatcttaagtagataagtgctgttgcctgtagtcaacagaaagctttgagtacgtct tcttgcgagaaagaacacatgcattcttatgctctcaattctattttttttttgggcgaaaggaaa

		gctctcacgagtagcgaatagccaacccttat
418	PSIV IGR	GCTGACTATGTGATCTTATTAATAATTAGGTTAAATTTCTGA GGTTAAAATAGTTTTAATATTGCTATAGTCTTAGAGGTC TTGTATATTTATACTTACCACACAAGATGGACCGGAGCAG CCCTCCAATATCTAGTGTACCCTCG
419	PV Mahoney	ATGAGTCTGGACATCCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGC TGCGTTGGCGGCCTACCTATGGCTAACGCCATGGGACGCT AGTTGTGAACAAGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTACATA AGAATCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACCTCG GAGCAGGTGGTCACAAACCAGTGATTGGCCTGTCGTAAC GCGCAAGTCCGTGGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT GTTTCCTTTTATTTTATTGTGGCTGCTTATGGTGACAATCA CAGATTGTTATCATAAAGCGAATTGGATTGGCC
420	REV A	GGGGTCGCCGTCCTACACATTGTTGTGACGTGCGGCCAG ATTCGAATCTGTAATAAAAGCTTTTTCTTCTATATCCTCAG ATTGGCAGTGAGAGGAGATTTTGTTCGTGGTGTGGCTGG CCTACTGGGTGGGGTAGGGATCCGGACTGAATCCGTAGTA TTTCGGTACAACATTTGGGGGCTCGTCCGGGATTCCTCCC CATCGGCAGAGGTGCCTACTGTTTCTTGAAGTCCGGCGC CGGTAAGTAAGTACTTGATTTTGGTACCTCGCGAGGGTTT GGGAGGATCGGAGTGGCGGGACGCTGCCGGGAAGCTCCA CCTCCGCTCAGCAGGGGACGCCCTGGTCTGAGCTCTGTGG TATCTGATTGTTGTTGAACCGTCTCTAAGACGGTGATACT ATAAGTCGTGGTTTGTGTGTTTGTGTTACCTTGTGTTG TTCGTCACTTGTCGACAGCGCCCTGCGAATTGGTGTACCC ACACCGCGCGGCTTGCGAATAATACTTTGGAGAGTCTTTT GCCTCCAGTGTCTTCCGTTTGTACTCGTCCCTCTCCCTC TCCGGCCGGGATGGG
421	Tropivirus A	tgtcgcattgtgccaacatcaaaattctgggagagtcggaactcctaactgcctgcctcga cggagccgtgttatagtgtagcgggatacaaacattaaactaaaccactgcctgcaggaa ccccttacctttatattttatagtagtaaagtgaatctgtatgaatgtcatagaaaactgcaaat gagtaccacgttaacatgagagaatgatactggagaaatccaagttagaagtcactacgaatc ccagcggaaacaagggaattctgagcttctaataaggcgttaagactattgcaaaattctggtgc gtaagtgatattttcattgcgtagaacgctgtaaccactccggctagtataagcattgtagtcact tattatgaaactccacactatcctttctggagaagcacacaaactacatggtaagactagaccatt

		atcttaagcggtagtacactgcaacctgtaacaatgcttgatgactacttttgatatcttgagc aatattgtgaggtggacatgtccaaaggaatgtgtgggaatggaggggtccatttcccgtg cacgtagtgactagtattgggtgatagccttgcggcgatcaacatgtatttaacccgttgact tcac
422	Symapivirus A	ttggaaatcccaatgcttcttcaacaccgcctgactatgCGGTGGCGCTCGGCTCAACAAC tagtcaactcccccttaactactaccaagacttctaactacccttactactatttctaaattc aaactttattctcacgcttataaacatctttctatttggatggtatgtttgtgatttgtgtggtgta ttcatttaatgggatctagtgaccgtgccccggtgggatccgctcccttaaatgtttgcaagc actcttgacattataacctatcattagtttactgtttgatgatcgtatttctgaatcgtaacattatgc aattcttctcgcgagactgtctaggagataaagtctgcatatttagtgttacggttgataatg gagacttagatagcttcacactgaggacgcttttctctatcctttgacctgattcaggccagtgtg gagtaatgattgtatggatgggccctacaatttctaaactgggtgatagcctcgcggccgct cgccattatacaactgaatagcgggtgaaactctct
423	Sakobuvirus A FFUP1 (1x mut)	tcacgcgctttccggtggtcaccaccgtagggagcgcagcgttcgcgctccgctaccag gtgacacactccttccctccccattcccgctcccatcctctggactggtttctcctcacgattga ccagcagctgggagctgtaccagacgttgacagtaagtccggatgcactatagggctggt ggctagtcttggtaagcactcaacgccatacctaagtgtacctcggcttgcctcctggctgtg gtgaccggctgttctcttcccttggctcCagacgggctggtgtcctaccaccaccggtgcatgc agacctccccctgcgactcgaacgcctgtcccagcagggttagtatgtgctgtgcagatctg catgtgacacccatccactggtagagcaggaagtgccttagctaacgcggcaagtattacttt ccgctacacgtccttgagattcctcggacctctggaactagggtgactgtgggcttgggaaaacc caccttggctctgtactgctgatagggtcgcggctggccgaccagtggatgtagccagttgtttt gggat
424	Rosavirus C NFSM6F	caggagatctccatgaataatctttccacccttttagcgtctatgctattgaggacgggttga gccccgtgaccagcgtcagagtgtgtcggtagcaggctttctgctctcgccccatgccggcc acacctccattagtgtgaaggttgaagtacatgtgaaaaggttttaataattgagctgaat gtagcgattactaaggtagcggattccccacgtggtaacacgtgcctctcaggccaaaagc caaggtgtaaaagcacccttaggtaggccactacccgtggcctcagttctctagaagattca cttagtagtgtgtgactggcaactcttaagcagagctagtgagtggttaaggatgcctgaag gtaccgcaggtaacgttaagacactgtggatctgatcaggggctcagtgctgaagctttaca gaggtagctcgagttaaaaacgtctatgccctccccacgggagtgggggtccccacac caatttagattgcact
425	Rosavirus 2 GA7403	ccaggcatggcgtaaacaatgcaatcccttcccctagtaacctccttcgccccctcccacgtgtg acccctccgagatggctgctaaggcgtgtgctgctacagcagctctcgtgtttcgggtgtataag tgtttctttccactccactcctgctatggggagcggaacggcctgtctcggctgttcttctt

		gcagatcttcaccctccaggcttctggactcgcagggggtggagtagtaggcgactgtctaa gtgaaggtagcagtggttggcgaagagttgtggacactttgagttgtagcgatcatccaga gctagcggatctcccacgcggaacgcgtgccttaggccccaaaaggcacgggtgtcacagc acccttggatggcgggggtgccccctccgcactaaagtagaaaaacagcttagtagtcaaat aacatggcttctcaagcattcagtgctacatgggactgaaggatgccagaaggatcccgca ggcaacgataagctcactgtggatctgatctggggcctgggccagggtctatacactggfta aaacaaatctgtagtcagggttaaaaaacgtctaagtccccccccggggacgggggggt tccttaaacctcaactgacacc
426	Rhimavirus A	cgaattccggacatctccttccggggcgagcgtcaccgtgccctcatggaggcaactgtgcc tctaacggtagccactgagaaaatttcttctacgtggctaaacaatgcaacttataataacac aaatttaagcttaacttaacaccaaagattgaacatagtttggaaagtggcacactcaaacat tgcatagttgctaggggtgaagtcctttaagggtgagaggatcttctctttagagcggct aggagtatcttctgatattatgtggtcgtgcaactcactcccagatgatgacgggtactaagc gattggaactagtcataaccttgaatttggattgagtagcagggggatattaccgcta aagggtgacacactcgtgagggtggccttgggtgtgtatatttaccgccatcttgcaggg gtgctaaaattctaatgctgtgaaataaccatttctgaatacattctctacatttggagtcaaatatg aggaatgccactcaggtaccctgacatgatctggatctgagagtgggctaattatctaattttg gcgacttctaaaatcttctgttttagtggtgacaattatggftataaa
427	Rafivirus LPXYC22284 1	gtgtccgggaagcgactcaagctttgactgagtcctacacctcatccgtaacatcttaagtta tgtgcctatggacctctagtgactgcatcaccgggggtgattggactggttttccacaatcca ttcatcctgaggaatttggccttgtactaggatgggtcccaccacacgcttatctgtcctattgtg caacctgttcttaagtagttgtgcccgtgggtgagtagataaccacaacaatccgataaagcatc tcgcaaggatgtgagtaatggagtgatgtgctacagagaccacaacctgaaccaagagaga cacagtgaggattgaaagggggaactcttgaagggcatgtcccgaattcctactgactgac accgggggttgggtgctgggtgatttagcaaatcctgttactgggtgatagccttgtgcactcact tggttctgtataagtctgta
428	Rafivirus WHWGGF74 766	tgcgaatttatcgcacagtccttctccccatcttgtgtgtgatgggtaagccgcagagtaat acctactctgctgcaaacacactcactcttctatctactttatcatgtaataaagtagggaac atattcaattcatattgttcatctcactgaaccgcatgaaggactgcattgcatatcctggacgaa gtgactggaatattggacattatggattggacaccattacgcttgtgcctctacggagatgta accataatcttaagtagtagtaccacagcacaagaggataaagtggcatacacgacaacgggtg ttgctcgcacctagtaatgtggatgtcaccctggagcgtgctgaaactctgtgggtaaagaca cacattagtaacaatgtgggggaactcactgaaagggcatgtcccgtgactgggtgcccggaa agtgggggtcgttctggagaacttagtagtcttattgggtgatagccttgcggcgatcaa ctcacagtttaacccgtgttttgcac

429	Poecivirus BCCH-449	<p>actacacaatcgcaacacgcgcaagtttgtagtttgattggcgtgcaaatgtcaaatcaagcatat aacacaatttgggtggctgttgggtttgtataggaattttggttggttgaaatttgggatgttagg aaatatgcacaattacgtcagcgtcaggagtttataacctggcgcaacacaaaatggctctcgc gcttaacatcaccagcgaggtgtaaacaaattgaagtgaattagatcgtgtataggccagggga accatccctccaacgccacatcttgggggaagttgggataatgggggtctatatgaattggtc ttagaccacagtgaagagtgaatagatgcttgcggtccatttggtaatggcttagcatgggtg ggggcggcaaccccgtaggggttccccactggccaaaagcccaggggttagtcattcaacc aaggaagctggtaacctggtgacctgaactgagtggtagacccccctgctagagtgtgtaa ccgattgtaagcattttgttgccttagtatctgtggtataagcagtcattttgtataggctcaaggct gtgtagttagtagatgcccggaaggttactgatccggggaccgtgactatacattaggtaaa ccggttataaaaacc</p>
430	Megirivirus A LY	<p>ttcgggacactggatggcgacttgggtgggctgccactctatcttgaccttcggtactgacttcc ggatctctgactcctcctgtctcttgcgttgggtccacggacggactaattggaatgttactggct aagcctcgttctgaaataccctagccaatgggtttagtaggatcctgggtttccattaaacctctt ccgaccatagtagctagagttatggctgttaggatgtgggtaagaccgctttttgcgtatctccc acaagacaccggattatggatgtgtccgctggataaggctcgaaacctccaactgaaggtggg gctgaaatattgcaagcctaggttgtgtagaggcaagtagatgcctgccgcgacattcgtcttcc gccctttgggftagtagtgcctacatggacgtggggctgggaatccccacctgcataaacct ggttgatagacctgcggtggtaagttactatggtataaccagttgaaatggct</p>
431	Megirivirus E	<p>gcttggcaacctcatatcggtactctgccgaccagtctgggtcgtgtggccacacaatgggattc gttctgtgtgtagagtcacatggcattactgggctgatcgggtggggatccgttgcaccctaaa cccttacattactggactgcttttctggccccggaatgattcgtcaccgcgatgaggactgtt gttcttattatggcaggattacgcgtctgggtccgtaaggactaatcctatgtttatacggtactac ctgttctgaacgggtgggcgccaccccgctagtaggatcctggcttatcgtgtagacctctagg gaccacattagctagagttaggctgctatggatggagtagtgaccttttgggtatcactctct aagactccggaatgtgtcatagtagcgtggaatccttactgttttccatgagggggaggtggg gctgaaatattgcaagcaccctcggttaaacagtttgggtgccgcttatgcatattaccgccc ctttagtgggctgttttgcagctccgggttagtagagtaccatagtgacgcggtgttgggaat caccgcctggctgcacactgcttgatagagctcgggctggtaagtaattgtggtataaccag ttgattggcat</p>
432	Megirivirus C	<p>ttcccaccggctctggcaaacggacggttatcctggtagatgtctgatgggtgctggaacgtg gtggctactgctgccaccttctggcttcttaatgggcatctagctgggttcttgcacaatccat cttactcttaccattttctattaccagactgttgtaactggtaaagttgacctactggctcgtt ttgagactattctggtgttgggtggacactttccacaagtagattgtatggagttcatgctcgtttg aacggggaatggcacaaccgtagtaggatcttgcctctgccataactctgcgctgttctttt</p>

		<p>agactatgggctgctaaggatgacattggaacccttttggatattccatgtcaagtcaactgttc atctgggtfacgctgaaatcctgttccgaggtctgtctggaggtggtgctgaaatattgcaagc cacaggcagttccttgacttggcgctatcagatgctacaccctctatgggcaaattgtgaa cttagtggacgcgtgagatgggaatccacgccgcatagactggctgataagctcgcggctg atcgagttgcaacagtaacagttgattgccaact</p>
433	Ludopivirus	<p>tagacccccacctagcccttttccccgctcagtggggggcttactcactgggcatctgttaactgg cctaactagattgacaccactcccttggaaactccacgtaactcactggctctacgcaca gacacacgggtcttctgctatccccggggaagataccagatggcgaccggctgtcccagcggc ctagtagctactcgggtgagtagccaccacgggtttgacgcctgctaaaattcaagagacagag gtaggggtgcttagtgtgtgggggaagtccacaagcgaggcaaacattgctccctcgcgtc accgggtgcaaggtaaattggctggactccgctctacccttgcactcgcctcttcggagggtt cgaagtgacactaggtatacgcattggtgggaaccatgcctggcctactactgggtgatagcct ggcggcgggtccgtctcttggcttatacccgttgattgggat</p>
434	Livupivirus	<p>tatctacatggggatccaggctgtatggaatgtctgtcttaacaagcactataccagaaagatcca cccaaagtgggtgggactgggactgtgaggtgagaaatcccgaaccagccttctcaagcgtcg gacgatcttctgttttagtaaacacttgccttttaattggatgacaacacccttcagcaaatcgc aatctgaaatccaaaagactgttttagccgaactctgtaatactccggagaagtaggatacgc agcccctgtggactcttgattcaggactcaaggtagctagagctggaacttcatggaatgaaa aggaatatatgacattgtgccttctggcctttagcccgtcgtgaggatgtcgttgggaat cgacatcttagtccagtagcttgcctgatagagtgtcggctggcacagttacctgagaataagtcagt tgtacttaacatgaacaaaaaataactaccacaactaccacaatctaccaatactgaattatgc tgaatctcgtacagtaaaaacgttccgtggaaggacaagtattgaagtgcggttacatcatccgat acgcgctggatccctca</p>
435	Aichivirus A FSS693	<p>caccatacaccaccaccccttttctgtaactcaagatgtgtgctcgtaatcttgactcccacgg aatggatcgatccgctggagaacaaactgctagatccacatcctccctcccttgggaggacct cggctctcccacatcctccctccagcctgacgtatcacaggctgtgtgaaagccccgcgaaagc tgctcacgtggcaattgtgggtcccccttcaagacaccaggtcttctccttaaggctagc cccgatgtgtaattcacattgggcaactagtggtgctactgtgcctcccaatctcggccgagg agtgtgttcccaagccaaaccctggccctcactatgtgcctggcaagcatalctgagaagg tgttccgctgtggctgccagcctggaacaggtgccccagtgctgtaaccttctccgtctccgg acggtagtgtggttaagatttgggtgtaaggtcatgtccaacgccctgtgcgggatgaaacct ctactgccctaggaatgccaggcaggtacccacctcgggtgggatctgagcctgggctaatt gtctacgggtagttcattccaattctttatgctggagtc</p>
436	Aichivirus KVGH	<p>tactccattcagcttctcggaaactgttcggaggaattaaacgggacaccatactccccccacc ccccctttgtaactaagatgtgtgctcgtgacctgactcccacggaaacggaccgatccgttgg</p>

		<p>gaacaaacagctaggtccacatcctccttccctgggaggggtccccgccctccacatcccc ccccagcctgacgtgtcacaggctgtgtgaagcccccgaaagctgtcacgtggcaattgt gggtccccctcatcaagacaccaggctttcctcctaaggctagccccggcgtgtgaactca cgtgggcaactagtggtgtcactgtgcgtcccaatctcggccgaggagtgtgttccccaa ccaaccctggccctcactatgtgcctggcaagcacacctgagaagggttccgctgtggct gccagcctggtaacagggtgccccagtgtgcgtaaccttctccgtctcggacgggtggtgattgg ttaagattgggtgaagggtcatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaaccttactgccttagga atgccaggcaggtagccccacctcgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtggtt cattccaattcttcatgtcggagtc</p>
437	Aichivirus DV	<p>tactccattcagcttctcggaaacctgtcggaggaattaaacgggcaccatacaccacc cctttctgcaacttaagtatgtgtcctgtaatcttactcccacggaacggatcgcctgga gaacaaactgctagatccacatcctccttccccctgggaggaccggctctccacatcctcc cccagcctgacgtaaacacaggctgtgtgaagtcccccgaaagctgtcacgtggcaattgtg gggtccccctcaccagaacaccaggctttcctcctaaggctagccccgatgtgtgaattcaca ttgggcaactagtggtgtcactgtgcgtcccaatctcggccgaggagtgtgttccccaa gaacccctggccctcactatgtgcctggcaagcacaatctgagaagggtgtccgctgtggctcca gcctggtaacagggtgccccagtgtgcgtaaccttctccgtctccggacggtagtgattggttaag attgggtgaagggtcatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaaccttactgccttaggaatgc caggcaggtagccccacctcgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagttcatt ccaattctttatgtcggagtc</p>
438	Murine Kobuvirus 1	<p>gtaactcaagtgtgtgtcctgtaatcttactcctgccggaatgccgcccgggtcagtgaacaa acagctaggcaagtccctccttccccctgtggctgggttctaccggccaccatccctccccagc ctgacgtgttacaggctgtgcaaagcccccgaaagctgtcacgtggcaattgtgggtcccc cctttgtcaagacaccgagtcttctcccttaaggctagccccgggtcccacgaacgtggaactggc aactagtgggtgtcactacacgcctccgacctcggacgcggagtgtgttccccaaactgtaacc ctgaccaagactgtgtcctggcaagaccgtctgggaagatgtccgctgtggctgcaaaa cctggtaacagggtgccccagtgtgtgtagtcttctccagtctccgactggcagctctgtgtaaa gatgcagtgtgaagggtcaagtccaatccctggaaggagtacccttactgccttaggaatg ctgtgcaggtagccccaaactcgggtgggatctgagcacaggctaattgtctacgggtagttca ttcccatcctctctttttggcatc</p>
439	Свиной Kobuvirus К- 30	<p>ttgaaaaggggtgggggggctcggccccctaccctcttccgggtggccaccgcccgg gccaccgttactccactccactcctcgggactggtttggaggaacataacagggttccatcc ctgtttacccttactccactaccctcccccttgaccaacctatccacccccactgactgactcc ttggatcttgacctcggaatgcctacttgacctcccactgcctctccctttcggattgccggtgg tgcttgccggaaaaagcacaagtgtgtgttggtaccacaaactcctaccgacaaaagggtgcgtg</p>

		tccgcgtgctgagtaatgggataggagatgccataacaggctcgccatgagtagagcatgg actgcggtgcatgtgacttcggtcaccaggggcatagcattgctcacccctgaatcaagtcacg agatttctctgacctctgaagtgcactgtggttgcgtggctgggaatccacgcttgacctgact gcttgatagagtgcggctggccgactcatgggttaaagtcagttgacaagacac
440	Свиной Kobuvirus XX	ccaccgttacttactccactccctcgggactggfttgaggagcataacagggttcccatcct gttcacctcaataaccaccaccctttccctcaacctccctatccacccccactgactgattccc ttggatttgacctcagaacgcctacttgacctcccacttgctttcccttctcggattgccggtgt gcctggcgggaaaaagcacaagtgtgtgcaggctacaaactcctaccgacaagggtacgtg tccgcgtgctgagtaatgggataggagatgccataacaggctcgccatgagtagagcatgg actgcggtgcatgtgacttcggtcaccacgggcatagcattgctcacccgtgaatcaagtcattg agattcctctgacctctgaagtgcactgtggttgcgtggctgggaatccacgcttgacctgact gcttgatagagtgcggctggccgactcatgggttaaagtcagttgataagacac
441	Козий Kobuvirus 12Q108	gggggtggggggggcctcggcccccctaccctctttccgggtggccacgcccgggcccaccga tacttcccttactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggtcccctgtttccattcc ttccccctttcccaacccaaccgcccgtatctggtggcggcaagacacacgggtctttccctta aagcacaattgtgtgtgtgtcccaggctcctcctgcgtacgggtgcgggagtgtcccaccaactg ttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgacgtcgcatttccgctgcggatgcc gaccgggtaaccgggtccccagtgtgtgtagtgcgatcttccaggctcctcctggttggcgtgtcc agaaactgctcaggttaaggggtgtgcccaatccctacaaaggttgattctttcacacccttag gaatgctccggaggtaaccagcaacagctgggatctgaccggaggctaattgtctacgggtg gtgttctttttttttcacacaactctactgctgacaactcactgactatccactgctctctgtgcc tttctgctctggttcaagttccttgattgttttgactgcttttactgcttttcttcacaatccttgctca gttcaaagtc
442	Кроличий Kobuvirus	gggctataaatatgggcattcctcttcccccttccccctttgaagatgagtgcgcatattctgactc cgctggattggccgccaaggcgtgaacaagcagctaggccaccatgacactgcggtggtg tccgaacccgagggtgccttcacgggcacctgtggtatgtaggactcccaccgtggttctccctt tccccctcaatctttccccctgggtcgactaacgggaccagtgtggaacctgtccggtgaacgg tatagcaggccccccggcagaaacaccgggtgcttacccttaaggctagcccccttccatga atttgggtggggcaactagtgggtgtacagttggcgtgaacctccgggtctaggagtgtcttggc caatcctctgtgtgtgccttgagtagggactggcaatccttcgctaggtgatccgctgtgccat gccatcctggcgacaggaggcccagtgtgcgcaacctacgtcccccttgggtgctgcattgcatt acctttggagtaagcttgggtgtgccgaaccccagggtttacgtaccactcgtggtgtgaggaat gtgccgaggtacccatccttgaggtgggatctgagcggtagctaattgtctagcaccactttct tcctttttctttgctggtcacg
443	Aalivirus	ttgaaagggggtgctcagggtagctcctgagctcttccctccaccctcttcaacgtctggccca

		cgatacgggccaccttcaatcttaactaactatcccttaaatctatttggatttctggttagaataat ttggaacacataaattggattatcttttaggattgtggataggatttggcggatatacactcccttct gtgctaacacataattctaattccctctttgtctattatctcttggagggtggtgctgaaatattgcaag ccacttgagtgtatagatgaagtaggctcaagatgaatgttgtgtactcaaggcaagtgtagctat cactaagatattggtaacgtgaaacggattaccggtagtagcgtgatcttccgtcttagtgcctag tgactagaggacaacgacatggcatcacatatctaacctccagtttggcatccgggacagaa tgggctggatataccgcttcttctggggatgtgatgggtggtattgggtaaccaccttgacat gacgctcgataagagtgaccgctgatcattgaaacctctagtataaaattcaggctgaaatc
444	Grusopivirus A	tgcctgagtaggattgtgaatttaggtatgagagggttagccaaccattctgaaccataatagat acgtcaatctgaatccatctaaatctatctcttaggcagtggtgctgaaatattgcaagctactagg gatagacgtgatctgattcaagaacctatctaatgtggtgatgagaaggctaggtttatccatagta atccctgttctgaacaggcaatgcacatgctctagtaggatctcgggctctgcgattggctctaa accgaccaatccaggtagaggcactaagtgtaggacttgccaaatgtattacatgctggtaccg actcactagtctggaaactccactgaaagtgactggggggggcccatcacatttgtgctact gcttgatagagttgcggctggtcaactggattggtataaccagttgaa
445	Grusopivirus B	gccatccgtaggttctggaaggtccatcaactgttggggcgctagtgtctatgaccgcattcac ggacggatgatttatagtatcaccaatccgggcacaactctttagccacttctccactactaa gggctctctgccgagttcaacgtctagtccacgacacggaccttctacttttctatcttctat ctctactaaattggtatctggtactgaagatagcggattgtgattttgtgctgtctaaactaacct attctagggttaggtgggtaccatataactaatggtgaaacaggattaccatgtatccattagtccta tggatctggcgaccacaaactcatgttcatagagaggctaagctgagtgtcgcgcaataagc attgctcaggtgccgactattgtctggaaaccactcagtgatagctatagggggggggcccgta gcatctgccttactgcctgatagggtggcggctggtccatgaacatgcagtaaccagttgactg ac
446	Yancheng osbecks grenadier anchovy picornavirus	ccttagggtctggaatgcgtccttctgggcacttccacaatcctaaggtaatttcaacgccagcg atggagcgatatcaaagaacctttatgttttagttcgtcttctgtatgttataaaatataaaattgggat tagcaaccacaaaaacattttgttattctcaccacatgagagggtggttaaacctctcgtaacct atcttgcctgattggctacttgggctagatttaggacaacctcttagcaagcctaaattactcctcgt acttgcacctggtaacaggcgtacctggagggttacggtggcgtaacttggacttctcgtaattc gtgcaagttaaagatgcctatgttgaatacaagaaagtatgatagtaacttagggcgtgaagttc cgcttaacataaggcagataagtaactaagataagggtgaagacctacctaataactgttctttt ctcatggtcttccgtgggagcccttctaggggtaaagtaagtattctcaataattttcattcaa actcttctctctgtttt
447	Gallivirus M176 индек	ccactcgcacttctcgatagtgcgtagatagcccgacatatacgttccaggaccaagcccc ccttttcttctccaaccagcttccgactcaagctgtaattccatgtccggcttctccggccttagt

		<p>atcatggaaatgtggtcgtgctcaaatgaaattgagttgacattgatcaatgaaagttgactgaa ctttgctaaactggctagcgcacactggtgtgtgccgttggtctcctcatggtaacatgtgcca acgggcccgaaaggctagtgggcaattaccgctccaaggagggggtaccaccccgacctg aacagcggtaatgaagctcacctcccaggctctgaccccgagaagtttagttatttagtaggtga attagtagtctgtgattggtcaattgatagtagttgaaacggtatggatgaatgagtagaccctg aaggtacccattacatgggatctgatcaggccacattctgctgtctccccgactgtggta aaacatgaaagttcatcccaacaatctttcctctcttttcttttagtggtgacaacctactggat tgggtattaccaatctgactagtgtgtattaagactgtgtgtggagaaaatggactcttcaaga agattttg</p>
448	Falcovirus A1	<p>taaaaggggacgcggtgtggcagctttggctgtcatgccgtttctcttttaccceaaggactag ccttggggggtttccaaattccttccctgtaggctttacttctttatctatctttctgtaactaagttt gcctattctaaaaatatttgaatgtgtttggatgtaactaagttgtgcctgccctaaaaatatttta gggctgtttggataacctcgtccctgtgttcagtgccgcacaatttgctaggcactgtcactcc ttgtttgtccattatgtatgctaaggatgaattccatcatatgcttagcctctacatgcataatttatt ccctccctggtgcaaacactgcccccaacatagtgaatcttttaagcatattcctgacccccac atatatatgtgttctcgtgaattccccaccgtgaggtggcactggacgtggtgtgtgtcacaca gcataatatgatgcaggatgtgttttaagataagcatatgtccttagtctttgcatcatttctcc acacccgtgaatgaggtaattcctaaccctgttgggtccgtgggtaaccaaccattaaccac aggacggaaccgactactttcgggagtgtgtttcttttcttttcttttctt</p>
449	Tremovirus B	<p>ttcaaatggcccctgggttgatacccagtggtcatttggacactttggaaggaggtgaattatcc ttccatgtggaacctagtgttaggttactttatgttctttgttgcctttgtactttctatcgggc aatctgtgttcaatacaatatgtattgaactgcctaagataaattcagtttcaaccaacctctc ttggggtgtgtctttctttctttatctcttaagctgacttactgtcaatccgactcctcgtcaa cgggagggtaaagcagtatcactagggtattgtgatgtaggagaaaaagtaagtagagatagtg catgtaacgaaagtgacttggactttaaactctttaaaccctgaaggtgtgattggatgttggga gtaggctacgggtgaaactcctcacatttagtaatgtttcacacgtaacgctacggtagatga cagactaggcttattctcaacgtagggggacgggtgtatgttcatgattagccacatattaaggtt ttgaggggctgagcatataagatgtgcattaatttctggfactgtccctggggactggccctttt ctaggttgatttttagttcccaatttttaaaaactaatgagatttacgac</p>
450	Didelphis aurita HAV	<p>tcttggctgtggggaactaaataccagaccgcgtttgcttagc gatataggctttaaattgtgttt gtcattgtgcgtttgatatgtgttttaatgtaataataattctagcagggtctagtcttgatcatgtcct cttaaggcactcattcaactgtctatctttctttcttctgttctcctacaccaatgcactggc cgctgcgcccggcgggtcaaccacatgattagcatgtggctgtaggtgtgaaggtgggac atgaacatcaatggaatagtgcgcatgcttactgggtccattgaagtagtgggatctttctattgg gtaggctacgggtgaaacccttaggttaatactcatattgagagataccttgataggttaact</p>

		<p>gtgctggatatggttgagtttaacgacaaaaagccatcaacagctgtggacagaacctcatcctt agattgctcactatggatatgtgctctgggcgtggttcttgcgatgatggccattggtcaattcatgcc tggccaatgtaggattagccttaaactttttaaagtagcctcatttagctggactaatggtgg ggcgtatgatcctgcatttggcctctggggaatcaggggcatttaggttccacataatagcaaat</p>
451	Hepatitis G1	<p>gcaaggggtggttfaaccttgcacgcgttaccgtgcgtaaacggtttccatggttgcattgcttgt ttgtattatggtttgtaaatattaattcctgcagggtcagggttcttaactcatgttgggctgtacca cactcaactttggccataagtgcgttcttaacgaacctttaaacacaggatgttattagggccaa tatttccctgaggccttcttggcctctattttccctttctatctccttgcattccgggctcacgtg atgccaatggactgacctatgcgcccgtgggggtaactactggagtagccagtagctgtaggt gctaaaagtcacgtacgtgaagactggacgagacctctcagctataactgaaagtagtaagat gtctgaacttctgaagggtaggctacgggtgaaacccttaggttaatactcatattgagagat acctctgataggtgaaggttccggtagaggtgagtttaacgacaaagcctctcaacggatgtgg gccacctcatcagcaagatgcttccataccaataaccgtaggggctgggttgtgagttcagtc caagcgtccctcccgaaggtgtaggggtactcaggggcatttaggttccacaattaacaaa taca</p>
452	Hepatitis D	<p>cttggatgccatagtgccggggataataaccgactcccttagctgtccgagggtatcgg acctatatgtttgttctgtctgtcagctttatgtgtctcgtcccttagggcactcattcag cttgccttcttcttcttcccggttctcacctaccggaggcactggccgttgcgcccggcggg gtcaaccttagtgattagcactaggctgtagggtctaaagtggtagcattaagacttggtaactgat ttcagcactgttaactgatgttgggatgacttgattgatcttctggaagggtaggctacgggtg aaacccttatcttaataccactatgtagagatagattcagtaggttaagggcagtgataaggtt gagttcatttggacaataaaccttcaacactgggtggaccaatctcactgaccagatgcttcttg actgatcctcagaggggtgattctctgaataggttgccttgacactgatgcctgagaccattgg gtcgggccttaaatcatggaactccactggacttcatggcctagcttctgccttagacagactctg gggccccacgacctctgggcccctcgggggtactcaggggcatttaggtttccacaatta gagtta</p>
453	Hepatitis H2	<p>gtcatgttctcttaagaactcaatttggccataagtgcagactcttgcgaaccttcatgtag gacctgtagggcattatcctttccctggggcattcttctgcccctgttcatcttctatcatctt ctccgggctctcaaatgccaatggagcgaccgatgcgcacgtcgggggtaacctatggatta gcatgggctgtagctgctaaaagttgtgactcctgaagcactatcaatggtagtagatgtaac tgaaactgaagcttctctgatcttgaagaaggtaggctacgggtgaaacctcaggttaat actcatattgagagataccttggtaggttaacgttggcggataatgtgagttaacgacaataaa cattcaacgcctgtggcgaacctcacaatttcatgcttgaagtgaatgtgcgtagggctctat cggagatgctatgtgatgggtccctccctggaacaggtttaggggtactcaggtgcactta ggttccacattttaaagattttc</p>

454	Hepatitis virus I	<p>ggctgcctgtgtctcaggggtaagactggggccgcgttgaccgtgcggtagcggttatgcttta gattaggatgtccgtctgtccggcactctcttttgcttaaaatggccttaaatccatgggagggcga acatgggccctttgttacctagacatgattgcattggggggcgccttggggcttagccccag ccatttctcttgactgtctaagagtttacttcatccttttcttactttttccaggctctcagcatgc cgacggctctgaccactgcgcccgggggtaactgcatgattagcatgcagctgtaggagtt aaaagtgtgacaggccaattctgacgtaagtccactctatattaactgatcaagtaagggtgatt gatctttgtgagagggttaggctacgggtgaaacctctagggttaactcatattgagagatacct ccagaagggtgaagggtggcggatattggtgagttcttttaggacaaaaaccttcaacgcctgtgg gccacctcactggcacaatgctttcatcccaattgtgatgggtagttggactgaaatcaggag taacctgccctacgagtttagggtagttcaggggtattaggctccacattgatagagttatga gagtgagcc</p>
455	Hepatitis virus C	<p>ttcaaaagccccagcggggttcattacccgctgtggctttggactccctaggatggggaagt aaattaccatcctcgcgtttgccgtgcgttaacggctacttttcttagctgtagaagtaaaattca gcatgtttatgtttgtctgtttgttatatacattttacactcctacaaatgcacatgaagaacag ttgtagagattaacaaacgcttagctgaacctagggtggtgaatctagtagtaagataagtagagg aagctataccttaagttggtggccctcgtgtttgctctataaacaacaaagtgagtagagtg gatgaacagfactaaatccctgagtacagggaaacctcacagggtgatacacttatgtctatgtga cctggtggaggtgggcgtgccctatgatactggagtgaggagatctttggggaaccacgcttt cacactgcctgatagggtcttggcagagactcactgtttcggctgtacttgaac</p>
456	Fipivirus A	<p>tgcgggtaaacctcccgcagtgtgtgaatgaggcgatgtcccaggaaactgcccgatcctggtt taactacgatccgtattgttactaatgcgatatccccattgttgcctccatgttttcaacgctt ttggccttgagtggtatcaagtgttttagcgacatagtggaagctacggctgcgtccccattttga gtggcgaccagtttagtgccactctgtccctgaactgcgctataatgtgaattatgttcaaa aaacggactgatgtaactgtaataactaaggaatagctcactgaagatcaagaccccgctc gagcgggtgacatatatggatggaaacctgtctgagtcactcgaataactaatcaatgagggatg tcgagtaagcatatcatgaaccatagaatagtggggtttcggggtagaggctctctgcagca atgtatcttaacacccatggccgaaatgagagatagagaccgatgtttgtgtgaagtaatgat gtgtggaaagaaaattctgaatgttggtatgatcagtctaaggggagtggtcacctaagagct accaaacattcacagcagacaacataacgtactgagagtagttggaagggttcagaaatcagt</p>
457	Fipivirus C	<p>cgcggttaaacccgcgaaccttcttcagccgcgtctgagtagcgcggtagtctgatacaca gtttcctgttgggtactgtgtctcgggtgaatgctcttgtgtgaatgttttaggctgttaagggaag cgttccccgtgcgctgtgagggttctcacgctcttcgggggtgcagtctcttctgttgcattaag atgtatggatgcactgttgaaggatttgaactggggatgcacccccgtgaggggtgcc cagtgccataggagtttctggagaggtgtgttctgtagtactatccgtgacctggcattctaa gggttgaccccaacctgtgagggtctggatcgaggtgtgaagtgtttggagggttcaatggg</p>

		gtttctgtagtggatattatgtgcttgacgactactggtagcagtgattgggggtctacatgtgtga
458	Fipivirus E	ctcttccgatcttgggggttcgccccatgtctcatttcaactagccgtgtgtctagttaacgcacc gcctcaccttggtcggtatcgggtcgggtcttgcgaccgtagatcgtgagcgttctgaggatca gttcgtataagttctccggtgtggcgaccgtaaaatcgtaacgtccatgcaatagatgacgttaa actcgtttgccagttacataaaggaatgttgttacttttaattgtctgttacatatacatcttgccagt atgatgctactgtacactacgggtgtaggaacctgtagtgtagcgtatcactcatatgtggatgg gtgctccagacctttatggaagctctcagttagtagtgatccttgacttcattgagccctggtaaca gtggaagtcaagatgtatatgttgctcaacacacttcgggtgctacgaagctgtttgtggaagtact ggcgagggtcattctgaatcatatgtttgtcacatagtcaggagtgccgtcgcttacgacggacc cttttctttataattacaaatctgtgtctcaagtgttggctgggtttcttctctgtttcattgtcata tatatacgtcagagtgaagactcgggtatatacaaaaactgatccaga
459	Aquamavirus	ttcaaaggtggcgggagagttggcctcacgctgttagcgtgagagctggctctcctgcccttc ccctgagccggggatcttggctcattccccctttttctatcctccctcattggactttacggatgacc cggcataaacttgacaaccgatgttggattcccttgggtgtgatggaggacataccctcgggt gtagttgtgtcgtgtcgtctgcgactcgagcttcaaagtgggtgctgaaatattgcaagcgtcgtt gctcgattaacggagtggtacaatcctatgaacccaagtgcattcatcgcaaagccccggaggg gtgagtagcatggactcgaatcagaagagctggagctcgttggtagcggcacgtagcattgcttt gcctaaagaccaaggggggtatggctataggtgggggctatagcttgtccagtgtggtgaca gactcgtgctacgcgtctggttcgagtataagtagctgcaactcact
460	Avisivirus A	ttcactcgtttccccctctctatagggcggtcttttaattcttattaatttctactttactatcaaa tttcttctaagtagggactgaggtcacttagccctccctctcctgggctttccagggtatagaggtt ctaaagctaagccatgtgtcttgagctacacttagtacaaggtttagtaatgattgtacatgccag taaccttctagtgccatggattaagagtggtaacactctccatggggcccgaaggctagtgg gcatagttggcatcaaggaaggggtccccccccaaacctgaattgctggctagaagctcacctt agaagaagtgtgggtgacaacgtgtccaatcgtgaacgactgatggaacgtgtggagatgg atatgtgggggttactgagtagatgccctgaaggagaaatctgatcaggggcccgtgactata cgctaggtaaaccgggtataaaaacctgaaaggtggcccaaaatcttctcttttattttattctat gttgggtgacagtcaag
461	Avisivirus B	cacccctactgcctaacccecaagttagtatagggtggctcctaccctactccacgggg taagccctaaccgggtgaatctcaagatcagccttagcaggactattagtagcctcaaaccc ttgcctgtagtggcagggtcacagaggggtgacctctccctggggcccaaaaggctagg tggcaagacagggtccaagtgaggggctacttaagtagcccaagctgaacatcctgtctgaa gccaccttgcagggccagggttattggggaaactagacaccagctttgtcctgggattgggg ggatatcgagttagtccaggaggtgcgagtagatccccgaaggtacccaggcacatctgg gatctgatcggggcccgtgactatacaataggtaaaccgggttaaaaacatgaaagcgcctc

		tctcttcctacttcttttattgactggtgacaaaaatagcagt
462	Crohivirus A	gttgaagtcatttcttgcttgcctcccgatgaatcctgtaaggcctcacggcctaagggtgaaa ctcgggtatcccctcctgtacttcgagaagattagtacaacactatgaaatctacatcttgatccg ggataacccaatcccagaaacctgtgatggcgctcaccacccctcttatggtaacataagggt gtcggcgcgttggcacaggacccttgggctggatgttttagtaatgggtgcgaaggctctattg agctacaggagtttctccgccctggatgcggctaactctatccctgagcctaagggtgcgat ccagcaacttgatggctgtaatgcgtaagtggggcggaaccgactacttccagaaggcgtg tttcttgtttgtctgtactatgggtcatgatatagatattgaatattgatcttttgagctgtttctac ttattgctacatccttcagggtgttgatttacattttggtaataag
463	Kunsagivirus B	gattttctgggtatccctttggacttggtagggggccacgtgccaccacctctgtgtgttggat ttctaactgatgcctggcagtgggcgccacctctcttactggtaaacctccgggtgagtgaagttg tcaagctacaggtagcgtgcaggatgaaatgcgcacatgtgaacaaactaggagtcatacacc gggtcaaacctctgaaacggagtcgggactctgaccttgggtgggtgagctcgaggcatcac attgatggacgcgattcgtatcctccctagtaggaccttgggtgacccctggttgggaatcca gggctggcgggtgcagggtgacagcctgttctccacctcaaccattgtaggagaaatcaacc ct
464	Limnipivirus A	ttcttggatattcattaacgtgtaccctatacgataattgggggtgattctggatgcctagtccag tgattggtaagaactcgttactacgtatagtagtagcaaaagtctcgattgatcacgtaatga tctatgtggtaaaaaccagtagtatggtatatactcagtagtgacactgtgagtaaaccttgg cgtagagagaacaattcaccgaatccgtggcgatccatggaaataagttacctaattgtatgtt acaaggcatatgagacattatgagataggtttatttggactaaacgagttagaggtgggtggagt ctatccaactcaagccatgcaattgtgtgtgattgatcattgaccatttttgggattgtgtaca catacaattgaaaattaacccctcaagaataagacatgggaccattcgtggtagataccgtgct cggatgcttgagattagatgggttagactagtttggaaatgagattgccgagaaagtcccgtag acatgtttacaagtcgtggtattccgctagacttttgcagacacatggaagggtccatgtgtgt gcaattgcagggtgacagcccaactgcagagtttcttactagaataaaaatctgtgtcaatttt
465	Limnipivirus C	gtttctgagcactggaagagcttagacaaacgttttaaaatttatttctctgcaactttgtttgtgtt tattttatttggtaattttgcgcctaagcatttgtgcgaagtatttgattcattagtaataacttattgtt tatttagatggattcaaaagtgggtgggagatcgaacccaagcgtcgtatgctatctccttgaacaa ttttaatcattgcaagtgatcattgaaaaggataggtgttaagaactcaagagtgtaataatg ttgggtgacagggtgccccatagaatttattaacatgattggactgggtatctagtaagaagaacc atcgaacgcacgagcagcattgcttgcggggcagttaccctgcgtcgtatgtaagtgtgtaccg gggggtgcacatgttgattctttatggcctgatagggtgcgtcattcgcgcctagataaattagata atcgcaatggaataaattac
466	Orivirus	gggccagcccaatattctcgttaaggcttgggtccaattttccaccactcgtgtttgggttctggcc

		<p>tatggtaccagagggcggtttgggggaattaactccccctcccctgtggtcctataaccacccc acacctctgtgggctttcttactatcttctgttttccgacttttaaacactaggcagggcgccctag tcatacaccgcccggctggtctttccagctcttgtgggcggtgcgcgctggtccatcgtgccag cgacatagcaccttgtggacacctccgaacgccctcccctgtatggggtggtgccaggggtt cagtggtgacacactccctggggcccgaaggctagtgtgcaacaggtgaggtacagcca gctgccccgtggctggaggaccagcttgaagcacacctcaccttctgggggtgggct agtaagtggtgaaagcataggtcctgtcgtggccaacacttgggtcaagtccagccactca gtgagtagatgccaggaggtaccctagtggatctgacttggggcctgttactaatgcaggtt aaaaactatgaaagctgagtagtgagccggctggtggcttcttcttattcattctattttatgg tgacaaacgcaactgaagcc</p>
467	HAV FH1	<p>ctgatacctcaccgccgtttgcctaggtataggctaaatttccccttcctcttccctatttcc ttttgtttgttataatattaattcctgcaggttcaggggttcttaactgttttctataagaactca atttcacgcttctgtctccttctccagggtctcccctgccctaggctctggccgttgcgccc gcgggtcaactccatgattagcatggagctgtaggagtctaaattggggacgcagatgttgg gacgtcgccttgcagtgtaacttggcttcatgaaccttctgatctccacaaggggtaggctac gggtgaaacctcttaggctaatactctatgaagagatgccttggatagggtaacagcggcggat attggtgagttgtaagacaaaaccattcaacgccgaaggactggctctcatccagtggatgca ttgaggaattgattgtcagggtgtctctaggttaattctcagacctctctgtcttagggcaaac actatttggccttaaatgggatcctgtgagaggggtcccctccattgacagctggactgttcttgg ggccttattggtggttgcctctgaggtaactcaggggcatttaggttttctcattcttaacaata</p>
468	HAV HM175	<p>cgccgtttgcctaggtataggctaaatttccccttccccttcccttctattccccttgtttgcttgt aaatattgattgtaaatattgattcctgcaggttcaggggttcttaactgttttctataagaact catttcacgcttctgtcttcttctccagggtctcccctgccctaggctctggccgttgcgccc gcgggtcaactccatgattagcatggagctgtaggagtctaaattggggacacagatgttgg acgtcaccttgcagtgtaacttggcttcatgaatctcttctcacaaggggtaggctacgg gtgaaacctcttaggctaatactctatgaagagatgccttggatagggtaacagcggcggatatt ggtgagttgtaagacaaaaccattcaacgccgaggactgactctcatccagtggatgcattg agtggattgactgtcggggctgtctttaggcttaattccagacctctctgtcttggggcaaacatc atttggccttaaatgggattctgtgagaggggatcccctccattgccagctggactgttcttggggc cttatgtggtgtttccgctgaggtaactcaggggcatttaggttttctcattcttaataata</p>
469	Parechovirus F	<p>ggtcggggagatgtgtcatgatcggtaacacccatcatggatcatctctccccgaccttttga cccagctatgggttaaagtacttttcttcttttgccttcttctgtgtttgttttgaacata acaagcattttatcagattagtgtcgaactgtataacaagcaaggtggagcaatcatcgaggt atatctcaattgaattgtgacacacaagtggtgactatgtggaataatgccatttggcacaact ggtagccagaccagtagtaggacaatttggcacccttagtggggcgcgacctagatgctagggga</p>

		<p>tgagcaaacctatttccctgagtacagggctctcctcacctctacatttggacctcttttgagt atcctcgatagaaggtgaagtgacgggtaccggatggtaattgatctcattgctgggtgacag cccgctaggaccaggcagcatctttgtatggacctgtacatgtaac</p>
470	Parechovirus D	<p>acatggggcaggtgtgctgtgccaagagcaacactacggtgccgagccgatggftcgtcacc acgtagtaggactccgtagtgcttggttacggcggacgtaagtcagttgatgtctaaagtg caaacctgagtacatggtaacctgtgtggactcgcgggacggaattcctatcccattgactcc ttgtagcaaggtgggtataccaaccacaatggcagcacctgggtgggaaccagggggct ggattagatccagtcacacagcctgatagggtggcggctcagccactgaccagcgtctctaaa taattgtgagctgttcacgacc</p>
471	Parechovirus C	<p>cggatcccccttccccacagccgggtgtgggttctaatacggctcctactaaacacctaagcacc actgcgctctatctctctatccacaggtctaagacgcttgaataagacatgtgggtgcaatag gaagattagctagtccaatctctcctccagctacgcttctccttcgatgagcgtagggggggcc cccacctccctcatctctggatagggtcttctacggggcttcccgtctggaccagcaggccc actgggtgcgctccattcaagttagtgctcattactgtctgaatattgctttagtagtctagtgt agcgacctgcatttgccagcggactccccacatggtaacatgtgcctctgggcccacaaaggc atgtcttgaccgatgagcagtaacccccagtataggctcttctatggcagatggatctcagtgat gagtcatacagaatatggaagtgggtcggatgtcagcccgaaggatgccagaaggtacc gcagataaccttaagagactgtggatctgatctggggcccaccacctcgggtgggtagaagct aacatgccttgggttaaaaaacgtcaagggtgaccagaccgggggatccgggtttccct atctgacctactctaate</p>
472	Вирус Люнгана 87- 012	<p>ctcattgcccacacctgggtggtccagggtcacaataaccatcaataaactttaacatctaag atagtattatcccatactagactggacgaagccgcttgaataagtctagtcttatctgtatgtgc ctgactgaactgtttctgtctctggagtgtctacacttcagtaggggctgtaccggggcggtc ccactctcacaggaatctgcacaggtggctttcacctctggacagtgcattccacaccgctcc acggtagaagatgatgtgtctttgcttgtgaaaagcttgtgaaaatcgtgtgtaggcgtagcgg ctacttgagtccagcggattaccctagtggtaacactagcctctgggcccacaaaggcatgtca tttgaccactcaggtacacaacccagtgatgcacacgcttagtaatggcttagtaacaacattg attgatcattgaaagctgttaggaggttaggtatgacgggctgaaggatgccctgaaggtacc cataggtaaccttaagcactatggatctgatcagggggccaccatgtaacacatgggtagaag tcttcggaccttgggttaaaaaacgtctaggccccccccacagggatgtgggggttccctata acccaatattgtata</p>
473	Parechovirus A2	<p>gccgtcgggccttacccccgacttctgagtttcttaggagagtcccttcccagccagaggt ggctggcacaataacaaacgtaactaaacatctaagataacatagccctatgcctggctcc accagttgaaggcatcttgcataaaaatgggtggattaagacgcttaagcatggagtcattatc tttctaactagtgatcttactgggtggcagatggcgtgccataactctattagggataaccacg</p>

		ctcgtggatcttatgccacacagccatcctctagtaagttgcaaggtgtctgatgaggcgtggg aacttattggaataaataacttctgctgcaagcatcctactgccagcggatcaacacctggtaacag gtgccctggggccaaaagccacggtttaacagaccctttaggattggttaaaacctgagtaatt atggaagatacttagtacctaccaacttgtaacagtgcaaacactagttgtaaggcccacgaag gatgccagaaggtaccgcaggtacaagagacactgtggatctgatctggggccacctacc tctatcctggtgaggtggttaaaaaacgtctagtgggccaaaccaggggggatccctggttcc ttatttagtataatgtcatt
474	Parechovirus A3	agagtcctttccagccagaggtggctggttaaataatacctactgtaacaaaacatctaagatg taacaaccacacacctggtctccactggccgaaggcaactagcaataaggcaggtgggttcag acgcttaaagtgtgtgtacataattcttttaacctgtgtttacacaggggtggcagatggcgtgcc ataacttaacagtgagataaccacgcttggacattatgctcacagccatcctctagtaagttt gtaagatgtctgatgacgtgtgggaacctgtggagataacagtttctgcaaacatcccactg ccagcggatctacatctgtaacagatgcctctggggccaaaagccaaggttaacagaccctt gggattggtcaaacctgaactgtatggaagacatttagtacctgctgatttggtagtaatgcaa cactagttgtaaggccacgaaggatgccagaaggtaccgtaggtaacaagtggcactatg gatctgatctggggccagctacctatcttggtagtggttaaaaaacgtctagtgggccaaac ccaggggggatcctggttcttttaatttaagtaact
475	Parechovirus A8	gggccttataccccgacttctgagtttcttaggagagtcctttccagccctgaggcggctg gataataaaggcctcacatgtaacaaacatctaagacaaaataattgcttgcacctggtccca ctagttgaaggcatctagcaataagatgagtggaacaaggacgcttaaagtgcaatgatagttat ctttctaaccactatttatagtgggggtggatggcgaccataattctaagttagatacca cgcttggaccttatgctcacacagccatcctctagtaagtttggagacgtctggtgacgtgtg ggaacttactggaacaatgcttggcgttaaggcttcattagccagcggaccaccctggtaa caggtgcctctggggccaaaagccaaggttaatagaccctaatggaatggttcaaacctggag cattgtgaaagtacttagtacctgctgatctggtagtaatgcaaacactagttgtacggccacg aaggatgccagaaggtaccgtaggtaacaagtacactatggatctgatctggggccaacta cctctatcttggtagtggttaaaaaacgtctagtgggccaaaccaggggggatccctggttcc ctttatttactttgtcaat
476	Parechovirus A17	ctctattagtgagataaccacgcttggacattatgctcacacagccatcctctagtaagttgtaag acgtctggtgacgtgtgggaacttgggaatcaatatttctttaaagcatccattagccagcg gataaacacctggtaacaggtgcctctggggccaaaagccaaggttaacagaccctagtg attggttcaaacctgaaatattgtggaacacactcagtagctactgatctggtagtaatgcaagc actagttgtaaggcccacgaaggatgccagaaggtacctgtagggaacaagagacactatag atctgatctggggctggctacctatcttggtagtcagttaaaaaacgtctagtgggccaaacc caggggggaccctggttccatttttacaaggcact

477	Potamipivirus A	cacatggaaagcctttcgtccatgtttacgcacacactctcttgacaccctgtgtatgggttaa actacaacatttgctgtctataatcgttatftttgtttaccctatatgtaccaagatttgattgcttga ctcacataagcatcggtaaccatactgtttatgagctactacctctgctgtctacatacattttatat gaatggttgagctctgcctcaggatcaaacatggtaacatgttctttggcagtagaatcttatt gtataatctaagggtctattagctagtagaaagtgtaacacatatggggcctgatagccgctatc tctgatggatgtaaggtaaccttcttaggtctgatacattctgcacaggatccaatfttcgggtccc tgtacgagtgcactcttatgcacgaggacgagatatgctacaaccactgcaaatttaacccaa actttaaca
478	Potamipivirus B	ttcaacgctcgtggctgacgttaaaaagccacaattccacttacctttaccctttatgtttaatgtttgt tagttttgtgatcttaacaaatagatctaaataattgttggaaccaatctcggatgttcggctgca ttgtagtttattttcattttagttgtaggtggccactacgtcctggaatcatacatggtaacatgta cctcggcggttatccactattacgctaataagaatatttaaatgaaaatgtaagtgttacggctga ctttgggcctgatagttaaatgctcgcactgacagatagaccctccttaggatcgattctgttaca tgggatccattttggtgccccactgattcaacctctttgtgaaaagagtagcactacaaatftt ccaacaaaaacccttttaataactacaacttatgattttatgaatttactgctcttgaaaagatat ttgacattgatcgtgtactgtttcagacattcattgcatccattttgttggtactcctcacaactc aaaactfttcacacgagaaacctgtttattgaattttgcctttatattttggaactgtttgttgattta ttgtttgcttaattattgacctcacacctgttttaaacactacaat
479	Beihai Conger Picornavirus	gggacaacccacagctggtacaaccattgtgggttggtctccaccttttcaaccgtggcaac ttcggftaaagttgcaaatccccctctccctattccacctcccttactttcactccccatatatggtc ccagattttattctaccttttatattttatttagtacagtgggtggaactactcccagcataaactttg ctggatcagtggtcatcaagcataactaataactaatgtactgagctatactattatctggcatctacc tggataaccggtgtgaccatatttctaggtgcctccctatgtatttttagcacctgtgcatctgc acgttggggcgacaaattgtaggttctctggcacgggtaagaattgtggaaagctagtagtgcagt taatgcaagggcgcgttttcgctaccccgacactgctaaagttttgggaggggtcccttaaca tttctagattgagttagctttgcccaggtcaccacaaccttactataaataaacctgttgaatc tcac
480	Свиной Sapelovirus JD2011	tacgcatgtattccacactcatttccccctccaccttaaggtgggtgtatccccataccttacct ccctccacaatggacggacaatggatttgacctcacggcaaacacatatggtatgatttcggat acaccttaacggcagtagcgtggcgagctatggaaaaatcgcaattgtcgatagccatgttagtg acgcgcttcggcgtgctcctttgggtattcggcgactggttacaggagtaggcagtgagctat gggcaaacctctacagtattacttagagggaatgtgcaattgagacttgacgagcgtctcctcgg agatgtggcgcagctcttggcattaccatagtgagcttccaggttgggaaacctggactggggc tatactacctgatagggtcgcggctggccgctgtaactagtagtgcagttgaaaccccccc
481	Свиной	ttgaaatgggtgtggggtacatgcgtattacggtacgcataattccacactcatttccccctcc

	Sapelovirus A2	acccttaaggtggttgcataccccataccttacctcccttctaaaacagatggacaaatggattgga acttatggcaagtgaatatggatgactttggatacactttaacggcagtagcgtggcgagctatg gaaaaatcgcaattgctgatagccatgtagtgacgcgcttcggcgtgctcctttggtgattcggc gactggttacaggagagtaggcagtgagctatgggcaaacctctacagtattacttagaggga tgtcaattgagacttgacgagcgtctcttagagatgtggcgcagctcttggcattaccatagtg agcttccaggttgggaaacctggactgggcctatactacctgatagggtcgcggctggccgcct gtaactagtatagtcagttgaaaccccc
482	Обезьяний Sapelovirus 1	ccaaggatcgttgcataaggcgttgcataccccctaaccttttaccctacccatccaataggactgga tttcggtttgattgagtaatggatactgattctatacctgttaccattcaggggaaaaatggagttt ctttcatggatctgacttgatagaccaagagtcaaacctttgcgtgttggccgctatggaatgcttta aggtttattctttgattatgacttcagggttggccgccaggataaaaaggcaattgtgtaagtga tgtagtcattgggtggtgaaacctgcctaagacgtcctaggtctacgctgtgcgggccaagtaa gcttaggaataacagggagtagccattttctgctttaccaacacgaccgtacacgaaagagc tagaggcactttggggcaagggaagcctttgcttagcccgaatgttcatttgatccttgacga atgcgtcccgtctgtcccagcgtgagggcgtatggcgcagctcatggcattaccaatgggtga tctgtgagggggggctcctcacacttagtctagtctacctgacagggccgcggtggtcgttt gtgtatggataaccagtagtaatccccatggattgctttaactccccctcctccttaccagaca ttctctaag
483	Обезьяний Sapelovirus 2	ttttaactggtatgacattcaaggaaaaatgtcttttcttattgggactgacctgttatgaacatg agcagcggcactgctccacgggctatccgtgtaagaaatattgattattcttatggatcatgatttc agggttggccgccagctctaaaaggcaattgtgtaagctatgtaagtagttggctgttgaagg agccaagtacatcctaggctacgctgtgcgggccaagtaagacttgaacaactctgagtag gcagttttctcttagcccaacacgaccgatactgaagagctagaggcactttggggcaagg taaaagcattgcttagaccgaatgtcaatgagacctgacgagtgctgtcacagtgcccctgat ggcagtagggcgcagctcttggcattaccatagtgatctatagggggggggcccctatact tagtctagtctacctgacagggccgcggtggtcgtcgggtgtgtggtataaccagtagtaatcc cccatggattgctttaactccccctcctcctcaacaaaactttctctaag
484	Rabovirus C	ccgggtataaccggagtttggggcaggtccaagccccacataggaacatacagatccacgga tcgtgttctttatgcttttaaccttacccttgaaccattacgctttacgccgcatggtgtttggc ggccatgacgtggacaagaggttacgcattacgatatgtacctccccctttggggagaga ccgaccaattatggtacagatccaactgtattgtggtcaagtaactctgtttccccggatgacgg gataggctgtaccacggccaaaacctgctgatccgttaccgactcacatctacgaggaggct agtaaaaggcatgaagttcaagatgatccaaccagatccccactggtaactagtatgag ggtccccgttccgaacatggcaacatgtgggtccctgcgttggcactaggccccctccgaggg gtgctctgaagatggattgtgatgaagaccaatgtgcatgtgttatcctccggcctctga

485	Rabovirus A NYC-B10	<p>ccgaccccactggtcgaaggccactggcaataagactggtggaacaaggctgcctgtagttg attggaaccttcttctaatgacttatgtcagcgggtgctactcacaccgtaactctcctaccctatcc ccacgcttggtggaactaggaggggatgagtattcaagtaagtactgtcagaatggtgaaaata atctgattctgaaacgctatggatccatcgaagatggggctacacgcctgcggaacaacacat ggtaacatgtgccccaggggcccgaagccacgggtgataggatcaccctgtagttgagatcat atcaatgttcatagtctagtaagatgattgaaatctaactggctgtatggctaactgctgtcttattg cggcctaaggatgtcctgcaggtacctttagagaaccttaagagactattgatctgagcaggagc caaggtggtctttccagccttggttaaaaagcgtctaagccgcggcagggggcgaggggccc ccttcctcccaactataatatagattgt</p>
486	Parabovirus C	<p>gatgatccccatccccagtgtgatgccatactgcatagctgcctatgccctatggattcacia cccttcatataacctccctaccaaccccgaaccacatgctttactccgcttggggttttgcggc cccatggttgacgaaatggctacgcaatcaatgcccgaatggggcctgccgcttttaagtggc cccagttagaagttatgcacaccgcccattaggaggccaccagccaggtggtcagagggca agcacttctgttccccgggtgaagttgataagctgtgccacggctgaagcagacagatccgta cccgctcactactacgagacggctagtagtgtgtaatatccgaatttcattgatccgggtgtccc cccaccagaaacgtgtgatgaggagcggcaccctcctatggcaacataggcctctcctgc gctggcacacgggctctatgagcatgaaatcaggagaaagtcacacgaagacctattgtgcta gtgttgattcctccgccccctgaatgcccgaatcccaactccggagcggcctggcaaac cgccagaagagcgtcgaatgctgaagctggagcgggaaccgactactttgggtgtggcgtgtt tctttatttctttgtattgtat</p>
487	Parabovirus B	<p>aaccataatccattgtccatcaatgtttatgggggggaccctttctcccctcccctccaatac ctttaccctctgtaaccaagagtgtgcaaaatctatttactagcccagaattgcccgttctgggg aggttattcctcatgctaacaagatgttacgcaaacctccgggtacggccttgggctttgccct aaagattagaagttactatcgtccaacaggaggacaacaaccagttgttctaaggacaag cacttctgttccccgggtgagactggatagactgtaccacgggtgaaactggtgatccgttacc cgactcactactcagaagattagtaggaaactgtgaaactgattcattgatccggatacttcc ccgtatccagaaactactgatgagggtgacttcccgactacggcgacgtagtgcacccctgcg ctggcagtaggcctcttgaggatggaagatgtggatcggtaacgaaggtcctattgagctagt gtttatacctccggcctcctgaatgcccgaatcccaaccatgatctagtgtcacaaccagtg agtagctagtgcgaacgcgtaagctggtggcggaaccgactactttggagtgaccgtgttccctat ttacttttgtttg</p>
488	Parabovirus A3	<p>accgttacgcaccactcagttggtgtttggtggcaccatgatggaacaaaaggctacaccactt gggctacggcccgcgccacctgtggcgcaaagacattagaagaatagcataccgccactag ggcctgcagccagcagggtaacgggcaagcacttctgtctccccggtagaacgggtataggct gtaccacggccgaaaactgaactatcgttaccgactccgtacttcgaaaagcttagtaggaaa</p>

		<p>ctggaaagttcagttattgacccggagtgtccccactccagaaacgcgtgatgagggtgc caccgccacatggcgacatggtggcatccctgcgctggcacgcggcctctaagaggataa ctcgtcctactggtaacgaagagccccgtgagctacggttattcctccgcctcctgaatgc ggctaactcaaccatgagcagttgccatagatccataggtggactgtcgtaacgcgtaagtg tggcggaaccgactacttgggatggcgtgttcttgttttctccattgtgtgtatggtgacaa gttatagatctcgatctatagcgttcttgagagattccaacattattcaagtcgtacaattctgt gttaagcagtagtgaagg</p>
489	Felipivirus 127F	<p>gatgtcggatgacggctggccaccgggaaaaacggcaaatgtcaccacctctgcaacca cgccgaccacgttaaccatggcgtagtaggagtgaccactgcagtgggctctggtgtgca cagtcagtggtagtagacagtcctgactgggcaatgggaccgcgttgcgtatccctaggtg catcgagattcctctgctaccaccagcgtggactcctatggggggggcccataggctaggtc tatactgcctgatagggtcgcggctggtcgaccactgactgtataaccagttgtaactcact</p>
490	Boosepivirus A	<p>ttgaaagacctcggcatatatacgtgtcacaacggatatatgctgagatctttctccccaccctcc aattccctttccccctctgcaacttagaagttgtacacacagggaataggatacgtgatccag ccaggacacgtgagctcaagcacttctgttccccgccccctcacgtactacgggaatgtagta atgtgtgcactttagtaaggtgatccgggattaaccccaatccagaaactggtgatgagcg ttaccacccccggggcgaccggaaggttcgctgcgtggcaccagggttcggcaccaga aaaaggtaaagcaaatgaaggcgtactgtgctacgagaagttcctccaggccccgaatgcg gctaactcaaccagtgatccaccggtgcaaaaccatgactaggtggtcgtaacgcgcaagtc gctggcggaaccgactacttgggtgctctgtttccatattttatttcaattttatggtgacaa gagtaaagagatacagattgcagcc</p>
491	Boosepivirus B	<p>tttctccccctccccctccaactacctttccccctctgtaacgctagaagttgtgcaaacgcctg tagggtactgcaatccagcagtgcataggctaagcttttctgtacccacccccacattactga ggaggattgtgaaattgtgtagtagtggttagtagcggtagccggtaacccaaccagaa actcacggatgagatgaacaggacccccacatgtaacgtgtgttctgtctgccccgaaggtg aggccgtgagagcttgcacgcgaaaaccttgaaaacccaaaagtagcttctctctctattt tgttttctccaggacctgaatgcggctaaacctaaccgcgatccgcacgtagcaaccag ctagagtgtggtcgtaatgcgcaagttgcggcggtaccgactacttgggttctctgtttccttt atattttgaattttatggtgacaacagctagaaaataagagtgaac</p>
492	Phacovirus Pf- CHK1	<p>gtgtgtcatttctccccctccccctccaaacctttccccctctaactcgattgattaaccgggtaaa gatgattaatggtttgtgagttgatatgatggcccgccattgaatccgggaattcttaagtaatgga attgcatccaatatgaaagtgagtgtggcaagctcacaagtagtacttggctctgcccattattga ggaccaactcttctgactacaatgtgttaaaagtaaactggaccacattgtgtatccagacaactc catttgataatgtacgctggaaacgtttcagtgcatagggtcctaaagtggtgctgaaatattgca agctcaatgggatactgaacgctgaaaaccgctgttatcatatggggccctagtggtgaaat</p>

		gttggcttaggcatatactgcttgggaatgcagtactggtttagacagggtgatagcctaccgg ctggcgtagttgagttggtatagccagttgattgccaat
493	HRVC3 QPM	ttaaagctggatcatggttgtcccaccatgattaccacgcggtgcagtggtcttgtattacggta cattccataaccagttttatacacccccacccgaaactcatagaagtttgtacacaatgaccaatag gtggtggccatccaggctcctaattggcaagcacttctgtttccccggcaccctgtatacgcttc accgagggcgaanaatgaggtgtcgttatccgcaaagtgcctacgaaaagcctagtaaaccttt gaaaacccatggttggctcgtcagctgtttaccaacagtagacctggcagatgaggctagaca ttccccaccagcgatggtggtctagcctgcgtggctgcctgcacaccctgccgggtggaagcc agaaagtggacaaggtgtgaagagcctattgtgctcactttgagtcctccggcccctgaatgtgg ctaaccctaaccctgtagctgttgcataaccaacatgatgcagtcgtaatgggcaactatgg gatgggaccaactactttgggtgtccgtgtttcctgtttacttttattgcttatggtgacaattgat ctgatacactgttacc
494	HRVB27	ttaaacagcggatgggtatcccaccatccgaccacagggtgtagtctctggtattttgtacct ttgcacgcctgtttccccattgtaccctcctaaatttctcccaagtaacgttagaagttaagg aaacaaatgtacaataggaagcatcacatccagtggtgtatgtacaagcacttctgtttccccgg agcgaggtataagtgttaccaccgcccgaagccttaaccgttatccgccaatcaactacgtaa tggctagtattaccatgtttgtgacttgggtgtcgtcaggtggttccccactagtttggctgatg aggctaggaactccccacgggtgaccgtgtcctagcctgcgtggcggccaaccagcttttgc gggacgcctttttacagacatggtgtgaagacctgcatgtgcttattgtgagtcctccggcccct gaatcgggtaaccttaaccctggagccttgaacataatccaatgttgttgggtcgtaatgagt aattctgggatgggaccgactactttgggtgtccgtgtttcctttattctttatattgtcttatggtcac agcatatatagcatatatactgtgac
495	HRVA73	ttaaaactgggttgggtgttcccacccaaccaccacgcggtgtgtactgttattccggta acctgtacgccagttttataatccctcccccccttgaacttagaagacatgcgaatcgaccaata gcaggcaatcaaccagattgtcaccggtcaagcacttctgtttccccggctctcgttgatatgctc caacagggcnaaaacaattggagtcgttaccgcaagatgcctacgnaaacctagtagcatct tcgaagattttgggtggtcgtcagttgctaccccagcaatagacctggcagatgaggctagaa ataccccactggtgacagtttctagcctgcgtggctgcctgcacaccacacgggtgtgaagc caaagattggacaaggtgtgaagagtcacgtgtgctcatctttagtcctccggcccctgaatcgg gtaaccttaaccctgtagcattgctcgaatccagcgagtatatggtcgtaatgagtaattacg ggatgggaccgactactttgggtgtccgtgtttcacttttacttatcaatttgccttatggtgacaatat atatagatatattgacacc
496	EV L	acatgggccagccaccacaccactgggtgtagtagtctggttctatggaacctttctacgcct cttttcttccctccccatttctccttgattgctccacctgtgatctttgcaacttagaagaataat gaaccgcacaatagcgggcgctgagccacagcgtcaatgtgcaagcacttctgtttccccgg

		<p>aatgggcccataaggctgtaccacggctgaaagggaccggcccgttaccgccttggtactgc gagaatgtagtaactccctcgatagctttaggcggttacgctcagcccttgagcccgaagggtg gttcgggtcgaatgaggctcgtcattcccactggcgacagtgtgacttgctgcgttggcggccc ggggtggggggcaacccccatccacgcctactgaaggacaggggtgtaaggcgctattgcgc tactaaggagtccctccggcccctgaatgaggtaaacccgaacccgagcccacggtggtaaac ccgccacaagtgggtcgtaatgagtaattggggcagggaccgactactttgggtgtccgtgttt cctgttttccatacgaatggctgcttatggtgacaaccataagcaattggattggccatccggtgttc atattgcgaat</p>
497	EV K	<p>tcagcctgacgcaagtgcctccattggagtctctccaagccctccggggcttgaggggcgccg acccctgcctagggggagcccacgacacggctggagtccattggcacaccgagccacgat tcaagccagaattgaaagcgggaagcacttctgtctccccgggtggtgatatacgtgtaccac ggcgaaaagtgaagcatcgttaccgactcggctacttcgagaagcccagtagcttggatct ctgcagggtatacgtcagcgtgaccctacgtagttccttgagatggctgagagaacacccca cgggcgaccgtgtctcggcgcgtggctcaaggccgggccttcagtggctcgggtgccttgca gagtgaagcctccgaacagcctattgagctaccgtttagcctccgcctcttgaatgaggtaat cctaaccatggagcggccgcccacagtccagtgggtagagcgtcgtaacgcgcaagtccgtg gcggaaccgactactttagagtggcgtgtttccaatttatcctttataaagttgcttatggtgacacc acaagagatccacgatttctgtttcttactgagacacaagtcatattcatcaatctttattgagg aattaactgggtcgtccaaacacatcagc</p>
498	EV J 1631	<p>caccctgagggcccacgtggcgtagtactctggtatcaaggtaacctttgtacgcctattttattcc cttccccacagtaacttagaagcttatctcatagtcaacagtagggctcactaaccaagtggctc agcgaacaagcacttctgtttccccggctcctagtacctgtgaagctgtaccacggcggaaagg gaaaaagatcggtatccggccccctacttcggaaagcctagtaacaccattgaagcaatcgagt gttgcgtcagcacagtaacccctgtgtagctttgggtgatgagctctgggactccccactggcg acagcggcccaggctgcgttggcggccaaccgactcgggcaaccgggtcggacgctcgtttg tggacatggtgtgaagagcctactgagctagagggtagctcctccggcccctgaatcgggataat cctaaccgggagcaccacactcaatccagagtgcaggatgtcgtaacgcgtaagtctggga cggaaaccgactactttgggtgtccgtgtttctgtttacttactttggctgcttatggtgacaatcta gtgtgttaccatatactattggattggccatccggtgtttgaattgtgtgtttataactaattctttac atatcacagacaaccaat</p>
499	EV J N125	<p>cggtaacctttgtacgcctattttaccccctcccctgttaacttagaagcaaaaccagttcaat agtaagcaacacaaccagtggtgtgacgaacaagtacttctgtttccccgggagggtctgacg gtaagctgtaccacggctgaagtatgacctaccgttaaccggctacctctcagaaagtctag taataccattgaagttttgtggcgttacgctcaacacactaccccgtgtgtagtttggctgatgag tcacggcattccccacgggacccgtggccgtggctgcgttgcggccaaccaaggggcgcaa</p>

		<p>gctccttgacgtcacttaacagacatgggtggaagaacctattgagctaggtagtagtctccg gcccctgaatgcggctaactcactccggagcacatcagtgcaaccagcatttgggtgtgtgt aatacgaagtctggagcggaccgactactttgggtgtccgtgttctgtttacctatttggct gcttatggtgacaatttgatattgttaccatatactgttggattggccatccggattttgaaagaga cccaaaactttctctacttcagattcaagtgcgaagtttctttcatatattacttactaattgaa gtaccaag</p>
500	EV I	<p>ttagtactttctcacgggtagtggtatccctccctagtaattagaagacttgaanaaccgacca ataggcacctcgcacccagcgggtaaaaggtaagcacttctgttccccgggtcgagtagcga tagactgtgcccacggcgaaggtaaaccaaccggtatccgacttctgacttccgggaagcctag taccaccaaagattatgcttggggttcgctcagcacgaccctgggtgtagatcaggccgatggat caccgcattcctcacaggcactgtggcgggtgctgcgtggcagcctgccgatggggcaacc catcggacgccaagcatatgacagggtgtaagagcctactgagctacaaagtattcctccggc ccctgaatgcggctaataccaaccacggagcatttctaccaaaccaggtagtggaatgctgta acgggtaactctgtggcggaccgactactttgggtgtccgtgttcttttaattatcattctgtat atggtgacaactatagctatctcgatttgcattactattgttgagataaaactttattacattgttc atftacccttgagtgagtttccactgaacagattaatttactcatcctgtttatataatacaagcaga aatacttgcaaag</p>
501	EV F1 BEV 261	<p>gcaatgctgcaccagtgcactggtagcgtactctttcacggagtagatggatcccttacc ggaacctagaagattgcacacaaccgaccaataggcgcaccgcatccagccgtgcagcgg caagcacttctgtctccccggctgtgaaagatcgttatccgcccgaccactacgaaaagcctag taactggccaagtgaacgcgaagtgcgctccgccacaacccagtggttagctctggaagatg gggctcgcaccacccccgtgtaacacgggtgctgcccgcgtgtgcttccgggttcggctc tgccgttcaactcaactcagcaaccagccaagagcctattgtgctgggacgggttctccggg gccgtgaatgctgtaataccaacctccgagcgtgtgcgcacaatccagtggtgctacgctgtaa cgcgtaagttggagcgggaacagactacttccggtaccccggttctctcatttttaataatftt atggtgacaattgttgagatttgcgctctgcaacggtgccattgaatattggcttatactatttgggtg cctttacaaaacctctgatataccagttctacattgatctgcttgttttctcaatttgaagtataga ctacaaatagcaaa</p>
502	EV D94	<p>cgtggcggccagtagtctggatcacggtagcttctgtacgcctgtttatatacccttccccgcaa cttagaagaaaacaataagttcactaggaggggtacaaaccagtagcaccacgaacaagc acttctgttccccgggtgatgctgatagactgtaaccacgggtgaaaacgattgatccgttatccg ctcttgacttcgaaaagcccagtagcaccttgggaatcttcgatgcgttgcgctcagcactcaacc cagagttagcttaggtcagtagctggacactcctcaccggcagcgggtggtccaggctgcgt tggcggcctacctgtgtgccaagccacaggacgctagttgtgaacaaggtgtgaagagcctat tgagctacaagagaatcctccggcccctgaatgcggctaatacctaaccacggagcaagggtac</p>

		<p> acaaaccagtgtatatcttgcgtaacgcgcaagctgtggcggaaccgactactttgggtgtcc gtgttccctttgtttatcatggctgcttatggtgacaatctaagattgttatcatatagctgttgatt ggccatccggtaatttattgagattgagcatttgctgtttctcaacaattcacctattcattgcatt cagcagtcaaa </p>
503	PV3	<p> taccttgtacgcctgtttatactccctccccgcaacttagaagcatacaattcaagctcaatagg agggggtgcaagccagcgcctccgtgggcaagcactactgtttccccgggtgaggccgcatag actgttcccacgggtgaaagtggccgatccgttatccgctcatgtacttcgagaagcctagtatcg ctctggaatcttcgacgcgttcgctcagcactcaacccggagtgtagcttgggcccgatgagtc tggacagtccccactggcgacagtgggtccaggctgcgctggcggcccacctgtggcccaaag ccacgggacgctagttgtgaacaggggtgtgaagagcctattgagctacatgagagtctccggc ccctgaatgcggctaatacctaaccatggagcaggcagctgcaaccagcagccagcctgtcgt aacgcgcaagtccgtggcggaaccgactactttgggtgtccgtgttccctttattcttgaatggct gcttatggtgacaatcatagattgttatcataaagcgagttggattggccatccagtgatcaga ttaattactccctgtttgttgatccactcccgaacgftttactcctaactattgaaattgttgaa gacaggatttcaggtcaca </p>
504	EV C ₁ 02	<p> cttgtacgcctgtttacatccccctccccacgtaactttagaagcaattcaacaagttcaatagag ggggtacaaaccagtatcaccacgaacaagcacttctgtttccccgggtgattttacataagctgtg cccacggctgaaagtgaatgatccgttaccgctcgagtacttcgaaaagcctagtatcgctttg ggatcttcgacgcgttcgctcagcactctaccccgagtgtagcttaggctgatgagctctgggca ttccccatcggcgacgatggcccaggctgcgttggcggcctaccatggctaacgccatggga cgctagtttgaacaaggtgtgaagagcctattgagctactcgagagtcctccggcccctgaatg cggctaatacccaaccagcatcaggtgcctccaaccagaggtggcctgtcgtaacgcgcaa gtctgtggcggaaaccgactactttgggtgtccgtgttccctttatctttaaaggtgcttatgggtg acaatcatagattgttatcataaagcgaattggattggccatccgggtgaaatacaaacacattatt acttgtttgttgattactccgctcacacagcttactcctaagataatatttattgtattgctgtaag gagacactattata </p>
505	EV 30	<p> aagcaaggcaaacctgaccaatagtaggtgtggcacaccagccgcatfttgggtcaagcacttct gttccccggaccgagtatcaataagctgctcacgcggctgaaggagaaaccgttcgttaccg accagctacttcgagaaacctagtaacactatgaacgttgcggaggtttcgttcagcacttcccc cgtgtagatcaggtcgatgagtcaccgacttctcagggtgaccgtggcgggtggctgcgttgg cggcctgcctacgggttcgccgtaggacgctctaataccgacatgggtggaagagtcattga gctagctggtagtctccggcccctgaatgcggctaatacctaactgcggagcaggtgctcacag accagtgagtagcctgtcgtaacgggcaactctgcagcggaaaccgactactttgggtgttttct ttttcttcttataattggctgcttatggtgacaattaagaattgtaccatatagctattggattggc catccggtgacgagcagagccattgttacctcttggattgtacctttgaaccacaaagtctt </p>

		gaatacattcatctcattttaagtcaactcagctaaaagaaa
506	SA5	<p> agtacttggtattccggtacctttgtacacctattfacaaccctacccttgaaccttagaagcaa ttattaaccgctcactagggggtgtgctatccaagcacatcaagagcaagcacttctgtctccc gggaggggctaattggtacgctgtgccacggcggaatgagccctaccgtaaccggcagct acttcgggaagcccagtaactacattgaaactttgaggcgtaactcagcacataaccccaatg ttagttctggtcgatgagccttggcatccccacaggcgactgtggccaaggctgcgttggcg gccagcctgeggacaaaagtccgtaggacgcctaattgtggacatggtgtgaagagcctact gagctagactgtagtctccggccccgaatgaggtaactcctaaccctggagcatccgcgtgc aaccagtagctaggggtgctgaatgctgaagtctgggatggaaccgactactttgggtgtccgt gtttctgttttcatactgggtcgttatggttacaactaattgttgaatcattggcagtgccgcgtg accacgcgattattgatattccatttgggatactccaatagtgtcaactcatatacacaactttac cactgatcaagataaaa </p>
507	EV A114	<p> tgtgcgctgtttgaaacccctccccaaactcgaaacgtagaagtaattgtacactactgatcag tagcaggcgtggcgcaccagccatgtctcgatcaagcacttctgtttcccgactgagtatcaa tagactgctcacgcggtgaaaggtgaaaacgtccgttaccggctaactacttcgagaaacctag tagcaccatagaactgcagagtgttcgctcagcacttccccgtgtagatcaggtcgatgagt cactgcaatccccacgggtgaccgtggcagtggtgcgttggcggcctgcctatggggcaacc cataggacgctctaaggtggacatggtgtgaagagtctattgagctagttagtagtctccggcc cctgaatgcccgaatcctaactgtggagcgcatactccaaaccaggggagcagtgctcgttaa cgggcaactccgcagcggaaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttattcctatactggctg cttatggtgacaattgagagattgtaccatatactattggattggccatccagtggtgtaatagag caatcattaccaattgttggatttactccattaaccacacgctctcaacacactacatttcatctt actactgaacactagaaa </p>
508	Mobovirus A	<p> tatttcccacaaaccttcttgaactctgttaagcctttacatccatgtaatttaatttctccaccta aaggattcccccatggtccttttggctcgaacaaatgctacatagggcttctgtttctccccctgg ctctcttccagggtccatacccaattcctctatttccatgattttcatcatggtttattttactgtct tcttatttctgaggtgaccaactcctaagccgactgggtcgcggaagcccggactcctcgcac actaggggtgcgtagcgatgtaggcgaaaataattggttcttagatgcatacatatagtgtaattgata ctacacaaactctgttcttttgaactagctattttctaagtaaggttaggctacgggtgaaacctt accattgcaggtacgtgaaccgcaacggacatttggccgaagactgggtgtaaccacgctagtta taggacctctcaacgttggtagcggcatgtcactgattagttaggctagtgaaatttaagttcagg gggtatcttttagcttaagcgtgtattctagtaggactgcagagcctccccactaggaggatctc tgtttatagcccccttttcttccgttagtttccacactttacaatatttgatgatttgtt </p>
509	Вирус Burpengary	<p> ctcccccttccccctccgagtaggagattggcatgtatgctctacatgcccattctcttctg ctcaactctttaaactcctggtggcggctcggattaacatttatgtcgtatctgggatcgtcttactt </p>

		<p>ggtgtaattcctctgttgccctaggaccccgactgccggattaaaggtctcaacagagggc aatgtacaaggaagtcattatagcctaattaagtatgtgatgactagtgacagggctgag gaactccccgggtaaccgggtgcctcagcgtccgaaagacacgtggataggatccaccctgt tatacccagcacgatgtaataagcaataacctctgattgtgtaggatgtataaattgtgcattgtaa atftggcgtagagatgctccgaaggtagcccggtttacgggatctgatcggaggctaattacc aatgcgccctaaataactcatataatttcttttctttattcaaa</p>
510	Hunnivirus A1	<p>taacgfttggcaagaaccctcacctgtcaattgggaccaccactttcagtgaccccatgcgaagt agtgagagagaataagctttctacccttcatttgaacccttcagtcgaagccgcttggataag ataggaggaaaagttcattctaataaggagtgaacatgtacttcagaatttctagcacgcgctggg ctttctgcgtgtgacggcactgtcttccggagctctccactgacacccacgcttgggacc ttggtggcagatgacaactgcagctggaattgagtgctggtacactctgtgtaacagtgaaa acaatgtgatcacttcgggtgagctagtagcctgtggaccaacaactggaacagttgcctcaggg gccaaaagccacgggtttacagcaccctactggttggattggagcaatccaagatgtcacagag ttagtaattgccaagcagtcctgactggtatcttgacataccgtgcagtttggatagtgaggatg ccctgacggtagccataggtaaacagtgacactatggatctaagcaggggctcactctacgctg ctttacagctggctgtgagttaaaaaacgtctagctatccacaacctaggggactaggtttccttt atttagattacaattat</p>
511	Hunnivirus A2	<p>acagttttgacaaggaccctcacctgtcaatcgggaccaccactttcagtgaccccgctgcgaag tgtgagagaaaagtgagctttctacccttcatttgaacccttcagtcgaagccgcttggataaa gatggaaggaaatgttcattctaataaggagtgaacatatacttaattccagtgtttagtggtcttc cactagacaacggcactgtcttccggaaactctacacaccaactccacgcttggggactcaa atgttgatgacacagttgtagctggaactgagtgtttagtgactctgtgtaacagtgaaaaaat gtgatcacttcgggtgggtagtagcctgtggactaacaactggaacagttgcctcaggggcca aaagccacgggtgtaacagcaccctactagttgattggagcaatccatgatgttacagagttagt aactgccaacagattgactggtatcttggcataccgtgcaacttaggatagtgaggatgcct ggcggtagccataggtacaagtgacactatggatctaacaggggctcactctacgttcttta caactagctgtgagttaaaaaacgtctaactatccacaacctaggggactaggtttccttttattt tatacacaacta</p>
512	Ia Io	<p>ggtgtccgggtgtgtgggatagaccagatgtgcagtggtatgcgagcatttgatcagagtagg agcaagcccaggggcaaagggaccacattgtgtatcccgaatgaaggatcgagatttctctcct cattaccgggtgtctgtcactgttgggggggccaacagctcttagctatactgctgataggg tcgaggctggccggactcaagtctatagtcagttgatttctactc</p>
513	Вирус синдрома Таура	<p>ctttaaagtcgtgcgtggcttaccacgcacgatcagtaactcagttaccactcttgaatatgc tcaatgaccctattcaacactgggtctcttagtacattattttagcacttaacgtgcatgagtttggc catttcttcaaaaaatgagtatcagaggagacgtcccgtccccgtcttatttcaaccgtagact</p>

		cgacatctattggtggacatttaattccagtcgccgtaagttgcttctgccccgcgctatattttctta tacttatggftctataggtctggfttaaacgtaaataagacggccccacaaactatagaacgcgtac ccggaacgccaatcccggataagtccttgatataatagatgcaccgcaatataagcctgcagac tgtctcatatact
514	ABPV	cccgtcaaaataacaactfataaacacgatgttaccgaagaaccattttagtgtaacatttaagat tagaagtagttcatctaatagagataggcactattagaaggaggccttttctaaaggagccgtag tcagcccagacaagcgcagctactttagaagagagaagtccccgatagcgaccgaaaagacg cgtttccgtgctaactaatttaaatgtgggaacgaatattatttgaattatgtgagccacgtagc aatcaagtcagtgtttgtcactacgtttactcatctaattgtagataattttgttaagtacatttaggt gtcatcccaccagagaagaaataatacgtaccggaaccagagtacacccttattttaagcctt actgggcttctctgttagttagtaactctggcccacgtttgctgtgagtggggtcccaacagtagga attcgacggacaagtagcaagcagtcggtaccaattggtttagccttcgaaattactctgggca ggaagttactaaacgagaactttctgcttaaatcccaacgcacaaacaaatagagtaaataaata attata
515	BRAV-2	ttgttttgcggctttgccgtgttcgggttttacctgtttcacacagcaaaacaggccttctagttc gtgcttaaacgagatcatgctcgaactagaactacatagctggcactggactcataccacacctt gtggagctttatgggaaaggtggctagtggtgtggaagtactctgaccacatgcctctcaa gtgtgggaaatcacggatcgggtagcgcgacaacaggccttgggacaccctctccagtaat ggagacccaaggggcaaaagccacgcctcgtgccctgtgttcacaaccccagtgcgaccc gtgttagtacctatttgcgagaactgtgtctggacagctaaacacaacccctagtgaggagactaag gatgccaggaggtacccggaggtacaagtgacactctggatctgacctggggagagaggg cttgccttacaggcgcctctcttataaaaagcttctatgtctcatcaggcaccggaggccgggcttt tcctttaaaattacactta
516	BRBV-1	ccccctacttaagatgtacggtttgctgctttcacagagtaaagcagatagaggttctgaact ggcaaaccttacctcgaaacacgcccgttttctgctgtgtctcacagactgtcctgtcacactgtg gcccgtgtgacactgtgaacatagtgagaccgaccaagacaacagttcaagtatgaacatc gaacgtctaaactggatccgtaactggacatgttagggcaaggacttccccctggtaacagga gcctggctggccaaaagccccgctcattgagcctagcatgttgtcgacctggactgttcagtta gttagtacatggaattcactgtcacggttcttctgaactcggctctatgatgacagcctaaggatg ccctccaggtacccggggtaacaagtacaccgggatctgaggaggggactactttacgta gttataaaaacgtctaagctgttatggtgaccagaggctggcacctttcactttaaaattacactac tgactacaattgaagtataacggttttacaggcttcaactagttacacaagcactgttttctga cacacacacttt
517	ERAV-1 U188	aatattggcgcgcgcatattgcgcgccccccccattcagccccctgtcattgactggtcgaagg cgttcgcaataagactggtcgtcacttggctgttctatcgtttcaggctttagcgcgccctcgcgcg

		gcgggcccgtcaagcccgtgcgctgtatagcggcaggtaccggacagcggcttgctggat cccgggtgccattgctctggatgggtgcaccaagctgacaaatgcggactgaacctcacaagcg acacacctgtgtagcgtgccccaaaaggagcgggaactccccgccgcgaggcggctctct ctggccaaaagcccagcgttaatagcgccttttgggatgcaggagccccacctgccaggtgtg aagtggagtgagtggatctccaatttggctgttctgaactacacctactgctgtgaagaatgc cctggaggcaagctggftacagccctgaccaggggcccctgccctgactctgatcggcgca gggtcaaaaattgtctaagcagcagcaggaacgcgggagcgtttctttccctttgatcgcac
518	GFTV	atggggaagggtatgacgtgccccttcttctcggagaactcgtctagtggctttccactctg gaaaagagtgagtgcacgtgatcaggaccgtcgaagacgacaaataacctggctctatctcat agacgtttcacagctgtagcgaccctcagtagcagcgggaagccccctcctggtgacaggagc ctctgcccgaaaaagccacgtggataagatccactgctgagggcgggtgcgaccctagcacct gtgatgcatactagtgttagcgtgccggactattggctgtcataagacacctgatagagagacc aagaatgtcctggaggtaccccgcgtgcgggatctgaccaggagaccattgccaatgctttac aacgggtctatggtttaaaactgtcgcagtcttccaaccaagtggcttgggtttcaattcttg aatatttcaact
519	SAFV V13C	tttcgacgtggttgaattgccatcatttccgacgaaagtctatcatgcctccccgattatgtgat gttttctgccctgctgggaggcattctcgggtgagaaaacctgaatcttttctttggaacctg gttccccgggtctaagccgcttgaatatgacaggggtattttcttgatcttatttctactttgcccgt tctatccgtaaaaagggtacgtgctgccccttcttctcggagaattcacacggcggctttccgt ctctcaacaagtgtgaatgcagcatgccggaacgggtgaagaaaacagtttctgtggaattta gagtgcacatcgaacagctgtagcgacctcacagtagcagcggactcccctcttggcgacaa gagcctctgcccgaaaaagccccgtggataagatccactgctgtgagcgggtgcaacccagc accctggttcgatgatcattctctatggaaccagaaaatggttttctcaagccctccggtagagaa gccaagaatgtcctgaaggtagcccgctgcgggatctgatcaggagaccaattggcgggtgctt tacctgtcactttggtttaaaattgtcacagcttctccaaccaagtggcttgggtttccaatttg ttgaatggcaat
520	SAV P-113	ggagatctaagtcaaccgactccgacgaaactaccatcatgcctccccgattatgtgatgcttct gccctgctgggtggagcatcctcgggtgagaaaaccttcttcttttcttggacccccggctccc ccggcttaagccgcttgaataagacaggggtatcttcaccttcttcttctacttcatagtgtct atactatgaaagggtatgtgtgcccccttcttcttggagaacacgcgcggcggcttccgtctc tcgaaaagcgcgtgtgcgacatgcagagaaccgtgaagaaagcagtttgcggactagctttagt gcccacaagaaaacagctgtagcgaccacacaaaggcagcggacccccctcctggcaaca ggagcctctgcccgaaaaagccacgtggataagatccaccttgggtgctggcacaacccagt gccctggttcttggtagactttagtgaacgcaaatggcgatctgaagcgcctctgtaggaa agccaagaatgtccaggaggtaccccttccctcgggaagggatctgacctggagacacatcac

		atgtgctttacacctgtgcttggtttaaaaattgtcacagctttcccaaaccaagtggtcttggtttc actctttaaactgatttact
521	VHEV	aattccttcttcttcttcttggacctcggccccggcttaagccgctcggaaatgacaggggt atfttcaccttcttcttcttcttacttcatagtggttctatactatgaaagggtatgtgtcgccttcttct tggagaacgtgcgtggcggcttccgtctctcgaaaaacgtgcgtgcgacatgcagagtaacg caaagaaagcagttcttggcttagctctgggtcccacaagaaaacagctgtagcgaccacacaa aggcagcggaaacccccctctggtaacaggagcctctgcggccaaaagccacgtggataaga tccaccttgtgtgcgggtgcaacccagcacctggtttcttggtagacacctagtgaaacctcga atggcaatctcaagcgcctctgtaggaaagccaagaatgtccaggaggtacccccctctcatgg agggatctgacctggagacacatcacacgtgctatacactgtgcttggtttaaaaattgtcacag ctttcccaaaccaagtggtcttggtttcccttaacttcgaaaagtcactatggcctgcaaacatgg ataccagacgtgtgcct
522	TRV NGS910	atgcgacgtggttggagattaaaccgactccgacgaaagtgtatcatgcctccccgattatgtg atgtttctgccctgtggtggcgagcattctcgggtgatacacctgaatccttcatccttggacct caggtccccggcttaagccgcttggaaatagcaggggtattttccaatcttctcttctactttc atgagtcctattcatgaaaagggtctgtgctgcccccttcttcttggagaatctgcgcggcggtctt tccgtctctcgaaaagcgcagatgcagcatgctggaaccgggtgaagaaaacagttcttggga aacttagagcagacatcgaacagctgtagtgacctcacagtagcagcggaaacccccctctggt aacaggagcctctgcggccaaaagccccgtggataagatccactgctgtgagcgggtgcaacc ccagcacctggttcgatggttgttctctgtggaaccagagaatggtctttctcaagccctccagt agagaagccaagaatgtcctgaaggtagcccgcatgcgggatctgatcaggagaccaatcgtc agtgtttacactggcgcttggtttaaaaactgtcacagcttctccaaaccaagtggtcttggtttc actttatcaaacgtttc
523	EMCV2 RD1338	aaatactggtcgaaaccgcttgggataagaccggggttggtaatgtctcaatgttattctccacc aattgacgtctttgtcaattggagggcagtgaaacctgccccttgccttcttgcagaggattcccag tggctttccgctctcgacaaggaattcatgatccacaaaagttgtgaagagagcaggtccca tggaaagctttctgacgactgatgatgactgtagcgaccttgcaggcagcggacccccacc tggtagcaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgttaacagacacctgcaaaggcggcaca acccagtgccctcatcaaaagtctgatgactgtgaaatagcaaccggcttttctaagcaaattt ggtgtcggggctgaaggatgcccggaaaggtaccacactggttgtgatctgatccggggccaca gtacatgtgctttacacatgtagctgcgggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggac gtggttttcttggaaaaccacgattacaat
524	EMCV1 JZ1203	gtctgctcgatatcgaggctgggtcctgactaccactcccccttcaacgtgaaggctacga tagtgccagggcgggtactgccgtaagtgccaccccaaaaacaacaacccccctaacat tactggccgacgccgcttggaaataaggccggtgtgcgttgtctatatttccaccacattg

		<p>ccgtctttggcaatgtgtgggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggt ctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaa gcttctgaagacaacaacgtctgtagcggcccttgacggcagcggaaacccccacctggc gacaggtgcctctgcgccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacc ccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaaggctctcctcaagcgtattcaa caaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtg cacatgctttacatgtgtttagtcgagggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgt ggtttccttgaaaaacacgatgataat</p>
525	EMCV1 AnrB-3741	<p>atgtggtcgaagccacttggataagaccggcgtgcgcttcttatatgttactccaccacattg ccgtctttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgaacattcctagggga ctttcccctctcgccaaaggaatgtaaggctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaa gcttctgaagacaacacagcgtctgtagcggcccttgacggcagcggaaacccccacctggta acaggtgcctctgcgccgaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacc cagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaaggcttccccaaagcgtattcaac aaggggctgaaggatgccagaaggtacccactggtgggatctgatctggggcctcgggtg aggtgctttacacctgtttagtcgagggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgt ggtttcctagaaaaaccactatgacaat</p>
526	Cosavirus D1	<p>cgtgctttacacggttttgaaccccacaccggctgtttggcgcttgacaggacagtaggtatattt ctttacttctcttttagccgcgtaggttctatctacggggcggagtgatactcccgtccttctt ggacaggcggcctccacgctcttgtggatcttaaggctgccaagtcactggtgtttgaagtga gaatggagagacactagggcgtttcatgtggctttgccagggattgtagcgtatgctgtgtgtgt gaggatttcccctgctggcagacagcctcacaggccaaaagccctgtccgaaaggacca cacagtgggggttccccgacctccttcaaagcttgtgtaaaaaactttgtttagacttctt aagcttctctacatcaggccccaaagatgtcctgaaggtacctgtgtatctgaggatgagcac caccaactaccggacttggggacgtgtcccacagacgcattgtggtattccagccccctcttt gaggaggggctttgctcgtcagcacaggatctgatcaggagattcatctgtgtgtttacac cagagcatggattaaaaattgccaaggcctggcaaacacctaggggactagggtttctctatt ttaaagatgtcaat</p>
527	Cosavirus B1	<p>cgtgctttacacggttttgaaccccacaccggctgtttggcgcttgacaggacagcaggttatttt ctttacttctcttttagccacacacgatctatgtgtgtggggcggagtgatactcccgtccttct tggacaggcggcctccacgcccttgggatcttaaggctaccaagtcactggtgttggaaagt aagagaaaggagttccttgggaactacatgtggcattgacagaggtttagcgtatgctgtgtgtg tgtcggattacccccgtggcagacggacccccacaggccaaaagccctgtccgaaaggacc cacacagtggagcaacccagctccccttcaatgtttgtgttagcaacctgtgtattttctct caagcttccaatacaccgggccccaaagatgtcctgaaggtacccgtgtatctgaggatgagc</p>

		<p>accatcaactacccggactgttcttctgagaacagacgcatgtgtaaccagccccgatccta aggggtcggggcttttgcactcagcacaggatctgatcaggagacctccccccctgctttac agggggcgggggttaaaaattgcccaaggcctggcaaataacctaggggactaggtttcttt ttattttaaagttgcaat</p>
528	Cosavirus A SH1	<p>ccgtgctttacacggttttgaacccccacaccggctgtttggcgttgaggacagcaggttattt tcttatgctctttatttctagccaacagggttctatcctgttgggaggagtgatactcccgttcttctt ggacagattgcctccacgatctttgtggatctcaaggtgatcaagtcaactggtaaatagagcgaa ggttgaggaaacctgaggaatttccatgtggtttgccaggagtttagcgcgatctgtgtgtgtgt gcggattcccctcatggcaacatgagcctcacaggccaaaagccctgtccgaaaggaccac acagtggagcaatcccagctcctcctacaaagctttgtgagaatgaactcacgtttattcttctta ttctgtttacatcaggcccaaatgtcctgaaggtacctgtgtatctgggcgatgagcaccat caactacccggacttgatttcggtgagacacatgtggttaccagcccctctgctttggcaga ggggctttgctcgtcagcacgagatctgatcaggagccctcccagtgctttacacctggc gggggggttaaaaattgcccaaggcctggcaaataacctaggggactaggtttcttttattaac aatgtctgtcatt</p>
529	Malagasivirus B	<p>cttattttctatgtaactcttcttttaagtttattttgcctactgtgagcttatgcgggaccactgtct tagacaacccccacatttgcctatgagtaagtacacgcaaccattacgattacttttaaccgtctgac cttttgataacaactgaagttaggcgtgaaacatgcatttatacacaagtagccccgatttccccca ctacgggtgggggggctaccctactggctttggaactgtagccattatgtgttcctggcttccagg atctcacaacacaacagttctctcacaatggaatatgggtgagattgcagtgacatgaacaagtat ctagtagtacatagactcaagcctagttgcctgcggaacaacatgtggtaacacatgccccagg gtccaaaagacaagggttaacagccccctctaggtgtctgtgtgtaagaatacttttagtagtgg ttatgatctcactgttagtacagaatgagatggcttgggaaggatgtcctacaggtaccattat atggatctgagtaggagaccactagtggtggctttaccgccaggtgagtggttataaaaagcgtct agccaagccaacagcactagggatagtgctttctatattttatattttcagtgat</p>
530	Mosavirus A2 SZAL6	<p>ccccccctcaaatgcaacgatatagctaattggcgagattgagatgctatatcacctcttctaagt tatagacctcatctgattgataaggacgtaatttggctgaaaccgcttggaaataagaccgatgcgc gtagtcctgatgatgatgtaagatctaggaacttccaatctgcttatgtctatgtaagtagaggg gcaggcctcattgccctaattcttctaccgagatctgctaggggttctagcggcttgaatactgg attgagggatacaagataactactgatcgattgtcgattgggaaactgtagatacttcaaagctacc agtagcgtggactcacagccagcggactaccctcatggtaacatgagcctctgggcccacaa ggcacgtcgcaagacctgtgagacggcaacccagcctagctttgtgaggaaacaagcgata acatgacatgagagaccggaaggattctgtattgtgagccgaaggatggcctctaggtacctca tttatgagatctgaggaggtgctcttgagttggtgctttactgacaacacagagttataaaaagcg tctaagctcaccggaaattgggaaatttccgttatttccattttgttgcгааagtcgttc</p>

531	SVV	<p>ctgggcctcatgccagtccttcccttcccttccgggggtaaacggctgtgtttgctagagg cacagaggagcaacatccaacctgctttgtgggaacgggtgcggctccaattcctgcgtgcc aaaggtgtagcgcacccaacggcgcacatctaccaatgctattggtgtggtctgcgagttagc ctactcgtttctccccctactcactcactcagcacaacaaagtgtgctgtaattacaagatttagcct cgcacgagatgtgcgataaccgcaagattgactcaagcgcggaaagcgtgtaaccacatgct gtagtcccttcatggctgcgagatggctatccacctcggatcactgaactggagctcgaccctc cttagtaaggaaccgagaggccttcttgaacaagctccgacacagagtcacgtgattgcta ccacatgagtagatggttctccctctcgaccaggacttcttttgaatatccacggctcgatcc agagggtggggcatgatccccctagcatagcagctacagcgggaactgtagctaggccttag cgtgccttggatactgctgtagggcgacggcctagtcgtgctggttctataggtagcacatac aaat</p>
532	PTV A	<p>actagtcctggacttttgtgtttaaacacagaaathtaattacctggccatgaattcattggatta accttctgaaagacttgctctggcgcgagctaaagcgaattgtcaccaggattgcaccagtg gtggcgacaggggtacagaagagcaagtactcctgaccgggcaatgggactgcattgcatatcc ctaggcacctattgagatttctctggggcccaccggcgtggagtctctgtatgggaatgcaggac tggacttgtgctgcctgacagggctcgcggctggccgtctgtactttgtatagtcagttgaaactca cc</p>
533	PTV B	<p>cttcccttaattcgtactgataagtatagtccttggaaactaggtatttgtacgctagttttgatt atcttgtgcccaacattgttttgaacatagttgtttaaacacagaaatctagtttcttggttatg agtttaattggaatatacctttgaaagacttgcttggcgcgggctagagcgcgaattgtcaccagg attgcaccaatggtggcgcaggggtacagaagagcaagtactcctgactgggtaatgggactg cattgcatatccctaggtatctattgagatttctctggagcccaccagcatggagtctctgtatggg aatgcaggactggacttgtgctgcctgacagggctcgcggctggccgtctgtactttgtatagtc gttgaactcatt</p>
534	Tottorivirus	<p>cccccttacgtaactgcaactaaagagtaccctactgcattggatgtgtgtaaaccttttacgcac acattttagtagttagttatgttctactaatgagtagatgcaccccgtaaacacgcttgg ataagataggtagtccatgtgactaatctcattaagataaataagcaccctacaacgcacggca cgctcgtgtcttccgtcggggccgggacaacagcggcctaaatctttaggtgaccaccatgc ttttggactatggcaccactgtggacgtgagtacctggcagtaagtctgtgaaaagatggaagg tgtccaagctatggggcgtatgcatatagcctgcggaacaaacaacggcgacgttgcctccag ggcccaaaaggcacgtggataagatccacctatgtttacccatagtgtaagtcactggaagt cctagtaatggatgtctggagtaaggctcacgggtagggcgaaggatgccagaaggtagcc gtaggtaaccttaagagactatggatctgatctggggaccggatggcgcctaccatgacgtg gaggccggttataaaaacgtctaagcccaccaacaacctaggggactaggtttctttttattc atgtatgacgtt</p>

535	Posavirus 1	<p>acatttccttgcgtgcgacccgaaaatttattgaacttggcttgaatcataagtaatgcttctatag cggacactttgagaatataatgcttgtatggattaatgtatactgttttaataacaaacctagacac gcagttgcgttgatggttgatcaatcacatataagtgttgaactcgtgtaatcctcgatcgctatat gtttgccgcctacttccaataaaatagattacatgcgcgtcatgcctttgtgggtaacctattggcct ctgacaaaaacaagtcgtaagattttagcttcccgggtgtaaaaagctgggcgcggtctggctct cgtaggggtggaaaggccaccaatggctgggtgagtgtaagctccgggtgcctggttgctgcaat tccaggcgtcgaataacctatattgcatctgactctaactcttggctctactgtatctagtcttctgt tctactaacttaataataactactggctctaatactgaaaaacttacatatgtaatatagataatcc ttgatcctgataccctcacgtcactgaagttcggcgaacgaatttcagatcatatcattgaatct caaggatgacttgcctgaacctactataactcctcatgcgttttcttctactcttggc</p>
536	A105-675	<p>ccaccacagcaagaatgccatcatctgtcctcacccttctcccctcctcccctgcaacca ttacgcttactcgcattgagtggtgcacgtgtgaacaaacagctacactcacgtgggg gggggtttcccgccttggcctctcgcgagggcccacccttcccctcctcccataactacagt ctttggtaggtaagcatcctgatccccgcggaagctgctcgcgtggcaactgtggggaccag acaggttatcaaaggcaccggcttctccgctccaggagtatccctgctagtgaattctagtggg gctctgcttgggtccaacctccccaaatgcgcgctgcgggagtgctcttcccactcaccta gtatcctctcatgtgtgcttgggtcagcatatctgagacgatgtccgctgtcccagaccagtcca gcaatggacgggaccagtgtgcgtagtcgtctccggcttgcggcgcatgtttgggaaccggg gggtaagggtgtgtgcccacgcccgtactttgggtgacaactcaagaccaccaggaaatgc caggaggtaccccgcctcacggcgggatctgacctgggctaattgtctacgggtgttcttctt gcttccatttcttctctgttc</p>
537	A110-675	<p>accttgcgcctgtttataccccctcccccaactgtaacttagaagtaacacacaccgatcaac agtcagcgtggcacaccagccacgtttgatcaagcacttctgttaccctggactgagtacaata gactgctcacgcggtgaaggagaaagcgttctgtatccggccaactacttcgaaaaacctagta acaccgtggaagttgcagagtgttcgctcagcactaccctagtgataggtcagtgatgagtc ccgattccccacggcgaccgtggcgggtggctgcgttggcggcctgccatggggaaacc atgggacgctctaatacagacatggtgcgaagagtctattgagctagtggtagtctccggccc ctgaatgcggctaatacctaactgcggagcacacacctcaagccagagggcagtggtcgtaa cgggcaactctgcagcggaaaccgactacttgggtgtccgtgttcttattctatactggctg cttatggtgacaattgagagatcgttaccatagctattggattggccatccgggtactaatagag ctattatatacccttgggtttataccacttagcttgaagagggttaaacattacaattcattgtt aagttgaatacagcaaa</p>
538	18-675	<p>cccacagcaagaatgccatcatctgtcctcacccttctccccttctcccctgcaaccattac gcttactcgcattgagtggtgcatgttgaacaaacagctacactcacatggggggcgg gtttcccgcctacggcctctcgcgagggcccacccttccccttataactacagtgttgg</p>

		<p>taggtaagcatcctgatccccgcggaagctgctcacgtggcaactgtggggaccagacagg ttatcaaaggcaccggctttccgcttcaggagtatccctactagtagaattctagcggggctct gcttgggtccaacctccccaaatgcgcgctgcgggagtgtcttcccaactcacctagtatc ctctcatgtgtgcttggtcagcatatctgagacgatgttccgctgtcccagaccagtccagtaat ggacggggcagtgctgtagtcgtcttccggctgtccggggcatgttgggaaccgggtggg taagggtggtggtcccaacgcccgtacttgggtgacacctcaagaccaccaggaatgccaggg aggtacccacctcacgggtgggatctgaccctgggctaattgtctacgggtgttcttctgctcca cttcttcttctgttcacg</p>
539	A115-675	<p>acctttgtgcgctgtttatacccccccaacctcgaaactagaagtaaagcaaaccgatcaa tagcaggtgcggcgcaccagtcgcatcttgatcaagcacttctgaacccggaccgagtatca atagactgctcacgcggtgaaggagaaaacgcttaccgggtaactacttcgagaaaacc agtagcatcatgaaagttgcagagtgttccgctcagcactacccccgttagatcaggccgatga gtcaccgcacttcccacgggcgaccgtggcgggtgctgcttggcggcctgctatggggc aacccataggacgctctaatacggacatggtgcgaagagtctattgagctagtagtagtctcc ggcccctgaatcgggtaatacctaactcgggagcacatacccttaaccaaagggcagtgctc gtaacgggtaactctgcagcggaaaccgactacttgggtgtccgttcttcttaattttactggct gcttatggtgacaattgaggaattgtgcatatagctattggattggccatccggtgactaacaga gctattgtgtccaatttgtggatttaccgctcacactcacagtcgtaagaacccttcattacgt gttatttcaactcaagaaa</p>
540	A73-675	<p>ttactcattcagcttcttcggaacctgttcggaggaaftaaacgggcaccatactccccacc ccccctttgtaactaagtatgtgtgctcgtgatcttgactcccacggaacggaccgatccgttggg aacaacagctaggtccacatctccttcccctgggagggccccgcctcccacatctccc cccagcctgacgtatcacaggctgtgtgaagcccccgaaagctgctcacgtggcaattgtg ggcccccttcatcaagacaccaggtcttctccttaaggctagccccggcgtgtgaattcacg ttgggcaactagtgggtgactgtgcgctccaatctcggccgaggagtgttccccaagcca aacccctggcccttactatgtgcctggcaagcatalctgagaaggtgtccgctgtggctcca acctggtgacaggtgccccagtgctgtaaaccttctccgtctccggacgtagtgattggttaag atttgggtgaaggtcatgtgccaacgcctgtgcgggatgaaaccttactgccttaggaatgc caggcaggtacccacctccgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagttcatt ccaatcctttatgtcggagtc</p>
541	Kobuvirus 16317	<p>ttactcattcagcttcttcggaacctgttcggaggaaftaaacgggcaccatacaccatcc ccttctgcaactaagtatgtgtgctcgtgatcttgactcccacggaatggatcgatccgctggag aacaactgctagatccacatctccttcccctgggaggaccttggctctcccacatctcccc ccagcctgacgtaccacaggctgtgtgaagcccccgaaagctgctcacgtggcaattgtgg gtcccccttcatcaagacaccaggtcttctccttaaggctagccccgatgtgaattcacatt</p>

		<p>gggcaactagtgggtgctactgtgcgctcccaatctcggccgaggagtgtgttcccaagccaa accctggcccttcaactatgtgctggcaagcatacctgagaagggttccgctgtggctgccag cctggtaacaggtgccccagtgtgcgtaaccttctccgtcttcggacggtagtgattggtaaga ttgggtgaagggtccatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaaccttactgccctaggaatgcc aggcaggtacccacccccgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagttcattt ccaattctttatgtcggagtc</p>
542	Aichivirus Chshc7	<p>ttactccattcagcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcaccatacatccccatcc cctttctgtaacttaagtatgtgtgcttgaatcttgactcccacggaatggatcgatccgctggaga acaaactgctagatccacatcctccctccctgggaggaccttggctctccacatcctcccc cagcctgacgtaccacaggctgtgtgaagccccgcgaaagctgctcacgtggcaattgtggg tcccccttcatcaagacaccaggcttttctccttaaggctagccccgatgtgtgaattcacattg ggcaactagtgggtgctactgtgcgctcccaatctcggccgaggagtgtgttcccaagccaaa ccctggcccttcaactatgtgctggcaagcatactgagaagggttccgctgtggctgccagc ctggtaacaggtgccccagtgtgcgtaaccttctccgtctccggacggtagtgattggtaagat ttgggtgaagggttcatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaatcttactgccctaggaatgcca ggcaggtacccacccctcgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagttcattcc aatcctttatgtcggagtc</p>
543	Aichivirus Goiania	<p>actccattcagcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcaccatacacccccatccc ctttttgcaacttaagtatgtgtgctcgtatcttgactcccacggaatggatcgatccgctggaga acaaactgctagatccacatcctccctccccctgggaggacctcggctctccacatcctcccc ccagcctgacgtatcacaggctgtgtgaagccccgcgaaagctgctcacgtggcaattgtgg gtcccccttcatcaagacaccaggcttttctccttaaggctagtcccgatgtgtgaattcacatc gggcaactagtgggtgctactgtgcgctcccaatctcggccgaggagtgtgttcccaagccaa accctggcccttcaactatgtgctggcaagcatactgagaagggttccgctgtggctgccag cctggtaacaggtgccccagtgtgcgtaaccttctccgtccccggacggtagtgattggtaag acttggcgtgaagggttcatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaaccttactgccctaggaatgc caggcaggtacccacctcgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagttcattt ctaattcttcatgtcggagtc</p>
544	Aichivirus ETHP4	<p>ttactccattcagcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcaccatacacccccaccc ccttttgcaacttaagtatgtgtgctcgtgatcttgactcccacggaatggatcgatccgctggag aaciaactgctagatccacatcctccctccctgggaggacctcggctctccacatcctcccc ccagcctgacgtaccacaggctgtgtgaagccccgcgaaagccgctcacgtggcaattgtgg gtcccccttcatcaagacaccaggcttttctccttaaggctagtcccgatgtgtgaattcacattg ggcaactagtgggtgctactgtgcgctcccaatctcggccgaggagtgtgttcccaagccaaa ccctggcccttcaactatgtgctggcaagcatactgagaagggttccgctgtggctgccagc</p>

		ctggaacaggtgccccagtggtgcgtaaccttctccgtcttcggacggtagtgattggtaagatt tggcgtaaggttcatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaacctctactaccctaggaatgcc ggcaggtacccccaccctcgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagttcattcc aattcttctatgtcggagtc
545	Aichivirus DVI2169	tactccattcagcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcaccatacacccccacc cctttctgcaacttaagtatgtgtgctcgtaatcttgactcccacggaatggatcgatccgctgga gaacaaactgctagatccacatcctccctccctgggaggacccccggctcctccacatcctccc cccagcctgacgtatcacaggctgtgtgaagtcctccgcaaagctgctcacgtggcaattgtgg gtcccccttcatcaagacaccaggcttttctccttaaggctagccccgatgtgtgaattcacatt gggcaactagtggtgtcactgtgcgctccaatctcggccgaggatgctgttcccaagccaa accctggcccttactatgtgctggaagcatalctgagaaggtgttccgctgtggctgccag cctggaacaggtgccccagtggtgcgtaaccttctccgtctccggacggtagtgattggtaaga ttggtgaaggttcatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaacctctactgccctaggaatgcc aggcaggtacccccaccctcgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagttcattc caattctttatgtcggagtc
546	Aichivirus DVI2321	gcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcaccatacacccccaccctttctgca acttaagtatgtgtgctcgtaatcttgactcccacggaatggatcgatccgctggagaacaaactg ctagatccacatcctccctccctgggaggacccccggctcctccacatcctccccagcctga cgtatcacaggctgtgtgaagtcctccgcaaagctgctcacgtggcaattgtgggtcccccttc atcaagacaccaggcttttctccttaaggctagccccgatgtgtgaattcacattgggcaactag tggtgtcactgtgcgctccaatctcggccgaggatgctgttcccaagccaaaccctggcc cttactatgtgctggaagcatalctgagaaggtgttccgctgtggctgccagcctggtaaca gggtccccagtggtgcgtaaccttctccgtctccggacggtagtgattggtaagatttggtgaag gttcatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaacctctactgccctaggaatgccaggcaggtac cccacctcgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggtagttcattccaattctttatg tcggagtc
547	Aichivirus rat08	tactccattcagcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcaccacttctctcctc ccctttctgtaactcaagtgtgtgctcgtaatcttgactcccgcggattgaccgctccgctggg aacaactgctaggtcatctccccacccttgggcgctcttcgggcgctccacaccctcccc cagcctgacgtgtcacaggctgtacaaagacccccgcaaagctgctaacgtggcaattgtggg tcccccttgaaggaaccgagcttttctccttaaggctagaccctgtgtgaattcacaggtg gcaactagtggttccactgcatgctccgacctcggccgaggatgctgttcccaagtcgtaa cactgaccttacttatgtgctggaagcatalctgagaagatgttccgctgtggctgccaacc tggaacaggtgccccagtggtgcgtagtcttctccgtcttcggacggtaggtgtaggtaagat gcccgtaaggttcaagtccaacgccctggaaggatgaccttctactgccctaggaatgc

		cgcgcaggtaccccaggttcgcctgggatctgagcgcgggctaattgtctacgggtagtttcatt tcctctcttccaactggcatc
548	Aichivirus Rt386	actccattcagcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcaccactttcctgtcctctcc ccctttctgcaactcaagtgtgtgctgtaaatcctgactcccacgggttgaccgccccgttggtga acaacagctaggtcattccctcctaccctgggcgccatttcagtggttcatactcctcccc cagcctgacgtgtcacaggctgtgcaaagtccccgcgaaagctgtcacgtggcaattgtgggt ccccctttgtgaaggaaccgagtcttctcccttaaggctagaccctgtgtgaactcacaggtg gcaactagtggttccactgcatgctcccacctcggccgaggagtgctgttcccaagtctgga cactgacctccacttatgtcctggcaagcatactgagaagatgtccgctgtggctgccaac ctggtaacaggtgccccagtgctgtagtcttctccgtctcggacggtaagtgtgtgtaaag atgcgcgtaaggtcaagtccaacgccctggaaggatgaccttctactgccctaggaatg ccgcgcaggtaccccaggttcgcctgggatctgagcgcgggctaattgtctacgggtagtttcatt ttcctctcttccaactggcatc
549	Pestivirus серых крыс	gtataagggttgggaacctgtaccaagctacctctgccattcagatttgggagtagaagtagat gtgtttacaaactcacacgtgtgggggggggatagactgtgccagcggctgtgtaccagcac ctacgcatacgtgtggactgcgaaccaggagagcacctaggctgacaagctgtgagaacaca gtagtcgtcagtgagtcagctggttaaggatcaccacctggatactcacgtggacgagggagtt tcccagtcagaaacctacaccagaggaggggtcctctggagacatggatggtctgagtaacag actatctactggggtgtgctgctgacagggctcggctgatagcctggctagcagtataaaat cagttgaattggcatatgagttgtgaacatctagtaaacatgaaagacaaaaacaaaaatgag cataataaaaaattgtacaatccactactcaggtgtggctgcagactt
550	Свиной Kobuvirus GS2	tttgaaaaggggttgggggggctcggccccctcacctctttccgggtggccattcggcccggg ccaccgttactccactccactccttcgggactggtttgagggaacacaacagggcttcccatccc tgttaccctttattccatcatccttcccccaagttaccctatccacaccccactgactgactccttg gattttgacctcagaatgcctatttgacctccactcgcctctccttttcggattgccggtggtgcc tggcggaaaaagcacaagtgtgttcaggctaccaaactcctaccgacaaaggtgcgtgtcc gcgtgctgagtaatgggataggagatgcctacaacaggctcggccatgagtagagcatggact gcggtgcatgtgacttcggtcaccacgggcatagcattgtcaccctgaaatcaagtcacgag atttctgacctctgaagtgcactgtggttcgctggctgggaatccacgcttgaccatgtactgct tgatagagtcgcggtggccgactcatgggttaaagtcagttgacaagacac
551	Kobuvirus SZAL6	cctacccaagggttacatgggaccatattcctcctcccctgtaactttaagttttgtgccctattctt gactccaggcggatgtgtgctgcccgtcctgtgaacaaacagctagacactttcctcccctcct ctgggctgctccggcagtcactccctccccccagcgtaacatgccccgctggagtgatgcac ctggaagtcgtggactgggttagtaactcgggtgaaaaccactataatgacaactggttgacc cccacactcaaaggactcgagtcttctcccttaaggctagcccggccacatgaatttcagctg

		gcaactagttagtccaccatgtcccgaacctcgctgaggagtctgttcccaagcgtatgc cttccttctgtaagagtgcgcctggcaagcacatctgagaagtcgtccgctgcgtcgtccaac ctggcgacaggtgaccagtgtagctgtagacttctccggattcgtccggctcttcttaggaaac atgctgtaaggtcatgtgcaaagccctgcgcggtgttcttactgcctaggaatgtgcc gcaggtaccctacttcggtagggatctgagcggtagtaattgtctacgggtagttcattccat cttctctcaggtcgacatc
552	Kobuvirus sheep TB3	gaccttctggacttctcgccctgggtcacaaaagcgaagaacctgcctcttaacgccagacga gcggcattaaactgaacttctggcactctccactctccctttccctgtccctttcccactgcgt ctcaaggctgcgcaatcctgggactagcccagttttaaagtctggcaccctttgccctctag gcccttaaggtaggaactgacftgtgctgtgatctcgggtcggggagtgtaccacgtatgcatc gtaagcctcgtttctggttctgcccctggcaaggctacagagtaccgtgtccgctgtggatgcat ccgggtaaccggacccccagtggtgtgtagcggatgttcacgggtccgccgtgtccaccagattcc tgacctggctttgtagaaatggtgtgtgcccacccctgtgaccagatcaattacatcacctagg aatgctaggaaggtagccctgctgagctgggatctgatcctaggctaattgtctacgggtgatg ctccttttatttttacaactgctattgactgtctgattgctgattctgtcttctgtctctgctggc tcatttcaagggttctcttctgtccaagatcctttggttctctcctgttccactgccactgccaacgc ttgtc
553	Pestivirus вилороговых	gtatacgtagttagtcatcctgtgtatacagattggagactctaaaaacaacgattcggatagg ggccccggcggaagaccgaagacaggctaaccatgccgttagtagggctagcaccaaaacg cgggaactagacacttaggagagtggctctggctactctaagaggtgagtacacctaaccgtca agggttctactcctcagttgaggactagagatgccctgtggacgggggcatgccaagagttag cttagccggggcgggggtgttccgggtgaaagtagcaatattgaccacactgcctgataggcg gagcaggccccctaggtagttagtataaaatgtctgctgtacatggcac
554	Изолят свиного pestivirus Bungowannah	tacgcgggtataacgacagtagtcaagtgtcgttatgcatcattggccataacaaattatcta ttggaataggacctgcgacctgtacgaaggccgagcgtcggtagccattccgactagtagga ctagtacaataggtcaactggttagcaggtgagtgtgctgcagcggctaagcggtagtaca ccgtattcgtcaacaggtgctactggaaaggatcaccactagcgtatgcctgtgtggacgagga catgtccaagccaatgttatcagtagcgggggtcgttactgagaaagctgccagaatgggtag ttgcacatacagtctgataggatgccggcggtgcctgtattttgaccagtataaatattatccgt gtaaagcat
555	Свиной pestivirus 1	gcagatatcgggtgggacctgggggttgggctcaccgtgcccttcatggggtagacctact gcttgatagagtgccggcggtgcctcaggtaagagtataaaatccgtgttactaac
556	Pestivirus giraffe-1	gtatacgagtttagtcaatcctcgtatacaatattgggcgtcaccaaatatagattggcataggc aacacccgatgcgaaggccgaaaagggtacccatgcccttagtaggactagcaaaaaatc ggggactagcccaggtggtgagcttctggatgaccgaagccctgagtacagggcagtcgtca

		acagttcaacacgcagaataggttgcgtcttgatgctgtgtggacgagggcatgccacggt acatcttaacctatccgggggtcggatagggcgaagtccagtattggactgggagtacagcctg ataggggtgttcagagacctctgataggctagtataaaaaactctgctgtacatggcac
557	Вирус классической лихорадки свиней	gtatacagaggttagttcattctcgtatgcatgattggacaataaaattcaatttggatcagggcc tcctccagcgcagggcgaactgggctagccatgccacagtaggactagcaaacggagggga ctagccgtagtggcgagctccctgggtggtctaagtcctgagtacaggacagtcgtcagtagttc gacgtgagcagaagcccacctcgtatgctatgtggacgagggcatgcccagacacaccta accctagcgggggtcgtaggggtgaaatcacaccacgtgatgggagtacgacctgatagggtg ctgcagagggcccactattaggctagtataaaaaatctctgctgtacatggcac
558	Изолят человеческог о pestivirus JD2B11	tcagggttgtaggtcgtaaatcccggtcaccttggtagccactataggtgggtcttaagagaag gftaagattcctcttgcctgcggcgagaccgcgacggtccacaggtgttggccctaccggt gggaataagggcccgcagtcaggctcgtcgttaaaccgagcccgtcaccacctgggcaaac gacgcccacgtacggtccacgtcgccttca
559	Изолят человеческог о pestivirus GBV-C-ZJ	cccggcactgggtgcaagccccagaaaccgacgcctatttaaacagacgttatgaaccggcgc cgaccggcgaccggccaaaagggtgggtgatgggtgatccagggttggtaggtcgtaaatc ccggtcatcttggtagccactataggtgggtcttaagggttgggtcaaggtccctctggccttgg gagaaagcgcacggtccacaggtgttggccctaccggtgtgaataagggcccgcagtcag gctcgtcgttaaaccgagcccattaccacctgggcaaacacgcccacgtacggtccacgtc gccctacaatgtctctcttgaccaataggcttgcggcgagttgacaaggaccagtgggggct gggcgacgggggtcgtataggaagaaaaatgccaccgcccctcaccgaaggttcttgggct acccggctgcagggccgcgaggctggggtagcccagaaccttcgggtgagggcgggt ggcattttcttctataccgatc
560	Изолят человеческог о pestivirus JD2B8C	tggtcaccttggtagccactataggtgggtcttaagagaaggftaagattcctcttgtgctcggg cgagaccgcgacggtccacaggtgttggccctaccggtgtgaataagggcccgcagtcagg ctcgtcgttaaaccgagcccattcccgctgggcaaacgacgcccacgtacggtccacgtcgc cctttaatgtctctcttgaccaataggctcatccggcgagttgacaaggaccagtgggggcccgg gggtcacagggatggacctgggcccctgcccttcccggcggggtggggaagcatggggcc accagctccgcgggcctgcagccgggtagcccaagaaccttcgggtgagggcgggtg gcattttcttctataccgatc
561	вирус гепатита А GB	gcccgggtggaagggcccgaaccgcccaccacctaactaggtggttaagggtagctctatcg gtccggctggcccgaaggcgggtgatcctgtgtgttagggttcgtaggtggtaaatcccagca caggtggtaatcgtatagggcaggcttatcccggtagccgttccctggatcctggagcgggt cgtggcggcacggtccacaggagtggggcctccggtgtgaataagccctcgtctggagcatca gacgttaactgagacgtcccgaagagatcggaacgacgcccacgtatggcaacgccgctta aaaccttcggggacagctatgcccgggtgacaatgccagtgggggccgggcccactattgtt

		gtgggctccgagttcctctagggatggccgaaaggcagccatggggccaccaggcggcgc cgtgctacaggcggcaaggggaaaaatccttcgggtgacccccgggtggcattccctcccttag cagcatgagtgtggtgtagctgcaacc
562	Обезьяний pegivirus	ggggaatctcaccctccggtccggaagaatcggaaaccgacacctgaccaatcattct tgatcatagagtggatgtagtgaagccagacgaaagccggcgatgggtggtgacagggtt ggtaggtcgtaaatcccgccaccctggtaccgggtataagtgggcggaagctgactgaagct ccgtgctctttctgtgcgttcttggtgcacgggtccacaggtgacgcctataccgggtgtaata ggccgactcgagcggagtcgtaaaactgagaacctccatacggatggcaactggcttgcgtac ggggacgcccgtaaagtacagtggttaagtccggcgggtgacaacccagcaaggcga gggggtcctattggtgactctgccagttccgggtggaggtaggcatgggtggccagctccg cggcgcgctacagccgggttagccaaaaatccgaaaggtgagggcgggcccacatgtccgaa attagtcaagc
563	Pegivirus I	agaatggtctaagtgggtgccaccgtggtccgaaaggggaggaggacctacgctgccagggtg gcaggtcgtaaatcccggtgtaggagatccctcctttagtagctgctgtagctggggggtc ggtgacccctgggcaaccgcaaacccggacgaccgggtggcgctccatgttgccaggt ccacaggtgtaacctaccgggtgtaataagggttggtggtgctccacctaaacgtagta tgattgggcttgtaaacaccgctcgtagtagcgaacccgctttaaagacacagtaggcg tagccggcgggtgacaatccatacgggggtgggtggtgcatggatctgtccaccacct tcatgcccctctaagcaagccataccggggggaggcgcggccaccgactgccgggca aggggaagaaccttcgggtgaccccccccaaccaccgtccgatcaatgtaattgtgcttta ggcgtgacaccggcaca
564	Pegivirus K	agaatggtgtgacccgtcggcctccagcggaaagcgggaggatctagtggttagggtggtc gcgtaaatccacactagtgtgtagctcgtataacgtgggagcagccggTggggtgacccc ccAcctggcggctgctgagcaccggacgaagcgcgggggtgaaacgtaaacccgcggccc gggctgccaacgtaggcacgtcttggtggaagacgtaaacacagggccccctcaacc tgatccgagccagagaccaaggtacccgcttttaaggcgttactcgtccaataggatctc tccggcgggtgtcaaaccttctggccctggtgatggttacgggaggggtggggcgggga gtagaagccccggcggcatgggggtaccaagctcggcacgccagcacgcgtggcgtagg ggaaaaatccttcgggtgacccctggtaccataaagtaattaacatgagcatgccgtaggggtg gcttttctccttcttgggaaggcgggtggcacc
565	Вирус, связанный с болезнью Тейлера	tgataccgtgtcccgtacgacctcgcgcgtcccaagctcgcctgaggggggagcgtaa ggcgcgtagtgggtagcccccaaccgagccaccctagtgagtactttagaatggttagg gagactaccgcttctgctgttggggacctaatgatccgctgccagggttcttcgggtaaatcc cggcgcggtgtttgggtcagggcagtaggggcagacgggcccagcagtcgctggttctggt accaccacctatccggacgacctccctcacgaaaggtcggcacggtctgtggtcgcagcagc

		cctataattcagtcaggaggcgagccctcgtaaacttagcaaggttcctcgccattgattg gcccaggggttaagtgaacgccccttttaatgtttaatagggttctttcccgggggttgacaa acactccctgggctcttcgtggcctcggtccttgatgcttcggcaccatgagcgcacaggg gggggaccctcgacagtcgccaagaggaaaatccttcgggtgacctcgtgcgaacccaa tcccttcttccacatggcgtgtctgtggtgcatgctgtg
566	Pegivirus грызунов	ggacttcggtccccctgtfactctgcgagccaccgcagagccaggggttggtacgcccaggtgt tagaccccgccgaaagctcctaaccatggggtagtaggacgtggtaaatgccactgagggg ttggagagctgtagagcgagtaagtcggcgtaaggcccgagtagggcctccagccggg tcagcctaaacctggctgtgatacccgggtgcatggagggcgtgtccaacgctcgtcgtgta gggtgggtccctgcagttgggtgtggctaccctgctcgtactgcttgatagagtcccgccggac ggaccagctctcgtcagtcggtggagttgcac
567	Человеческий pegivirus 2	aactgttgttgatgcaatgcgatattgctacttcggtacgcctaattggtagggcggccggac cggccccgcaagggcctagtaggacgtgtgacaatgcatgagggatcatgacactgggggtg agcggaggcagcaccgaagtcgggtgaactcgactcccagtcgaccacctggcttgctggt catggagggcatgcccacgggaacgctgatcgtgcaaagggatgggtccctgactggtgccc atgcgcccaccactccgtacagcctgatagggtggcggcggccccccagtgtagctcc gtggagcgcac
568	Вирус С GB/вирус гепатита G	ccccggcactgggtgcaagccccagaaaccgacgcctatctaagtagacgcaatgactcgg cgccgactcggcgaccggccaaaagggtggatgggtgatgacaggggttgtaggtcgtaa atcccggtcaccttgtagccactatagggtgggtcttaagagaagggttaagattccttctgctc cggcgagaccgacgacggtccacaggtgtggccctaccggtgggaataaggcccgacgt caggctcgtcgttaaacgagcccgttaccacctgggcaaacgacgcccacgtacggtccac gtcgccttcaatgtctctcttgaccaataggcgtagccggcgagttgacaaggaccagtgggg gccccgggcttgagaggggactccaagtcccgccttcccgggtgggcccgggaaatgc
569	Pegivirus 1 лошадей	agaatggggagttactcctggcactggcccgaagcatgaactgatcgcggtggcaggggttctt cgggtaaatcccggccgctgtgtgattgtgtagggcaggtgacagtcggcaggggtcgacc ccctgctcaggaccactgtctcctggacgaccgttgctgaaaaaggccgccacggtctgta gctcggcgacgcttcaattcaggccggaggaccacgctccgtaatcgagcccaagtactcaa ccccagcaccctgggtcacgcctacgcccctttaacgcttcggctaataagggtctatccg gccccgttgacaaaggcgaggggttacctggtactacgagcttggtgtccctgggagtaatcc caggggtgcc
570	Culex theileri flavivirus	atataaatcccagtttggtaaacctattcaaggcttaagttgtttattttatcggcctcgtgact ataaagttgcctagcggagagagataaagaagaaggagttcaaggctcagggcagggcgcaa gttccctggtccctaggccgctcgcaggaaggaggagtgaagaagaagaagagaaggaga ggaccaccgcccgaagaaggcaggtgcctcacaagagggccaaaccagcgtgttgaccagt

		ggccaacgccggacggcgtggtggcctgctgggacgcctggggattggatggagtgccctcc tacaggaagacatcgttcaagccatc
571	Вирус Bussuquara	agtatttctctgcgtgagaccattgcgacagttcgtaccggtgagtttgacttaacgcagtgaga aaagtttgcaggaaagacgagaagcgaattctctga
572	Вирус Zika	agttgttgatctgtgtgagtcagactgcgacagttcgtgagctgaagcgagagctaacaacagtat caacaggtttaattggatttgaaaacgagagtttctggtc
573	Вирус Yokose	agtaaatttgcgtgctagtcgctgagcgtcagaccgcaaagtgagttttagtgatctaaagtga ggagttattctactgtcatcaaacactacaataaacacgtgaaattttccggaagaacaact gtccggaatcaagacg
574	Вирус Wesselsbron	agtatattctgcgtgctaactcgttcgacgttagtccgtggagtgagcttctattagagtcgtaaacac gtttgaataatttctactgaaaggagtagaagaaaggagattcattcca
575	Нерасивирус лошадей	acctcgtgctatgcacgggtgcgttgcagcgttttgcgttgcagcgtacacgcgtcgtccaa cgcgaggaggattctccacattaccatgtgtcactccccctatggagggtccaccccgccaca cggaaataggftaacatacctatagtacgggtgagcgggtcctcctagggccccccggcag gtcgagggagctgaaattcgtgaatccgtgagtacacggaaatcgcggttgaacgtcatacgt gacctcggagccgaaattggcgctgcccacgaaggaaggcggggggcggtgttggggccg ccgccccctttatcccacgggtctgataggatgcttgcgagggcacctgccggtctcgtagaccat aggac
576	Нерасивирус B	accacaaacactccagtttgttacctccgctaggaatgctcctggagcaccccccctagcagg gcgtgggggatttcccctgcccgtctgcagaagggtggagccaaccaccttagtatgtaggcg gctgggactcatgacgctcgcgtgatgacaagcgaagcttgacttgatggccctgatgggc gttcatgggttcggtggtggtggcgtttaggcagcctccacgccaccacctcccagatagag cggcggcactgtaggaagaccggggaccggtcactaccaaggacgcagacctttttgagt atcacgcctccggaagtagtgggcaagcccacctatatgtgttgggatggttggggtagccat ccataccgtactgcctgatagggtccttgcgaggggatctgggagtctcgtagaccgtagcac
577	Нерасивирус I	cagggttgcacctggcccggatacctatgccttacgccgaaaggtaacgagtaggagtcg ggtccccaggcccttaccgccaccaagccagggtggggaggtatgggagccgggggggtgcag ctggtagctccatgggggacgccccgtgagcggatgctgcatcgataccgggttagctctctgg gagagcggcacttgacaccacgaatccgggaaccggacaatcgccggcgtgggacgcgttg cctccgtggccgagcaatttggcatcccgtggtgaagagtgatggtggggggggggccccct tccagtaccgtactgcctgatagggtcttgcctcaagcccagagagtcgaggctgaaaaccgcc atc
578	Нерасивирус J	gccgctcccgaaggagtcgggcgctcatccactccgaggagtggggtggcgtccccgt gtgccccgggaaccatgaagcctaagggcattccacattttagaatgaactgaagcttcttctgct

		ggccggaaagtctgggttccatggccagggttccgcaggtgggtaaatcccgggtggggttc catccaggatatacggcagggcggcgtagtccggcggttcggacgacgtgtgggtgcctac ggtggattgtcacaggatgggcactccggtgtgaataggccccgtcaggggtgcgctgacgta aactcaggccttgcctggtgttcggggaggattgcagggccacgccctctaagggccgctat ggcacagtacttctcggggcgggtgtcaaggccctccaacgcgacaccagtgcctcggcagg catggggccaccagctcggcgtcccgcacacagacggcgtaggggaaaatcagcaatgtg acccccgggtggcatttctctctacttccatgatgatcaaccgcaatc
579	Hepacivirus K	gggaacaatggtccgctccgcggaacgactctagccatgagtctagtagcagtgccgtgccacc attagcacaaaaaccactgactgagccacaccctcccggaatcctgagtagcaggacattcgtc cggacgacgcatgagcctccatgccgagaaaattgggtatacccacgggtaaggggtggcca cccagcgggaaatctggggcgtggtcactgactatggtacagcctgatagggtgctgccgagc gtcagtggatgctggctgttcatggaac
580	Icavirus	cgaagttaagctaagcaccctcgggcgttcccggattatgtgatcacatcaatttgatggctggt caccacgcaacgcctggagagatacttactttctttaagatccccggtcatttgacgcttga ggatgatagggtattttccactataaatacttccatacttggatgttctataccaagacgggag gacctaccccgtagccttagaggtgagatgccaagaacaggcccttctgttctctcgacaatg gcatcataggcaacaagcatcacaccaagattgctaagtttggtaagagtcttcaagctatagg gtggctgtagcgaccttctgatgcctcgggattccccacggagcgtaccgtgccacagggggcc aaaagccacggctaacgcccatcaggagcggcacttaccctgccccacccttgaacttga atgttcacactggcttctcggcttctgaaactgtctgcttggggccccgaaggatgccctgg aggtacccattttatgggatctgaccaggggacacctcagctcttaagttgctggtgttataaa aacgtctaaggggccccacccttaggtggagggatccaccttcttttttttaaaactctttat ggtcacaattgttt
581	Вирус Antarctic penguin A	ctaggagactacgcagtgggataagatgactatgatgtcgtacgggcagaagccagtacagtc gaagtcgagaccgacgtcgaggattgactctgcctgacctagtgccatc
582	Arterivirus лесных сумчатых белохвостых крыс	tattggatccgcctccgggcaaagggtactttctgtacctcggcttagccacagggtgaccctt gtacgtagggggccccgacgtagcactggtctgacaacaccttctcggcattcaccttctccccg ctcttccggcggtggtgtcaagaagcagcagtgctcttcttcttctcagttcaccgagcc ctacgggggtaggtg
583	Avisivirus Pf- CHK1	cattcccccttcccagccatgggftaaatggcccctaccaggttcgggtgctgtctaggcttcca gtaaagaagtcaaccgagcattgaacaaaacctcagtggggtatggtagttaaccccgctcactg gacaactttgtcctttaaagtggatcaatccacccaactccccctagccacctgagccat gggtggatagcagtgacgaaactagggaccccaatacctctagtccaagagaattccccctc

		gcgagaggtgctcttgggcccgaaggctagttggcagggtgaagtgaaggaaagctgctagc gtggcaaccttaagcgtagcccgaagctgaccttagaggtaaacctagttggacctggtatga agctgtggaggtggtggataggaaagttggccacttgtgagtagatgccagaaggcataagg ctgatctggggccagtgaactataccgttccggtaaacctggtataaaaacatgaaagcaagt ggtttaaatttcttctaattccttcatttcagtagtgataactggcaga
584	Птичий paramyxoviru s penguin	accaacaaggactagataaccacgtgaccgttaactggaaaataagatggttagggcgca cctagttggaattcgaccccggtccgaaacctctaatttggttattggcagtctagtctactcta acg
585	вирус нюкаслской болезни	accaaacagagaatctgtgaggtacgataaaaggcgaagaagcaatcgatcgtagggta gaaggtggaaccccgagcgcgaggccgaagctcgaacctgagggaaaccttctaccgat
586	Нр- betacoronavir us летчих мышей	ttaagcttcggcttgtgcataggaccgaaaggtactatctaccctaactctttagtagactctc taaacgaactttaaactggttgtgccttcagtagtctgtatggccattggaggcacaccggaat tatcaaaactaagaagattcatagtacatccttcttagcttttggtggcagtgacacctacggttc gtccgtgtcgtcacaattatccacacagtaggttctcgcgtgtggttgagttgctagtccgttg ctgttctcagccatctacaactcgacacc
587	Basella alba endornavirus	ggaatatggctaatecggttatttctaatacaaacgcaaaagacttatgacacagaccggacctgaa cgaggtgataaaacacctcgttcaggttcaaacgtagaagattcctcctccgattagaaataca actacgtctaagcacgatagatggtatcaagatcggtttagaccacgagaaaatcggcaaat gaaagtacaagttgggtggtttaaattaccaagaacagtaacattcaagaacaacggcaacccg ttgttacctcattcgtaaattgttagaagtaacaagataaattttaatggtgggaagaacctta agtacagtaccagcagaagtagtgaatgacagaaatgtttatgttcatgtccacgctagaggg ccaattgtcaatccaagatcgagatcmetaataatcaataagtctatatacatgatagaggtta
588	Nidovirus шаровидного питона	cccctcaccataggcactaggagaacaggataaccctaaccgggcatcctgcctgtgacct ttcagattcgctagttagatatctcacagactctgctaggctctgaccagtcctccaaagtc cgftaccgcccagtagcgttaggcgcgaaaggacgggaagtacctccagtaagcgaagc tgaagtaagggaaatacggcaagactaactttagtcttacagtggtgataacctggtagttatc ccgacaagagacctgactcgatgtgaaaacatccaactaggttggcttcaactagctacagg caggatatccccaacggggcctccaaggaatcgagaaccaacctcattccacgtctgtagta agcaaaaacagggcgatcttcaccgacacctctcaccacagagcacaccaacctctgtgaag ccaatttctcgtccaaggacaggtattgagggtcaacttcttccgaccagaagaaggatttc ctaccaaaagaaaaaccaatccaccaacaccacaaggtaaaacaacaactgtgaagccaat acttagtcaaaagactaactattgagggtcaacttcttcaatagagaagggatttctggtaaaa caaataacaacaactaacatcagcaact
589	sapelovirus	gacaggtgttttgaggggcggatgacgatattctggctggccaccaggggaataacggcaatgt

	летчих мышей	ctgatcatacggttcacaagtctaccggcgatagtggttcaacacccatgtgtagcagggattcttg cgtatgtgaaggcgacagtgc
590	Picornavirus 3 летчих мышей	taagcggaaagcattctgtccccggtcagtaacctataggctgtcccacggctgaaagggtg aacatccgftaccgcctcagtaactcgagaaacctagtagcctgatgattccaattggatgat ccggtcaaccccagaccagaaactgtggatgggggtcaccattcctagtaggcaacatacag gtgtccccgcgtgtgtcacaggcccttacgggtgccatttcggatgagtctggccgaagagtcta ttgagctactgttgatacctccggccccctgaatgaggtaatctcaaccccggagccactgggt ggggaaccaaccacttgggtgtcgaatgagcaattctgggacggaaccgactactttgggggtg ccgtgtttctttgtcatataaactgtttatggtcacaacacaacttggtagatttggattattcac tgctcacttgtcacagtaataatacacaatcatc
591	Picornavirus 2 летчих мышей	gggttttacgaaaccgatacaccagaccttttctcccctccccctccactaccttttccccctct ttggaccgaaacaaggacacgtaagtggaaacgcgattttatgtggttggccaccacggaat aacggcaattgtctacatgtgggaagtgcaacctccctagccgataacccctgaccgggtgtgt aggataggaaaggtgccactgtgggacaggttatggtagagtgatacctagccagggg caatgggactgctttcatatccctaatgaagtattgagatttctctgctcattaccgggtgatgggt gtgtggggggggccccatacactagatccatactgcctgatagggtcgcggctggccgaccat aacctgtatagtcagttgaattcagccaag
592	Picornavirus 1 летчих мышей	gaaaccgatacaccggaccttttctcccctccctctccactaccttttccccctcttcggcatga aacaaggattattcaagtggaaacgcgatttaatatgaggctggccaccgcggaataacggcaa ttgtgtatctgctggaagccaagcctgcctagccgatagcccttgaccgggtgtgtaggatagcc caggaaccagcaatacgcgacaggttatggtagagtagatacctagccaggggcaatgggact gcattgcatatccctaatgaaccattgagatttctctggtcattaccgggtgatggttactagaggg gggcctctagtagatctatactgcctgatagggtcgcggctggccgaccatgacctgtatag tcagttgatttgagcaat
593	Flavirus летчих мышей	acgaatcgggtatacgttcggtacctattgtgcaagttcgtccctattttcgattgcctgcccga tttgactcaaacaattgtgacatactatgtctctgtttgaaagcactacagagtttgcgccagcat gtatgtttcaagtctttgtataagtctgcctctatagtggtttctttgacctaaagccttgcacc atcctatatgctgcatcgagacttgatgcaatctgcctctactacgcaaatgtctagtaattagttat aaggtttactattttccctcattccaatttagttgtagtgtatgtgagtatcattctactccgactgt taagagaaccaatttatagtcgttaaatatgataaatggaatgaatgatgggtgcattttaaaaca ctttctctataggcgtgaagcattctcgtcttagagtcgtaaagaagaatgccgtgtctatcagt atgttatgcgattttttctgccacgccttctagtgaatctagttgacatacagacattgcctacc actcgcgaggggtcaccggtagtgaaggagtaagtgatgattccgcttattctgtaccctttgc ctggtgaggacagatcctgactaattttaaataataatgaacactagctccaag
594	Dicibavirus	gtatagcaccggaatggattttactactccaagtatacgtactaggagttaaaccctgaatttaca

	летчих мышей	ggggatttagtgacttttatccgtaaaaagtcgattggacgtaaatcggtaacgaggccaagtaccg tgaaccaatttaaaaacgtattttctcatgtggtagaaccaactggaaatagcatggcatataggtt gttaggg
595	Betacoronavir us HKU24	gataaagtgtgaatcgcttccgtagcatcgaccctcgatctcttggtagatctaataatctaaac ttataaaaacactaggtccctgctagcctatgcctgaggggttaggcgtgcatactagtgtcttag gaattgactgataaaccttccctgctaacggcggttgactctcagtctaagcctcccaccata ggaggtatc
596	Betacoronavir us England 1	atftaagtgaatagcttgctatctcacttcccctcgttcttgcagaactttgattttaacgaactta aataaaagccctgttfttagcgtattgtgcacttctctggggattgtggcattaattgctgct catctaggcagtgacatagctcaacactgggtataattctaattgaatactattttcagttagag cgctggtctctgtacgtctcggtcacaatacacggtttcgctcgggtgctggcaattcggggca catc
597	Boone cardiovirus 1	tacgatcgtgtacattccactactgccaattagctccccctcccgttgcctcccctctataaggag agccttctcttgc aaagggtgaagccttcccccggtcgaagccgcttggataagacaggggtt atfttctctctctcggcgcttgcctcttaagctgaatagggtctatctattcaggcggatggctt ggccttctcttcttggacagagtgtatctgggtttccggatctcgaccacacactaccaga gctcaggagtgattaagtcaaggcccgatctcggcgaaaaggaaatgaagtattttgcagctg tagcgacctctcaaggccagcggattccccacctggtagcaggtgcctctggggccaaaagc cacgtgtaatagcaccttgagagcgggtgtaaccaccacctgcaattatggatttgactta gtaactaaaagattgacttggcatacctcaacctgagcggcggttaaggatgcctgaaggtag ccgtgtgaaatcgcttcggcgaccatggatctgatcaggggcccctgcctggagtggttctatcc cacacagcgtagggttaaaaacgtctaaccgccccacaagacccccggcagggatgccggt ttccttttaccattcttgacact
598	Вирус Breda	atcacctagtaacttacaagcgggtcaaacccctccggaacgggtcataacccccctcccgaacg tgcgcttgacgtgactggctttcagtctagctttctgagaaactccgggggtgtaaccaccatt ttgaccttggcagtttgtaacactccaaccaaacagcatctgaccacctccagcttctgca ggcatttggacCaacggggtcagatattctgtggctaaaccttgaccacctccagttactg caggccttttgactaaacgggtAcagactcttgggttagtttaactaccactgtttagccg ccaacctgattttattgtacaaaatttggtttacacattatttcttacgggtggcagttgtttggtt gtttgcacagttttgctgataccaattttactgtcttttgggttttcggctaaggctgttttcacat acttagttgcttgaagtaaccttcacaacatctgttttgggttctaaggtaagagtttcagg aaaaacataggcggccatctgtgggtctagtttaattaatctggcaacaagatcaagtcac cgactccccttggagtgagacttacgagtaccaattcgcctattttggccatcatataaaa
599	Вирус вирусной	gtatacgcccagtagttcaggtggacgtgtacgattgggtatcccaattaataatttggtttagg gactaaatcccctggcgaaggccgaaacaggttaaccataccttttagtaggacgagcataatgg

	диареи Крупного рогатого скота 3	gggactagtgggtggcagtgagctccctggatcaccgaagccccgagtacggggtagtctgcaa tggttcgacgcatcaaggaatgcctcgagatgccatgtggacgagggcgtgccacgggtgat cttaaccagggcggggccgcttgggtgaaatagggttgtatacaagccttgggagtacagc ctgatagggtgttcagagacctgctacaccactagtataaaaactctgctgtacatggcac
600	Вирус ринита Крупного рогатого скота А	tttgcggctctgccgcttcgggtttacctgtttcacagagcaaacaggacctctagtttcgt gcttaaacgagatcatgctcgaactagaactataacgctggctactggaccggtgccgcgcttg cggatcttgcgggaatgggtggctagtgggctgtggaagtactctaaccacacgcccctcaag tgtgggaaaacacgaactgggtgtagcgacgacgataggccttgggacacctctccagtgatg gagaccaaggggcaaaagccacgccttgtccctgtcgttcacaaccccagtgcagttcgt gccagtacctgctttgggaagtgtgctttggacagctgaaaacagtcctagtgggagactaagg atgccagggaggtacccggaggtacaagtgacactctggatctgacttggggagagcgggtc tgctttacagacgccactcttaaaaaacttctatgtctcgtcaggcaccggaggccggcctttc cttaaaacaatacacttt
601	Picornavirus крупного рогатого скота изолят ТСН6	ttgatctgagcaggggcccccttgggttgctttacaactcaactgggggttaaaaaacgtctaa cccgacacgccagagggatctggttcttttttactcaccactggatgcagattgacgat aaacgttgttgttactattgacttgatctgcttctacgggttactttactgttatacttctgcttt gttgggttctactgtactttgtctccttctacattcaca
602	nidovirus Крупного рогатого скота ТСН5	caccaatagattagcaagctgtctataggcataaactaacccccacccattacccggggcc aggtgggcccgcgcttcgggcaaacctgctgctgtgataatcaagggtcacagccagattc actgccggttagctagtggggcggtagcctggcaaacccgaagaggttgaaagggacttc agggtagtattatcctaggctagcgtagctacagttcgggtcaagataaccgtcctggtgctagggt agtagagacagtggtaactggacaagggtccagggccactttagggaataacctacggaagg ctaggtccgtaaggaagacccccgagttgtccgcggttagcagagctcctgcgtagacaaa aggcaaaaagtgattacattgcctgcaggaaaaggcaaacgtcgttggagtcggagctaaa gtactggacgattgataccacgctgctgcggtagataaa
603	hepacivirus Крупного рогатого скота	ccatcgacactccaggctcacggattaagttaggttccgccgaagcgggctaaccaggccct agtaggagggcctatcccgtgagcccttccccacggattgagtgagctggagctgggaag gaccgagtacggccaatcgagaagaacctgatgaacattccaggcctctcggtagattgg atatatccaccagtgaaggcggggctgtgggtacaggccccctagtccacacagcctgatagg gtcctgccgaggatccgtgggtgctgctgtacatgtacc
604	Botrytis cinerea mitovirus 4 RdRp	gccccgccaccttctatttctaaataggaagggtcccactagtccgataattcggttaac gaattatggttagatctattaaaggtfaaatagattgaattcttctcctccttattctatacttg ggagtaaatgacaaatgtctatctcaaacggaaatggcttaagtatgaattgaaagaaagg aggtttaagaatataaggcatcaatatattatacccttgaatgtaagtaccacggcgtgacgat

		tagggctatcttaggatagacagccatctaacgcgacagcagtggaatcagcttagcatctcaagatcatgtataatatacataaccttacaattataaaaccaaacaaaacacactataatttatataaattatagaagtatcggacctggacggtacactactattaactgatagtagccaaatgcaggaagctc
605	Botrytis cinerea mitovirus 2 RdRp	ggaactttcagttccagaagtggctttattaagccttcaaagttacacttgaacctgcgattaatccccatagtgactcttggtactgtgaattaggaatagttgtagttcaacttctaatgaggtgaacaatataataactcatcttattaacccatacgtagacaattgtccaagagacagttggaattctgccaactggaatgtttgtagcgcgtagaagataataagagaccctctattcccctgacctatgactaagctatggcccggggtgtaatagagatacttttatattataacaatc
606	Собачий picodisticrovirus штамм 209	cgctctttatacaaatctgtcaaccctttgtataactctaagccgaacaattatagctaggcttttattataaacattaattaggcattagcgttgcgccaatctcttgtaatcctaaggatacctttcctgtgactaagatgaagcgccttcggttaccgatgcccggtgtccacgaagccatcgtggtcggccgctgccccacctctcccaacttgactccatgttttcagtaggtgtaatgattagattattgattctgctcgttcaatgtgtttatcttcacgatctgggacccaacacatgcttactcatgtttaatgttggtccctcattttgaagacacccaaccatagatgtagcagaatgaggatttctactccattctgtaacagaaatgaattcctgcgtgtctcgtaaatggaatctttaagaactcagataaatcgaacaatatactaatacaagttgtttctaccaacatgttcaatgcggctaactgaccgtggagctgtgaagcgcctcaaacccgagtggtgtatagctgtaatgcgtaagtccatgaggaaccgactactgttacctctgttggtgtgtttctcctttCCtctctttattattattgttattgcaataactacaactttgatcaac
607	Вирус собачьей чумы	accagacaaagttggctaaggatagttaaattattgaatattttataaaaacttagggccaatgatctaccttaaagaacaaggctagggtcagacctaccaat
608	Собачий kobuvirus	tttaagtgttgcccaatctctgactcctgctggaaccaccgaccagtagtgccaaaatgccagggtgaaaatcctcccctcccctctgggcttcatgcccgccatcctccccagcctgacgtgccacaggctgtgcaaagaccccgcgaaagctgcaaaaaggcaattgtgggtccccctttgtcaaggcgtcagcttttctcccctaaggctagctcctgtcagtgaaactctgtcgggcaactagtgacgcactgcatgcctccgacctcggccgaggagtctgcccccaagtcagctcccctgaccacaagttgtgctgtctggcaaacattgtctgtgagaatgttccgctgtggctgccaagcctggtaacaggctgccccagtgctgtaattctcatccagactcggctctggcaactgctgttaagacatggcgtaagggcgctgtccaacgcctggaacgagtgctcactctaataccccgaggaatgtacgcaggtaccctggctcggcaggatctgagcgtaggctaattgtctaagggtattttcattcccaccctcttcttctgttcata
609	Верблюжий alphacoronavirus	cttaagtgtcttatctatctatagatagaaaagtcgcttttttagactttgtgtctactcttcaactaaacgaaattttgtctacggccggcatctctgatctggagtcgtggcgtaattgaaatttcattgggttgcaacagtttgaaataagtgctgtgcgtcctagctaaagggttctgtgtctgtcacgggattcca

		ttctacaacgccttactcgaggttctgtctcgtgtttgtgtggaagcaaagtctgtctttgtgaaa ccagtaactgttcta
610	Cripavirus	gcaaaatcggtagtagcttaaacgtacgaccaccgatgagactgaaatgacactagttgagatta tttcaatatcctagtggtataaagtcaatatttgggtgatcgttcgtaatcgatggcgctgacag ccggaaagacggcaataaaaaaccaagatttagtttaagtttgattgaattgcaaaagctat cttgaatagacaatcaaaatattaagtaaagcaaaagcttctaagaagacaatattaattagtta gtaaccaaacctcatcgtgccctaagggttaaccggttacgtaaaagcgtagaggtattaaggt cactgcgagacctaataatccgcaattttatgtttgtaatttttagttatagacttagatgtaactat aagagttataaatactgtttcaagatttatagacaagatctgatcctatggatttagataacctca tgtagtgatagtggtgtacatctaaacgcataaggctctatttcatttaaaagtaggactat gtattacggcgcacctaaccgtaacgtagtcaagaccggagaatctcggaatgaatttagtaat tccaaattata
611	Человеческий coxsackievirus A2	accttgtgcgctgtttatatccccaccccagtaaacgttagaagttacgcaaccccgatcaat agtaggtgtagcactccagctgcatcgagatcaagcacttctgtctccccggaccgagatcaat agactgctaacgcggtgaaggagaaaacgttcgttaccggccaattactcgagaagcccag tagtgccgtgaaagttcggagtgttcgtcagcacttccccgttagatcaggctgatgagtc accgcatccccacaggtgactgtggcgtggctgcgttggcggcctgcctatggggcaacc ataggacgctctaatacagacatggtgcgaagagcctattgagctaattgtagtctccggccc ctgaatgcggctaactcaactcggagcacatgccctcaaacagggggtggtgtcgtaac gggtaactctgcagcggaaaccgactacttgggtgtccgtgtttcttttattctataatggctgctt atggtgacaattaaagaattgtaccatatagctattggattggccatccggtgactaacaatcgc tcataaccagtttgggtttgtcccttatcacatacagctcataaacacctcttatattactacaa ttgaatagcaagaa
612	Coronavirus AcCoV-JC34	agaacaagtagtgtttaaaaacctcaaatagtgctgtaacatcttgcaatgaaagtagcgc tactagcctctatgcaaagaatgtaaaagaatacgaagcattaaagaatacaatctatctag gataggtacaattctctcccccttctgacttcggtcaactcaactcaactaaacgaaatccccctt gcatggtccgaccctgtaaggtgtgtatttcgtgcagtcgttcccttactagttaagcgtaa cggcatctaggttgcacgtctggaggaaacgggtgttacgtttctagtgtttacgccgatcggg tccggcccgataggtattgcattagacgtcctgggtggttctgcctgcccttgtgtgattcggctgt tccgtcagtttggcacctcacacgtcctaagac
613	Куриный picornavirus 3	gggtatggtggttaaccccgctcactgggcatctttgccctctcagaagtggatcaatccacccc aactccccctggttacctgagccacagtggactccggtgacgaagctagggacccaatac ctcaagtccaagagagtccccctcgcgagaggtgctcttggcccaaaaggctagttggc agagtgaagtgaaggaagctgtaacgtggtgaccttaagcgtaatcgaagctgaccttgag gttaaccctagtgaccactggaggaatctgtggaggtggtggttaggaaagttggccactgtg

		agtagatgccagaaggcataaggctgatctggggccagtgactataaccgtccggtaaacctg gtataaaaaccatgaaagcaagtgggtgaaatctcttttaccctcattcagcagttgatattgg caaa
614	Куриный picornavirus 1	gtggccgacttgagaacttctaccgaaccaccctcaccataactcctccctctacac ctccgctatggtggttaccactgctttattgccttgactgagaatggccacccctcgacacctgc cccctactgccccaccgcaacctttgcttgccactcgggttgagaggcatgggggccccg ttcataccccagtcagttggtgacctccccctcccgtccggtagatggtccagagggtttg ccgacgacctctatgatgcttgcttcttccctcagcgcgagcatgcaactgtcgagccca cggaaacacagcctagctttgcttctcaccctgcgtaccctgggcgcttcgctcgagattc gctttgtcgacacctggcgctccccaccgctacgtgatttactcgtggcatacaccgcctg gcgttcagtacattccactgcctaattgggtggcctccctcaatctccgcacccccattgcgc acgtcatcaccgcccgcgtaacgcgatccggcggttctcactggcactgtcccctcgtccg ccgggttccactcatggttgctttcacttattctggttactggtgtccatcctactcatgatggt cgccatgacatgac
615	Куриный orivirus 1	aaacctcacgagtctgtggttaggtcccaggccaatattcttcgtaaggcttggtccaattttc caccactcgtgttgggttctggcctatggtaccagagggcggttgggggaattaactcccc ctcccctgtggtcctataaccacccacacctctgtgggctttcttactatcttctgtttccgacttt aaactagggcaggcgcgctagtacatacaccgcccggctggtctttccagctcttgtggcggg tgcgcgctggtccatcgtgccagcgacatagcaccttggtgacacctccgaacgacctccct gtatggggtggtgccaggggttccagtgtggtgacacactccctggggcccgaaggctagt gtgcaacaggtgaggtacagccagctgccccgtggctggagggaaccaagcttgtgaagcac acctcaccttctgggggtgggctagtaagtgtgaaagcatagtgctcgtgctggtgccaaca cttgggtcaagtccagccactcagtagtagatgccaggaggtaccctagtggatctgactt ggggcctgttacttaatgcagggttaaaaactatgaaagctgagtagttagcccggctggtggct tctcttcttattcattctat
616	Куриный gallivirus 1	ggttaactgtttaaccaaggcttccgtgcagggttcacggttaggagttcatgttgattcatgctc caatgccccaaaactttgtgtttgtttatgtctttcccaaagttcccccaagggttcggtactcaaa ccttaattcctagtcccacttttggccttagtatctaggaaatgtaccctgccttgacgaacgta agaaagctgtctttattgaacggttctaataactaagtataactggctcgcgccacctggtgtgt gccgttgaattccccatggtaacatggtccaacgggcccgaaggctaggggcaatcggt cctccaaggaaggggttccccccgacctgaacaggattgatgaagctcacctcccaggctc ctaaccacaaggaagttacttataagtaattagtagtaattgctggcaatcttgctagtag tcaggaacggtatgaccaaagtagtagacccccagaaggatcccaattatgggatctgatctg ggcctcactatgtgtctccccacatatagggttaaacatgaaagttggtccaaaatattcttt tcttttacttttcttagtggtgacgccattatcagcagttgtg

617	куриный calicivirus	<p>ggtgcatcatcactgaacaccctcgggcagagatgcaagggggaagtcactcctgccccctg gcaacatgcaggtgcccgatccaagcttagttctgacttcctctcctgggtggtgcaaacctcc aagggtgatgaacaaacctggagggacctctgggcaacctggtctctcagggatctccggcgc atctccacagactacctcatgctcccgaacctgagaagaacctgatgcctatgatggctggct gatggtcggcgagatgftgacctttgccggtctcattggctgggagg</p>
618	picornavirus карпа 1	<p>agctacaggaaagagagagataatcacagcacataaatacaactacagaagagagcctttcct gagcactatttacagcaaaccacgctgggaaaagtggtagcatgaccacttacgggtacttag tataaggatttaatatcttcgattctttattttcttctaactaagttcgcccgactttatccgtgttta tttagtttaagcaaaattgagtaactaagttttaacctgccaaatggtgagaagtaactctgtgaa aataccattgtgcatgaaattgcttgaaaactcttaggctttgggggggtcccactgctgtttgga ggactattgacagactctattgtagttgagtagtgactaatgataacgatttgcgtattacgcaatg ggctgtacccgtagatttagtatgccggggggaggggtcccactggattgactatgtaacctg acagggcgctgcccagcactacaatgaggataagatcggtgtttttatt</p>
619	Picornavirus сокола	<p>cgcttggaaataagttgagaggaattatgcatgctagttgtgtttgttacaactaattgttctaacca agtgaagctcttcgcttggggcggcacgacacttgcgtaattctctaccgtccctccacacctt gtggatgaagggccggatgtgtggcctctggctaaccctctctctgggggtgatgctactggatg tttactcctagaccaaatacacatgaactcctcttgatccacttcggtggggctatgagcctgcgga ttaatagctggcgacagctaccccaggggcaaaagccacggtgtagcagcacctcatagt ctgatgcccagggtgatgtgggagctagtagtgtgtctggcctatgttaggactctggc caagcgcagaggagtggggctgaaggatgccagaaggtaccgtaggtaaccttaagagac tatggatctgatctggggccccctcacgtggcttaccacgtgttgggggttaaaaaacgtctagg ccccaccagcccagggagtgggctttcccttaaaaagcccaacaatatattatggtgacaattca ctgtttctcttgcaattttgtattcttgactccttattttgttctgattttagtgacattcagatt caaatacaaa</p>
620	Вирус ринита лошадей В 1	<p>cgacaggcacaggtcgcctccgagttctagtagtgggaactgttactactgatgaaacgaggt agtgacactcagtaacctcgaacgaggtcgggcccctccttctcctcaccacactttcactttt cgtccactttagcaggggtcttcttctatccccctggcggcattggaactagccgtcgcgtctta acgcgcagccctgaaggccccacaccttgatcttgcctgggtatgtttctggcatgtgtttc tcaagcctgcaaccgaagccgaacagccacatgaacagtttagcgtggtagcgtgtgtgag ttggcgggtgatccccctcgtgtaacacgagccccgtggcaaaagcccaggtttacagca cctctcacatccaggacgacccatcctggcgctcactcttagtagtatggcttagtacgcattag gtgtaagccgagctctcctcggcctgttctgaatgcacacatgtctaggggctaaggatgtc ctacaggtacccgcagtaaccttcagagagtgcggatctgagtaggagaccgtggtgactg ctttacagatgcagcccgtttaaaaagcgtctatgccctacagggtagcgggtgggcccgcgc ctttcttttaaaactactgttct</p>

621	Вирус ринита лошадей А	<p>aagggttactgctcgtaatgagagacatgacattttgccaagatttctggcaattgtcacggga gagaggagcccgttctcgggcacttttctcaacaatgttggcgcgctcggcgcgcccc cttttcagccccctgtcattgactggtcgaaggcgctcgaataagactggctgttgctggcttt ctattgtttcaggcttttagcgcgcccttgcgcccggggccgtcaagcccgtgtgctgtacagcac caggtaacccggacagcggcttgcctggattttcccgggtccattgctctggatgggtgcaccaagc tggcagatgctggagtgaaccttacgaagcgacacacctgtggtagcgtgcccagaagggag cggagctccccgcccgcgaggcggctcctctctggccaaaagcccagcgttaatagcgccttct gggatgcaggaacccacctgccaggtgtgaagtggactaagtggatctcaatttggcctgtt ctgaactacacctactactgctgtgaagaatgtcctgaaggcaagctggttacagccctgatcag gagccccgctcgtgactctcgatcgacgcgggggtcaaaaactgtctaagcagcagcagaaac gcccggagcgtttcttttctcattgtttc</p>
622	Вирус артериита лошадей	<p>gctcgaagtgtgtatggtgccatatacggctcaccacatatacactgcaagaattactattctgt gggcccctctcggtaaactctagagggctttcctctcgttattgcgagattcgtcgttagataacgg caagttccctttctactatcctattttcatctgtggcttgacgggtcactgccatcgtcgtcgatctc tatcaactacccttgcgact</p>
623	Enterovirus sp. изолят CPML	<p>actctggtatcacggtaacctttgcacgcctattttatacccctccccatcgtaacttagaagcaaca aacaactgccaatagcagcacaacaccagttgtgttaggggcaagcacttctgtttccccg gaagggtctgacggatgctgtaccacggcagaagtatgacctaccgtaaccggccatgtac ttcgagaagcctagtagcattatgaaggtgattgatgttacgctccccagcaacccagctggta gttctggctgatgagctcggcattccccacggcgaccgtggccgaggctgctgttggcggcc agcctacaccatacgggtgtaggacgtcaagatactgacatgggtgtgaagagcctattgagctac gtggtagctctcggccccctgaatgcggctaactcctaactccggagcatccgccagtaagccca ctggaagggtgtcgtaatgcgaaagtctggagcggaccgactactttgggtgtccgtgtttcct gttttactattgtttggctgcttatggtgacaacttatagttatcataagctacttggctttgcca ccggagaattatttgggtatttgggttcataaacctacagtcgtatttctgtcttattaattgttctc aaaattaacaaca</p>
624	Enterovirus AN12	<p>taccgctgcaccagtgagctggtagctagctaccttcgcacggagtagatggcatccccacc cgtaacttagaagcaaaagtacacatctggccaatagtggcgtgcatccagccgcgcaacgggt caagcacttctgtttccccgggtccgcaagggtcgttatccgccagtcactacggaagcctac taaccattgaagctatcgagaggttgcgctcggccacgacccgggtgtagctctgagtgatgg ggctcgcgaacacccccgtgtaaacacggatgcttcccgcgctgactcgggttcagcctat tggtgttcacctcaacatagtgtaaatggccaagagcctactgtgctggattggtttctccgga gccgtgaatgctgctaataccaacctccgagcgtgtgcgcacaatccagttgtctacgtcgtaa cgcgtaagttggaggcggaaacagactacttccgtactccgtgtttctttttttgaatttat ggtgacaattgctgagatttgcgaattagcagctctaccgctgaacattgcctgtactacctaac</p>

		gcatttcacaaaacctcagagataccaagctcttacattgatctgcttgtttcctgaatctcaaat aaattggaacaagcaaa
625	Morbillivirus дельфинов	accagacaaagctggctaggggtagaataacagataatgataaattatcatacttaggattaatga tcctatcaattggcacaggattggataaagggtcacagtc
626	Вирус Dianke	tgtttcaaccataatactactactacaagtataaaaccccgctctgtcggagacgctaaactc tgaccaccaatctagccacatcagttgcttaagaacctcttgagacactctcccacttaacatcttt taggaatcttcgatgctacaacaactggctagtgaacaataaatccgtacaattcacagttgtaag aggccataggtccagacttgaaggtttgtttctattgtacaataacttagattaacagaggctatt taatagtgtcatcacgttaacagagtaacctgtgcaatagtatgagcttgtgtaaacgtcttga tacgacacc
627	Guereza hepacivirus	cactcaatactactcgcatttggggagaagcgtggcgttcgcggaaccgcttaaccata cgcgtagtacgagtgcgacagaccccggtgctactggtgtagcggagacacgagccgaagtc tgtggggggaactccacttagagggcatgcccggcgtaggcttctgagttgggatgggcccc aacttggcccctgagtgggggggtgttacgacctgatagggtgcccggctggcgcctaccacttt ccagtcgtacatgagtc
628	Grapevine associated navirus-1	gccccggggggtgcagtcctgtgaaagggtctgcaccatactatataatgtatatgattacatccaa aaggcgacttcgttcaggtttaaatctgacgtaggtccagtaataagcatgtcaaaacatgtaa gtttatcctgtaatctactctcataagatgagataagatgatattgcagttcccatgtaataaatcca ttatgaattcattcatataaggtagaagtggtaactatggtgaaacattaataaaacggctatcttt gcatgaacgtcattaaggaactggcataccaatgtctatttagtactatgatatttagagtatccct tatattaattaacaattatccttttagcatatcatccgacaacaaatttaaaagaagaatattactc attaataaa
629	Torovirus коз	gtacttacaagcgggttaaaccgcccctccggaacgggtacaacccccctccgaacgtgcgcttg acgtgactggttctcagctctggctttctgagaaatactccagggtgtatcccaccatcttgacctct ggtcattttggtaacaccataaccaacaactctacacacctaaccacctccagcttgctgcag gccttttgactaaacgggttaggtgttttgtagcaactcgtctaccacctccagtttactgca ggccttttgactaaacggCtttagacttttggttagtttaactaccactgtttagccgcaa cctgattttcattgtgtaaaatgtgtttatacactatcttcatagcggttggcagtttgtttggtgtttg cacagttttgtgataccaatcttactgtgcttttagtgtattctgctaaggctgtattttacatacttag tttggtgaagcaatcttacaacatttatattgttttgatttctaaggtaaagagcttaggaaacacc atagacgccattctgtggtgtctagtccaactaatctggcaacaagtagcaagtcattgactca ctttggagtgagacttacgagtaccaatcttgcctatttcggacatccatataag
630	изолят вируса Ящера О	acaagcttgacaccgctgtcccggcgtaaagggaagtaaccacaagcttacaaccgctac cccgggttaatgggatgtaaccacaagatacacttcaccgggaagtaaacggcaaatccac acagttttgcccgttttcatgagaacgggacgtctgcgcacgaaacgcgccgctgagga

		ggacttgtaacaacacgatctaaacagggttccccactgacataaccgtgcaatttgaaactcc gcctggctcttccagggtctagaggggtaaacactttgtactgtgcttgactccacgctcggctcactg gcgagtgttagtaacagcactgggtgcttctagcggagcatgggtggccgtgggaactcctcctt ggtaacaaggaccacggggccgaaagccacgtctgacggaccaccatgtgtgcaacc cagcacggcaactttctgtgaaactcactctaaggtgacactgatactggattcaagtactggtg acaggctaaggatgcccttcagggtacccgaggtaacacgcgacactcgggatctgagaagg ggactggggcttctgtaaaagcgcccagtttaaaaagcttctatgcctggataggtgaccggag gccggcgcctttccattataactactgacttt
631	Вирус инфекционно го перитонита кошек	acttttaaagtaaagtgagtgtagcgtggctataactcttctttactttaactagccttgctagattt gtcttcggacaccaactcgaactaaacgaaatattgtctctctatgaaacatagaagacaagcg ttgattatttcaccagtttggcaatcactcctaggaacggggttgagagaacggcgcaccagggt tccgtccctgtttggtaagtcgtctagattagctgcggcggttccgccctcgtagttgggtagac cgggttccgtcctgtgatctccctcgcggccgcccaggaga
632	Farmington virus	acgacgcataagcagagaacataagagactatgttcatagtcacctgtattcattattgactttt atgacctattattagacccttcacgggtaaactcttctccttgcagttctcgccaagtacctcaaaag tcagaacg
633	Вирус инфекционно го бронхита птиц	acttaagatagatattaatataatctattacactagccttgcgctagatttttaactaacaacgg acttaaacctacagctggctcctcataggtgttcattgcagtgcactttagtgcctggatggca cctggccacctgtcaggtttttgtattaaatcttattgttctggtatcactgctgttttgcctgtc tcactttatacatctgttcttgggtacctaagtgtccagcgtcctacgggcgtcgtggctggttcg agtgcgaggaacctctggtcatctagcggtagggcgggtgtgtggaagtagcacttcagacgta ccggttctgtgtgaaatacggggtcacctccccacataaccttaagggttttgagcctag cgttgggctacgttctgcataaggctcggctatacgcgtttgtaggggtagtgccaaacaacc cctgaggtgacaggttctggtggtgttagtgagcagacatacaatagacagtgacaac
634	Человеческий rhinovirus 1	ttaaaactgggtgtgggtgttcccaccacaccaccaatgggtgttactctgttattccggta actttgtacgccagttttccctcccctcccacatctttacgtaactagaagtttaataacaagac caatagtaggcaactctccagggtgtctaaggtcaagcacttctgttccccgggtgatgttatg ctccaacagggcaaaaacaacagataccgttatccgcaaagtgcctacacagagcttagtagg attctgaaagatcttgggtggtcgttcagctgcatacccagcagtagaccttcagatgaggctg gacattccccactggtaacagtggtccagcctgcgtggctgcctgcgacctctcatgagggtg aagccaaagatcggacagggtgtgaagagccgcgtgtgctcactttagtccctccggcccctg aatgggctaaccttaaacctgcagccatggctcataagccaatgagtttatggtcgtaacgagt aattgcgggatgggaccgactactttgggtgtccgtgttccactttttctttattaaattgcttatggg acaatataatattgatataattggcatc
635	EV22	ccttataaccgacttgctgagcttctataggaaaaaccctttcccagccttgggggtggctggtc

		<p>aataaaaacccccatagtaaccaacacctaagacaattgatcaaccctatgcctgggtccccact attcgaaggcaacttgcaataagaagagtggaacaaggatgctaaagcatagtgtaaatgatct tttctaacctgtattatgtacaggggtggcagatggcgtgccataaatctattagtgggataccacgc ttgtggaccttatgccacacagccatcctctagtaagttgtaaaatgtctggtgagatgtgggaa cttattggaacaacaattgcttaatagcatcctagtccagcgggaacaacatctggtaacagat gcctctggggccaaaagccaaggttgacagaccattaggattggtttcaaacctgaattgtg tggaaagatattcagtacctatcaatctggtagtgggtgcaaactagtgttaaggccacgaagg atgccagaaggtaccgcaggtacaagagacactgtggatctgatctggggccaactacct ctatcaggtgagttagttaaaaaacgtctagtgggccaaccaggggggatccctggttccctt tattgttaattgacatt</p>
636	<p>cardiovirus подобный Человеческо му TMEV</p>	<p>tccgacgtggttgaattaacatctttccgacgaaagtgtattatgcctccccgattgtgtgatgc tttctgccctgctgggaggcgtcctcgggttgagaacctgaatctttcctttggagccttgg ctccccggcttaagccgcttgaatatgacagggttattttccaaactctttatttctactttcatgg gttctatccatgaaaagggtatgtgtgcccttccttctttggagaatctgcgcggcggctttccg tctctcaacagcgtggatgcaacatgccggaacgggtgaagaaaacagttttctgtggaattt agagtggacatcgaacagctgtagcgacctcacagtagcagcggattccccctcttggcgaca agagcctctgcggccaaaagccccgtggataagatccactgctgtgagcgggtcaacccag caccctgggtcgatggccattctctatggaaccagaaaatggttttcaagccctccggtagaga agccaagaatgtcctgaaggtacccgcgcgggatctgatcaggagaccaattggcagtg ttacgctgccactttggttaaaaactgtcacagcttctccaaaccaagtggcttggttttcaattt tgtgactgacaat</p>
637	<p>Человеческий coronavirus 229E</p>	<p>acttaagtaccttatctctacagatagaaaagtgtcttttagactttgtgtctacttttcaactaa acgaaattttgctatggccggcatctttgatgctggagtcgtagttaattgaaatttcatttgggtt gcaacagtttgaagcaagtctgtgtgtcctagtctaagggtttcgtgtccgtcacgagattcc attctacaacgccttactcgaggttccgtctcgtgtttgtgtggaagcaaaagtctgtctttgtgga aaccagtaactgtccta</p>
638	<p>Вирус подобный Hubei zhaovirus 1</p>	<p>gtgcaggatggcctttcccatcttaagtggttttaggatttcgtgggtccatacccccgatttctt ggtacgtattccatgcacggagaatacgacaaaactcttatttcaaaaaatattttttactcttgt gggctgagtgcgaccaccagttccagcttagcaacctggaagttgttgagatttatggaacca aattacacatgcgtggagtgccgccaactccgtatctgttactcattacgcgattaagtctgcgac gagacgagcgaa</p>
639	<p>Вирус подобный Hubei tombus 9</p>	<p>ggaccatccaggcaggttaggctagtaccctcacctgacctgtcgcgatgtttggctttgtgag gcttgtgggaggatcccttggccatgcattgctgctgtcatcgtgaaaaatgtgtatgctcga cctggcgtggaggaaacggcattgacggatgctaaggaggattgaaagtcctcaactcccat gccttattacaagtcccccttcaagcttcgagcccacgtctgtgacgagcagaggtgaggtt</p>

		<p>ggagtcaagaggagtcctattcaagctgttcgcagcaagaaccataaaactttcattgctcaatg ggcaagagcggctaaggctcggttctcgtttgcacgacagtgtgagcggagccctgtaaatgct gcggccctcatcgggtggttgcatcggagttaagaaaattggcatgaactgctccaggttctg acgtgatcgatgaggttgaacttagtttgaaccaacgatatgagcgtatggtgtccgaaacta agaagcaattccgcatcgggcacgatatggaatactacaacgagaaaaaatgccttgaaaagat ccactaggaacgc</p>
640	<p>Вирус подобный Hubei tombus 32</p>	<p>ttcgggttaccgcgtaagcggccacactgactggtgtcgggttgaattgtataccagatga ggagacgttaccaccgtctcggcagtgctactgtctgggaaaggactgtgatagtgacagtcct accgtcttagatacattgctgtgtatagcccgggagggattaactaatagcaacgcaatgcac acggcgggtcggattgcttactgatggaaagacatctaagtctaattgaacc</p>
641	<p>Вирус подобный Hubei sobemo 3</p>	<p>gagatgttgcgtgggcccgtgcgctcggggcggccacctccctacggggaccgtgagaca ccgctggggaaggccccacccccggccaaggggatcctgccgagagggcaggagaaagag gcccagccctctggggcgccttaggggTgcctgggagggaaagtaccgagccgggcggc cggtcgggtcggctgtgcagttcgaggctaaccgtaaggaaggcctgagctgcctcggcttg tcggaaaggaagacgaaggcacttatcaaggctttcaggaagcaggagcgcgaattacagcgc gcgccgtcggcctggattaaccgattggccg</p>
642	<p>Вирус наподобие Picorna Hubei 2</p>	<p>agcaacttcttctgaaaactagctagagttcgacgatctctctggctaatagacaaataaccaatca aaaagtcaaattgtcatgtatatataattagtagtgacctttattagaaaaacttagatgattatc gtcaagttgcccttgtgaagcgatcagcttttatatcgtttcattttgtatacgtcttaattgacgtt taagtacgtttgcatacctcacattgaggatagtatcgttccctgactaagaagttaaactagctta ccaatagcaaccatataggatagcttgttttaacaaggttaatctgatcttatgctcttgccttac ggtgtttatgtatagaaaaGttttataaaaaactacataattgtcaaaagaaaaagcgttacgtact gacgcattatgttcacagtgtagacacaaaccttctatatttgattgtaaaataggcttgcctgacc attatcaaatacaaactgttcaaacgcctctccgagccataattggccgacgcgaatcgacataa cagggtgagttacagctgcagttgcagccgaggatccactatttgagagagaataactctaac gaaattttgaagtcacttctacacagtttaagtctgagtaggcgttatccaaacgtaaa</p>
643	<p>Нерасivirus P</p>	<p>acatgggggggggctgacagtgagtactgtccaagcaggtgctacgctatgcctaggtgc tgctgtaggccaaggacatgtcccagtcacccaggtgaggggggggggtccctcaccgctg ccactgcctgatagggtcctgccgagggtctcgggtcggctgtac</p>
644	<p>Harrier picornavirus 1</p>	<p>gatgtgtgacgggtgaattactttccggatcccactttctattataacttttcatccaagggttagg gaaagaacctggctcgggtaccaccagaccctccgccacgctagtggactctccggagataacg gtacccctttgtagtcactgtgctggtgaagaaccacctagattgcttgggtgcgtgccgct agcttccatttctctggagcactgtgcaatgaggtttcccacttggttaacaagtgcctcaggtcc cgcaaggatactgtggggtggtgtgaccgcaggagctgtctccacggctcctctaatgttacg ccgctatccacaggccagtgctgtcatcgatcccggatgacagagctagtattgcaaccccc</p>

		aagtaagaaaagtggctagtaacctgatagctgggaagagggtgggtcagttgagtagatgcc ctagaggtacccgaaaggatctgactaggaccctgactatacattaggtaaaccgggtataa aaacatgaaaaactgaccacttttctttaacctcttctttttatgtgtgtaagtgtttgagttg gactgtacctgcccgcctttctggatfttctctatcgcctctttacacctactgttatcaaggcact cttagagata
645	Kunsagivirus 1	tttcaaatcggactccggtagtataccggagcccggttggacgctgggcccgcgtaacagcc ccccacccttcccactgactgattctcggattggactcattgcattgctaactctgattctggat ttccccgtttatgtcgtcgcggctcggaaagtcacgtacttcgacgtgatctgatggcgtttgttcc aggggggaggtggcggcagaaacgccccgccgtaaactcggcgggcccacgcctgtcaag ccactccctggggccgagcgcctgaggtgatacagagagataagcacactgggcgctgacaa cgccccggacctcagtgagaagagcagtagggccgtgtttatgggactccattggatatcccc gctgtcggaaactcacggctactccgggttgggaagcccgcgactggactgtactgggtgata gcctggtgccttccctctcactgtgtatgaaggctgaaaaccct
646	Kagoshima-2- 24-KoV	tatagttgcctgttctcgcaccgtaccgctcgttcgggaatgtgaaactggcaccctcctctc ccctaccacccttctccttcgccccattcataattacaacgccgcacacagcggcggccgcc aagggtagcctggcgggtataaaaggaaactgggtcttcccttcaagccaaaaggtaggtt ccctgtgccctgaatgctcggtaggaatgctgcaccgtaacgctttgtgaagtgttgcaagtt ctggcccggcaagcctacagagtgtgtgatccgctcgggacgccatcctgtaacaggacc ccagtgtgcgcaacagatgttcagactcggttgttactgtcttcatggaccattgcgcaaa gtgcgtgcgcatatccctgtactcaggtgtcttctctggaccctaggaatgctgcgaaggtac cccgttcggcgggatctgatcgcaggctaattgtctatgggttcagttccttttcttactccaca attgactgcttaactgactctggatctgtcttccactgctcttctcctcctcaaacggcttactta ccaactctaccttctgaccaacaccatttacacactaacttttctgactcttctgactcctggctg gtgaagac
647	Kashmir bee virus	tacgtacaatttgacgcttcgtcatgcaacaatgaactcacatgtggcgcctcggtagtaaccag aggggcgtcattccccgtatggagtgagaaatataagctaccgactcgagctgtagaataattc agcaactataacgaacacgaatttagtcgacgaaaccatttagccttaattctatgattgattat aatgataaacagctcatgtaactgtctaaactacataaatacaactggattacgaaccttaagtaa ctatcttagatgaagtctagtagtctccaatatttccgtgaaaagaatgaggacgagatagctct attaaagacgtgaggctttaaattctgataaatacattacctgagaattcctctttaggagtaga attgaaaagattagctataactaataagaatttaaatatgtaataatgctgaagacaagtattc gattattaacctctatattctatataaagtatctgtgagtctcagtgacatcacagtaaggctcga gttaactgtaatctttcattctgtcggagcagtggtaatggagccggacgatttcgcaaaa c
648	Jingmen	tgtgtttgtcaagataattgttctgtgattaacagtattgtggtcgtgtaatgacgacgagca

	picornaподобная virus	atgctagtttgatgaagtgtatgagagagtggaaaacttatctcataagaagattgaagagtgtgtagatcaggctattgatcgagcttctaagcttcgtgattacaagcttaatgttcacaatggctcccgcgggaatcatctgatcctctctttatttcgccccattcgttggtatcgcttggggatctaagttgtgctgttgagcagcatcacagttcgcttcagttgagctctgaagttgcttctgtct
649	Mumps virus	accaaggggaaaatgaagatgggatgttgtagaacaataagtgtaagaaacagtaagcccggaagtgtgttttgcgatttcgaggccgggctcgatcctcaccttcattgtcgataggggacatttgacactacctggaaa
650	Mouse Mosavirus	gaagttgatcatgaacttggttattgggtggaacgcacatgaactccaacaatgatctgaagacacagcgtggaacaattaccatgcccttgggctgcccaagacattgatggctattgggtgatttatgatgac
651	Miniopterus schreibersii picornavirus 1	gttgtcgaccgftgcttggttfaagcatgaggtggattccccgattatgtctaccgftactatggcgggcggtcgttcagggtgtttctactgaggactgcaccaagctttatctttattctcagatctccggctgtttgacgctttaggacagcaggactattttctttaatcttttctaccactagggtcctatcctagtggaggagggtgccacccttctcttttagagagtgcgcctggcggctttccgtctctggaaaaaggagcacatggcatgctacaattggcacaagaaaacaagctttgcggattctttctgtactagaggaagctgtagcgcacctgtatggcgagcggactcccctctcggcgacgagagcctctcgggccaanaagcaagtgttaatagcaccatacaggcggcagtaccactgcctttctcaacatacaatgactgatgaaccactgttggttttctgacacctttagtaggattccaaggaatgtcctgaaggtacctgttagcttacgcgcaggatctgatcaggagtctttacagtgtctgtaca ctgtgcaagggattaaaattgtttgaggaatccccgagatagtggtctatctcttctattttgtttacagacacg
652	Linda virus	gtatagcagcagtagctcaaggctgctatacgattggacatacacaattccaattggtgttaggga ccacctaggtgaaggccgacgacaggtagccattcctgttagtaggacgaaccgttatggtgga ctggtgctcaggtgagcaggctgcaatgcgtaagtggtagtacaccacagccgcaaaaggt gccactggtaaggatcaccactggcgatgccttgggacggggcgctgccaacgcaatgttagcgggtggcggggctgccatcgtgaaagctaggtcttgatggacctgttgctgtacagtctg ataggatgccggcgatgccctgtgacagccagtataagaatatccgttgtgattgcac
653	Lesavirus 2	tctttctttattttcttatgtaacttcttttaagttttattttgctacttgtgagcttatcgggaccact gtcttagacaaccccacattgtcatgagtaagtacacgcaaccattacgattacttttaaccgtct gacctttgataacaactgaagttaggcgtgaaacatgcatttatacacaagtagccccgacttcc ccactacggtgggggggctaccctactggcttggaaactgtagccattatgtgtgcctgcttcc aggatctcacaacacaacagttctctcaaatggaatatgggtgagattgcagtacatgaacaa gtatctagtagtacatagactcaagcctagttgcctgcggaacaacatgtggtaacacatgcccc agggtcacaaagacaagggttaacagccccttctaggtgtctgtgtgtaagaatacttttagtagt gttgttatgatctcacctgttagtacagaatgagtatggcttgggaaggatgtcctacaggtaccc

		attatatggatctgagtaggagaccactagtggtggcttaccgccaggtgagtggtttaaaagc gtctagccaagccaacagcactagggatagtgctttctataatttatatttcagtgatatggtgaca a
654	Lesavirus 1	gtaactaataagcaagtttactgcctgcaaactgcttcaatgggaccaccgcttcggcgaccct ttgttgagtttgatgttttaagtaactttgcaaccatacgattattttagccgctctctataatgatc ttgttatagtgggacgtgaaacattggttttctcacacacgtccggtcaccggggcgtgttcttc cgtaagtcctatccacataccatcgtgggtaggccagcatgtttgcacaggctgtgacagtggg gtgggctttccacctcaacaacacactgaattgcaatgactcagggaggaaatgacaattg gttatagtttgaactgtgctagtaatttcttcacattaagccatgttgctgcggaatcacatgtgg aacacatgcctcagggccaaaaggcacgggtagcagcccttcaggtgtgttagaagtgaa aacacatagtatgagctataatattttgtgtcttctctgtagtgtaccccgccaaatgtaaggatg cccagcaggtaccattttatggatctgagctggggattgatagtgtatctataatgactgatca atttaaaaagcgtctaagttggcacaacactggggacagtgttttcctttattctttatttgatta
655	Phopivirus штамм NewEngland	gggagtaaacctcaccaccgttgcctgggttacggctacatattttggatgtaaatattaattcct gcaggttcaggtctctgaattatgtccacgctagtggcactctctaccataagtgacgccttag cggaacctttctacacttgatgtggttaggggtacattttccctgggccttcttggccctttcc cctgcactatcattcttctccgggctctcagcatgccaatgttccgaccgggtgcgcccgcggg gttaactccatggttagcatggagctgtaggcccataaagtgtgacactggaactggactattg aagcatacactgttaactgaaacatgtaactccaatcgatctctacaaggggtaggctacgggt gaaacccttaggttaatactcatattgagagatacttctgataggtaaggtgctggataatggt gagtttaacgacaaaaaccattcaacagctgtgggccaacctcatcaggtagatgcttttgagc caagtgcgtaggggtgtgtgtgaaatgctcagtggaaggtgcctcccgaaggctcgtagg ggtaatcaggggcagttaggtttccacaattacaattgaa
656	Pestivirus штамм Aydin	gtatacgagattagctcatactcgtgtacaaattggacgtagcaaatttaaaaattcggatagggtc cccatccagcgacggccgaacggggtaaccataacctctagtaggactagcagacggatgga ctagccacagtggtgagctccctgggaggtctaagttctgagtacagaacagtcgtcagtagttc aacgctggtaaacccagcctgagatgctacgtggacgagggcatgcccagacacaccta acctggacgggggtcgtccaggtgaaagtaccatcttgggtgctgggagtacagcctgatag ggcgctgcagaggccactgacaggctagtataaaaatctctgctgtacatggaac
657	Quail picornavirus QPV1	ttgcatcagttcgccccctccctcaccataaccttttcccctctttaggactgatacttggtatgatg agcagaggatttcgcaagttatgcttctgataaaaagtaattcacgaatcatgggattatagcctg gaagtgaacactcatgtggcaagtgggtagtagctctccatgttccatgtgcagtggactgac aacagtgagttcggggttgtgtagtaagggaagattacttaccgcacctgctatacgtgggtg tacgtaggatacaggttagtagtcttagcaactttaaactggctgtaaatattgcaaggtcactg aagttgtgaacgcgaacgctccgcccactgcatgtatagcgtgcaatgcataaatggtgcactac

		atgatacagagggaatgggaaaccctccatggccgaatgcaggggtgacagcctgccggcgat gcctgtgttagtataatccgtgtttgccac
658	Свиной Sapelovirus 1	aacactcattccccctccacccttaaggtgggtgatcccctacaccctaccctccctccacata ggacgaataaacggacttgagattaaggcaagtacataaggtatggtttttgatacacttaaatg gcagtagcgtggcgagctatggaaaaatcgcaattgtcgatagccatgtagcgacgcgcttcg gcgtgctcctttgggtgattcggcgactggttacaggagagtagacagtgagctatgggcaaacc cctacagtattacttaggggaatgtgcaattgagactgacgagcgtctctttgagatgtggcgca tgctcttggcattaccatagtgagctccaggttgggaaacctggactgggtctatactgcctgata gggtcgcggctggccgctgtaactagtatagtcagttgaaaaccccc
659	Вирус репродуктивн о- респираторно го синдрома Свиней 2	atgacgtataggtgttgctctatgccttggcattgtattgtcaggagcttgaccattggcacag cccaaaacttgctgcacagaaacacccttctgtgatagcctcctcaggggagcttagggttgtc cctagcaccttgctccggagttgactgctttacggctctccacccttaacc
660	enterovirus Свиней 9	Gaaccttagaagttacacaacaagaccaataggagtccaacaccagttggattgcgggtca agcacttctgtttccccggacctagtagtgataggctgtaccacggccgaagatgaaccgctcc gttatccggctacctctcgggaagcctagtaacattctgaagtctctgaggcgttctgctcagc acgacccccgggtgtagatcgggctgatgggtctccgcataccccacggcgaccgtggcggag gccgcttggcggccccctatggcgaaagccataggacgcctcttagatgacaggggtgtgaa gagcctactgagctgggtagtagtctccggccccctgaatcgggctaactctaaccacggagc gtccaccagcaatccagctggcagggcgtcgtaacgggcaactctgtggcggaaaccgactact ttgggtgtccgtgtttcctttgatcctatttggctgcttatggtgacaacgataagtgttatcataaa gctcttgggttggccacctggaaaaagtatcagtgttgatattgtcggctctcacgcctaccaat aagacaagccctatattacttgtgcatcttactcgtcagaagaatcacagagtatcattggattt gttactcacattaaggacaag
661	Picornavirus голубей В	tttattagctgtaagttttatttggccgagAccccatagtaggatcttgggttccacattaagct ctCccgaccacacatccaaacgataggcgggtgtaagggtcctcctggctaagtgtttactcattgc tagggaagtgttgcgaccttaccagtaggaatacaggaggtcttagttgcctaaccagataaa gtggtgctgaaatattgcaagctcaatgtctggcgaacgacggactaccgttgaactattgtaac gcccgcgtgtgtaggcaacacacgggttagtaggtcacttacattgacatccgtgccgggaaag cggatctgagctatcgattgcctgatagggtgccggcgggcgcggtacgtgtggtatagtcgc tgtcttgggtatggcgtctactcggttttgtgtcgttttggaaatgtcccattgctggagatgctgta ccggtgttgccttacttgtgcacgaataagaaaacagatttggagtttggaaagtaatggataa catcaagttccattgcgttctcgtgcattttaggccagaaaatcgaccacaaaatcgaga

662	Picornavirus HK21	aaacgggaggatcggcttggcttaccttaatagctacaaaactgggctgactggggggg agctactagatccgggagaggactagttaccccgcgtaacttcccttttgcactccctccaccta cccctccctgtcccttagactcttaagtaggtgtgcaggcctggcccccgaaatgggcaaat cggacgtttgcgtgtagggctgttctgaaagggtggggccactccaccgtagtaggatcttctg ttcacgtttaaacctctccgggaggtatcgctagacactaggctgtataggatggcacgcactt aggttcgcaccttctagtcgccaagatcccgttttgagctcaagtacatggttctttgtaagat gtctaaccagaggagggtggtgctgaaatattgcaagccactctggcgaacgtccactgcattgc ctggaacaggctctctagcgcctccactggtagcgcggtggtgggttagtaggatacctatatg gacaggggatgcgggaatacccctcactagctagtgactggttgatcgactggcggcggatcc agtgatactgcataatccgcagactggggag
663	Picornavirales Tottori-HG1	agccatgaactagtgctgcattcccacagtgttgctgaaagccccgcaactgtctactcgcataatt tgactccagtcctcccgagccagcggtaggttctggtaaagtgccattatgtcacggcgcca cgcagaactgccagaaatggtaagctgcgccaacgccaacggtttgtgatcccgttagtcac acgtttacagctgttcgtaacagtaggggtttgtcgaccggacccttaatgcgcgcaattca accgcgctagtcggcaatggatcatftaatcccatgcactacgggagaaatttgagaccaaaag aattcctgagggccactgcttcttaagtgcactcgggagacttctgtcaggagcctagc ggctttcaaccgacagctaactcctgcgggatggttggtgtccatactactggcgtcctcaca acgctaagtggatggttccacaggtaggcaaacaccgagccccacattcaggagacctgtatg aacgatcctatcagcattagagttggaattgggtgtgctaacgtccgataagtcaccccgtgg taacgctgggaaactatccagcgcacgtactgtcctcaatgtctagggaaaggaccgcctaag cgtacaaccgggcatgtgtcgagc
664	hepatovirus Грызунов	ttcaaagaggggtcgggatttctggctcccccttttgggcacccttggctcgggggtgtaat accgtgctcgcgtttgccgtgctaacggcttcattatgttgttctgttttattatgttGgtttgt ctgtttgtatgttggtattgtcgtttaaattgattgaccacattacactccagccaatgaagaaca gatgggtcgggtattgctggcgaattcctaactcctggatccgttggtacgcatcacaaca attgcagagagagtggtgaaacggcttgggaatccctgagtacagggaaatcacactgatagc tcacttggctgtttcagtcattgacacctatgcagtgtaatfgggtgtacccccatagcttagga ggaatgttctgtcttggcactagagtgggacgctgatgcctccgtgtctaggatggctaaagga cagaatggggtgcctctgatgccatactacctgatagggtgctctcacggcctctgcatcttagtg agaagttcaattt
665	Вирус Rinderpest	accaacaagttgggtaaggatcggctatcaatgattatgatttagcacacttaggattcaagat cctatcgactggagcaggcctaaggtaaaggttctttaa
666	Rabovirus A	ctacggatatttgcatacccgcttctatcgccccacaatcccccttgaaccacaagcttactc aggctagcagcccactagctgttggaaagaaaggctagggcacacaccaacaacaccgac cccactggctgaaggccgcttggcaataagactgggtggaacagggtcgcctgtagttgttggga

		<p>acattcttctaatactgtcagcggctgactcacaccgtaacttctaccctatccccacgctt gtggaactaggaggggatgagtgattcaagtaagtactgtcagaatggtgaaaatgatctgattc tgaacgctatggatccatcgaaagatggggctacacgcctgcggaacaacacatggtaacat gtccccaggggcccgaagccacgggtgataggatcaccctgtagtttgagatcatatcaatgt catagtctagtaagatgattgaaatctaactgagctgatggctaactgcttcttattgcgcccta aggatgtcctgcaggtaccttagataaccttaagagactattgatctgagcaggagccaaagtg gtcttcccagcttggtaaaaaacgtctaagccgcggcagggggcgggaggcccccttctc ccaaaacttaattgattgt</p>
667	Shingleback nidovirus 1	<p>ctgtgagtaccgacaggctcgaagtctattatgaggcgtcgaaacagaaaacctgtaacaactc cggtttcatctactgcccgtcaagaggcagaagaggacgaccacgtgtcaccagatcactgt atctgtttcagtcagggaagtcaacttttcgacgaagttcgaccattcatcgaccgctgaaaagcg tagaagtcgatgaagatgagctccaaagagccatcgccgatttcgacaaccaaagtactgttc cactccttcgagctcgtgaatttcgagctgaaacaacaaatcaacgagaacgagtggtacggta ttataattacgacaaccaaactgcaaagttcagttgccagtcacatgtcgaatcaggacgtaa cctgggatcaggtttacgtg</p>
668	Вирус Seneca valley	<p>ttgaaatggggggctgggccctgatgccagtccttcttccccttccggggggttaaccggc tgtgttgctagaggcacagaggggcaacatccaacctgctttgccccggaacggtgcccgtcc gattcctgcgtcgccaaaggtgttagcgcacccaaacggcgcacctaccaatgtattggtgtgg tctgcgagttctagcctactgcttctccccgaccattcactcaccacgaaaagtgtgtgtaac cataagatttaacccccgcacgggatgtgcgataaccgtaagactggctcaagcgcggaagc gctgtaaccacatgctgttagtccctttatggctgcaagatggctaccacctcggatcactgac tggagctcgacctccttagtaagggaaaccgagaggccttcgtgcaacaagctccgacacaga gtccacgtgactgctaccacatgagtacatggttctcccctctcgaccaggacttcttttgaat atccacggctcgatccagaggggtggggcatgaccctagcatagcgagctacagcgggaact gtagctaggccttagcgtgcttggatactgcctgataggcgacggcctagtcgtgctggttct ataggtagcacatacaaat</p>
669	Sclerotinia sclerotiorum dsRNA mycovirus-L	<p>ttgaattaatctttacgtttacgcgcataaaatcaggacacatcttctgtatactttagtataatg atgttttgtttatgcgattaatcgtgaagagaacttcttccatccgcctgtatggcggggataataa gttcaccgccttggctgagggcgaacttgtatgtgcaaaggtgagctatatgctcgaatagtc gtaactaacacagccactactgtagagctctattgatccggaatcctttagtgggaatgcaga gctcacaccggacctgcccgtatcttcggcggttagggacttctgttcagccttgaatcattacctt tataccttctctgagggcctggggccggcgcgatattaagtacaagtcaaggacatcgccgggt agtggctaatcagccgctagtcctgctggagagttccaacttagttgggtgtggtgcatactagc tggatagagtaggtatgattgctaacgtatgccggaggctatccgtcctcgtagaacgtgccg aggagtagtctctgcagacccccgaacgcgtggggcttacttaaatgtagggcgaggaggc</p>

		gctcgtaggtggaacgactgcctcccagtcgaatgcaagatttgcacgcggaccagtctgcc ggcaattcccgggtg
670	Yak enterovirus	ctccggcacagccgcaccagtgcactggtacgtagtacctttcacgggtagtgcggtatccc ccccgtaacttagaagcatgtaacaaaccgaccaataggtgcgcggcagccagctgcgttgc ggtcaagcactctctccccgggtccgcaaggatcgttaccgcccactccactacgaggagc ctagtaactggccaagtgattgcggagttgcgttcagccacaaccccagtggtagctctggaag atggggctcgcacatccccgtggaacacggttgcttcccgcgtgtgcttccgggtcagtct ccgactgttcaactcaacatcacgcaaccagccaagagccgattgtgctggagtgggtcttctcc ggggccgtgaatgctgctaactcaacctccgagcgtgtgcgcaaatccagtgttctacgctc taacgcgtaagtggaggcggaacagactactttcggcaccctgtttcctttattttattctat atggtgacaattgcagagatttggatattgcgactttaccgtaaacatagcactgcattacctggt tgattccacaaaactcagagattcctagttcctacattgacctactgtttatttgaatctaaatac aaactgagcaagtga
671	Вирус болезни Wobbly possum	cggctgtgagtgccttagcatatgctagagtactacagccgggtgtggagtcatatgcactggtg cctgtataatagtcgggatctgtctgacctacattatctttgggagttgcttatcacgacaattctcga agtgtctgtcgacagcttaccgagtcgacaaggcccttgcaccgcagacctatcgattt caacgagaacactatcagaggtttaaatttaaaactcaccaaca
672	Птичий orthoreovirus сегмент S1	gcttttcaatccctgtgtcgtatgtcccgtatgtcatctggttcagtacgggtgcaacttctat ggtaacgttcaactgtcaggcagcgcgcaaaactcggcgggtggtgatctcaagcgacttctctct tgttgcattattggccctacttggctcgggagggtgctgctcgttattattataattgttggcgct gtttgttggcaaggctaagggttaaagcggacgcagcccgaacgtttctaccgagagctgttc gcacttaattcgggtaaaagtgatgcaggacctccgattaccaggttagtgtacgacgatttga gtttcaccttctgttagaggagtgcactactccatcttccagactataactaataccgatccgg ctctactttaacattgagttccgtcaagtcacgtctctcccccttattccagaactgttgtctca gcctgtaccgttcagttcattgattcggagattcgtctctgtgcaaccttatctagtattgtgaa tacgactgtgcgctactgccatccatcaacgctattacgacgatccctacaccaggtgcgctac atctctgattgtcattggg
673	Козий Kobuvirus d10	ggggcctcggccccctaccctctttccgggtggccacgcccggccaccgatacttccctca ctccttcgggactgttggggaggaacacaacagggtcccctgtttccattcctccccctttc ccaacccaaccgctatctggtggcggcaagacacacgggtcttccctctaaagcacaatt gtgtgtgtgtcccaggctcctcctgcgtacgggtcgggagtgctcccaccaactgttgaagcct gtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgacgtcgcattccgctcgggatgccgaccgggta accggttccccagtggtgtgtagtgcgatcttccaggtcctcctggttggcgtgtccagaaactgc ttcaggtaagtggggtgtgcccaatccctacaaagggtgattcttccacccttaggaatgctcc ggaggtaccccagcaacagctgggatctgaccggaggctaattgtctacgggtggtgttctt

		ttctttcacacaactctactgctgacaactcactgactatccacttgctctcttgcctttctgctct ggttcaagttccttgattgttttgactgctttcactgcttttctctcacaatccttgctcagttcaaaag tc
674	Козий Kobuvirus d20	ccccctaccctctttccgggtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttcaactccttcggga ctgttggggaggaacacaacagggctcccctgtttccattccttccccctttccaaccccaa ccgccgatctgggtggcggcaagacacacgggtctttccctctaaagcacaattgtgtgtgtgc ccaggtcctcctgctacgggtgcccgggagtgctcccaccaactgttgaagcctgtccaacggc tcgtcctggcaagactatgacgtcgcattgtccgctgcccgatgccgaccgggtaaccgggtccc cagtggtgtagtgcgatctccaggtcctcctggttggcgttgcagaaaactgcttcaggttaagt gggggtgtcccacccctacaaggttgattctttcaccaccttaggaatgctccggaggtacc cagcaacagctgggatctgaccggaggctaattgtctacgggtgggtttcctttttttcacac aactctactgctgacaactcactgactatccacttgctctcttgcctttctgctctggttcaagttc cttgattgttttgactgctttcactgcttttctctcacaatccttgctcagttcaaaagtc
675	Козий Kobuvirus d30	ctctttccgggtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttcaactccttcgggactgttgggga ggaacacaacagggctcccctgtttccattccttccccctttccaaccccaaccgccgatct gggtggcggcaagacacacgggtctttccctctaaagcacaattgtgtgtgtgtccagggtcctc tgctacgggtgcccgggagtgctcccaccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggca agactatgacgtcgcattgtccgctgcccgatgccgaccgggtaaccgggtccccagtggtgtga gtgcatctccaggtcctcctggttggcgttgcagaaaactgcttcaggttaagtgggggtgtgcc caatccctacaaggttgattctttcaccaccttaggaatgctccggaggtaccccagcaacagc tgggatctgaccggaggctaattgtctacgggtgggtttcctttttttcacacaactctactgct gacaactcactgactatccacttgctctcttgcctttctgctctggttcaagttccttgattgttttg actgctttcactgcttttctctcacaatccttgctcagttcaaaagtc
676	Козий Kobuvirus d40	gtggccacgcccgggcccaccgatacttcccttcaactccttcgggactgttggggaggaacacaa cagggctcccctgtttccattccttccccctttccaaccccaaccgccgatctgggtggcggc aagacacacgggtctttccctctaaagcacaattgtgtgtgtgtccagggtcctcctgctacggg gcccgggagtgctcccaccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgac gtcgcattgtccgctgcccgatgccgaccgggtaaccgggtccccagtggtgtgtagtgcgatctc caggtcctcctggttggcgttgcagaaaactgcttcaggttaagtgggggtgtgcccacccctac aaaggttgattctttcaccaccttaggaatgctccggaggtaccccagcaacagctgggatctga ccggaggctaattgtctacgggtgggtttcctttttttcacacaactctactgctgacaactcac tgactatccactgctctcttgcctttctgctctggttcaagttccttgattgttttgactgctttcac tgcttttctctcacaatccttgctcagttcaaaagtc
677	Козий Kobuvirus d50	ccgggcccaccgatacttcccttcaactccttcgggactgttggggaggaacacaacagggctccc ctgtttccattccttccccctttccaaccccaaccgccgatctgggtggcggcaagacacac

		<p>gggtctttccctctaaagcacaattgtgtgtgtgtcccaggtcctctgcgtacggcgaggagtg ctcccacccaactgttgaagcctgtccaacgcgtcgtcctggcaagactatgacgtcgcattg cgctcgggatgccgaccgggtaaccgggtccccagtggtgtgtagtcgcatctccaggtcctcct ggttggcgttgtccagaaactgcttcaggtaagtggggtgtgccaatcctacaaaggttgatc ttcaccaccttaggaatgctccggaggtaccccagcaacagctgggatctgaccggaggctaa ttgtctacggggtgttctctttttttcacacaactctactgctgacaactcactgactatccactt gctctctgtgccttctgctctgggtcaagttccttgattgttttgactgcttttactgcttttcttca caatccttgcctcagttcaagtc</p>
678	<p>Picornavirales sp. изолят RtMruf-PicoV</p>	<p>ttgctcagcgtactctccgggttacgtggagacaaaaggctacggagactcgggctacgg ccctggagcacctaggtgctcctaaagacgttagaagttgtacaaactcgccaatagggtccc ccaaccaggggggtagcgggcaagcacttctgtttccccgggtatgatctcataggtgtacca cggctgaaagagagattatcgttaccgcctactactcagagaagcccagtaagttcatgaa gttgatctcgtgaccgggtgtttccccacaccagaaactgtgatgggggtggtcatcccgt catggcgacatgacggacctccccgcggcagggcctctcggaggacgagtgacatg gattcaaccgtgaagagcctattgagctagtgttgattcctcccccgtgaatcgggctaacc caactccggagcagggcggccaaaccagggtctggcctgtcgtaacgcgaaagtctggagc ggaaccgactactttcgggaaggcgtgttctttttgtcctttatcaagtttatggtgacaactcct ggtagacgtttattgcgtttattgagagattccaacaattgaacagactagaaccactgtttatc aaacctcacagaataagataaca</p>
679	<p>Apodemus agrarius picornavirus штамм Longquan- Aa118</p>	<p>ttactcagcgtactactccgggttacgtgatgaagaagaggctacggagattctcgggctacg gccctggagccactccggctcctaaagatttagaagttgagcacaccgcccactagggtccc ccatccaggggggcaacgggcaagcacttctgtttccccgggtatgatctgataggtgtaacca cggctgaaacagagattatcgttaccgcttactactcagagaagcctagtaagttgaggggtaa ttgaatccgttgatccgggtgtctccccacaccagaaactcatgatgaggggtgccatcccggct acggcgacgtagcgggcatccctgcgctggcatgaggcctcttaggaggacggatgatatgg atctgtcgtgaagacctattgagctagtgtcactcctccgccccgtgaatcgggctaactcct aaccgggagcaggtgggtccaatccaggcctggcctgtcgtaatgcgtaagtctgggacgg aaccgactactttcgggaaggcgtgttccattgtcattattgtgtttatggtgacaactctgg gtaaactgttattgcgtttattgagagattccaacaattgaacaaacgagaactacctgtttatta aatttacagagaagaattaca</p>
680	<p>Niviventer confucianus picornavirus</p>	<p>cccttcataacccccctttaacccaaccttcgtaaccgtacgcttactcgcctttgggtata gcccaccaatgtgctgaagaaaaggatacgtataaggggccaacgggtggtggcccttaag accaccaacctagaagctgtacactcgggcaatagtgaggccacatccagtgggtcaagc ccaaagcattctgtccccgggtatgatctcataagctgtaccacggctgaaagagtattatcgt tatcccactcagtactcggagagcctagtacaccacttggaatggaagtctgtgatccggggtt</p>

		<p>gaccctgaaccccagaaactcatgatgaggctaaccttcccgaacacggcgacgtgtggttag cctgcgctggcatgaggcctctttgtaggcagactgaaatggaagggtgacgaagagccgact gagctactgtttattctccggccccctgaatgaggctaataactcctggtccagtaactgttaa cccaacaggtggctggtcgtaatgagcgaagccgggagcggaaaccgactactttggggcgctccg tgttctcaatattattcattctagcttatggtgacaatttatgattgcagagattgtgctgtattgtgt ctgagagaagaagtaacaat</p>
681	<p>Picornavirus летучей мышь изолят BtRs-PicoV</p>	<p>tttcaaaaggccctgggcatacggcgttattcgtaacgtcgtatgtccagggcggtagcatcagg ccaaggcctgatgtaccacgtgtggactaaaccacacactcttctgtgacacgttgtgtcacct atcccttcttgtaacttagaagctgtgacttacgcacgtagggtgccccacatccagtggggtt tgtgcaaagcaatctgttccccggtaaaccctgataggctgtaaccacggccgaaacaagggtt gtcgttaccgactcactactacaaaagcctagtaaaagtcaatgaaagtgcgcagcgtgatcc ggtaaaacccccctgaccagaaacacatgatgagggtcaccacccccactggcgacagtggt gggtgccctgcgttggcatgtggcctcgtagaggcgttgaatctggatttctccgaagagccc cgtgtgctagtgtttatacctccggccccctgaatgaggctaatacccccgagcatgtacac acaagccagtgtagcatgtcgtaatgagcaatttggggatggaaccgactactttagggtgtc cgtgtttctcattattctttgtttgatgttt</p>
682	<p>Rhinolophus picornavirus штамм Guizhou- Rr100</p>	<p>ttttttctcaggcggtagcatccagccaaggcctgatgctaccaacgtgtgactaaaccacact ctcttttgtgatacattgtgtcacctatcccttcttgtaacttagaagctgtacaccacgcacgt aggtaccccacatccagtggtgttgcgaaagcattctgttccccggtaaaccctgataggctg taaccacggctgaaacaaggttgcgttaccgactcactactacgaaagcctagtaaagttc aatgaaagtgcgcagcgtgatccggtaaaacccccctgaccagaaacacatgatgagggtca ccaacccccactggcgacagtggtgtccctgcgttggcatgtggcctcatagaggcgttgca atctggatttctccgaagagccccgtgtgctagtgtttatacctccggccccctgaatgaggcta atcctaacccccgagcatgtacacacacgccagtggtgcagcatgtcgtaatgagcaatttgggg atggaaccgactactttagggtgtccgtgtttctcattattctttgtttgatgtttatggtgacaaca</p>
683	<p>Rhinolophus picornavirus штамм Henan-Rf265</p>	<p>cggaacgttgtatgctcaggcgtaggcaccaccacgggtggtgcctacacgtgtggactaa accacacactctttcagcacttagtgctctatctttttgtaactagaagttgtacacaatgcgt tagggccacacatccagtggtatcgaaagcacttctgtttccccgggtgctagtaggagggtg gctgtccacggccacttgcgaaccatcgttaccgactcattactcgaagcctagtaac ccagttgaagcaagccggcgtgtccggcaggaaaaacccccctggccagaaacatgtga tgagggtgggctatccccactgggtgacagtgagccctccctgcgttggcacatggcccgatctg ggcgtggttcttgtggatgctgccgaagagccccgtgagctagtgtttataccggccctcgtg aatgaggctaaccctaacccccggagcagaggctactgaagccacagtagctgctgtcgaacg agtaattctgggatgggaccgactacttccagtggtccgtgtttctttattctttattgtttatggt gacaac</p>

684	Человеческий enterovirus C ₁₀₅	cccctaggatccactggatgtcagtaactggtatcgtggtaccttgtacgcctgtttatacccc cttccccgcaactttagaagcatcaaaagcaccgctcaatagtcaccacacccccagtggtgtt cgagcaagcacttctgttttccgggtgctcccatatgctgtgcaaacggcaaaaagggacaat atcgttaccgctgtatactacgggaaacctagtagtaccaccattgattgtgtgagagtgcgctca tcaccttccccgggtgtagctcaggccgatgaggctcagaatccccacaggtgactgtgtctga gcctgcgttggcggcctgccctgccttatggcgtgggacgcttgatacatgacatggtgcgaa gagtctactgtgctatgcaagagctcctccggcccctgaatgtggctaactcctaaccactgatccca cgcacgcaaacagtgtagtggtgctaacgcgcaagtcggtggcggaaaccaactcttg ggtagcctgtttcctttacttattgaatgtttatggtgacaattgttgattcagttgtgccattct ctacattcattaccagcatcaaaccaattgaactgttaca
685	Человеческий poliovirus 1 штамм NIE1116623	agtctggacatccctcaccggcgacggtggtccaggctgcgctggcggcctacctgtgtgcca aagccacgggacgctacatgtgaacaagggtggaagagcctattgagctacaaaagagtcctc cggcccctgaatgcggctaataccaaccacggatcaagggtgcacaaaccagtgtagcctgt cgtaacgcgcaagtctgtggcggaaaccgactcttgggtgtccgtgttcccttttaatttgatgg ctgcttatggtgacaatcatagattgtatcataaagctaattggattggccatccggtgagagtga aatatattgtttacctccctgttgggttactctaactaacttctccattataaacttgcacacagttt taataattagaagtgagtttaca
686	Человеческий enterovirus 109	tttaaacagcctgggggtgttccccccccaggcccactgggcgttagtactctggtatcgc ggtaccttagtatgctgtttatgtctccttccccgcaactttagaagtaatacagttatggctca acagtcgccacacccccagtggttccgagcaagcacttctgttccccgggtgcttcttatatgc tgtgtgaacggcagaaagggacaatcgttatccgctcaactactacgggaagcctagtacca ccatggattgacctgaaagttgcgttcagcgcacccccagcgcagctcaggccgatgaggctc cgaataccccacgggcgaccgtgtcggagcctgcgttggcggcctgccacgttgcaaacgt gggacgctcattcatgacatggtgcaagagcctactgtgctagttgagagtcctccggcccct gaatgtggataatcctaaccactgaacctacgggcgcaaacacagcgtctggtaggccgtaacg cgcaagtcggtggcggaaaccaactcttgggtgtccgtgttcttttatcttttgaatgtttatggt gacaattgtgtgtacagttgttaccatagttgcattcagaataaacctaacttccaattattg ttaca
687	Человеческий poliovirus 2 штамм NIE0811460	ttgtgcgctgttttatattcccccccgcaacttagaagcacgaaaccaagttcaatagaagggg gtacaaccagtagtaccacgaacaagcacttctgttccccgggtgacattgcatagactgtca cgcggtgaaagtgatcgatccgttaccgcttgtgtacttcgaaaagcctagattgccttggaat cttcgacgcgttgcgctcagcaccgacccgggggtgtagcttaggctgatgagtctggacatt cctcaccggtgacggtggtccaggctgcgttggcggcctacctatggctaatagccataggacgc tagatgtgaacaagggtggaagagcctattgagctacataagagtcctccggcccctgaatgcg gctaactcctaaccacggagcaggcggctgcgaaacacagtgactagcttgcgtaacgcgcaagt

		ctgtggcggaccgactactttgggtgtccgtgttctgttattttattatggctgcttatggtgac aatcagagattgttatcataaagcgaattggattggccatccggtagtggtgtgcaggtatacaa ctgtttgttgaaccactgtgttagttaacctctttcaaccaattagtcaaaaacaatacgaagat agaacaacaatactaca
688	Picornavirus крупного рогатого скота	tttctccccctccccccaactacctttccccctcttctaacgctagaagttgtgcaaaccgctg tagggtagtcaatccagcagtgcataggctaagctttctgttaccacccccacattatactga ggaggattgtgaaattgtgttagtatgggttagtagcggtagcccggttaacccaaccagaa actcacggatgagatgaacaggacccccacatggtaacgtgtgtgttcgtctgccccgcaagggtg aggccgtgagagctttgcacgcgaaaacctgaaaacccaaaagtacctgagctcttcgctattt tgttttctccaggacctgaatgcggctaaacctaacccgcatccgcacgtagcaaccag ctagagtgtggtcgtaatgcgcaagttgcggcggtaccgactctttgggttctctgtttccttt atatttttgaattttatgggtgacaacagctagaaaataagagtgaac
689	Человеческий poliovirus 1 штамм EQG1419328	accctgtacgcctgtttatactccccctcccgaacttagaagaacaaaataagttcaatagga gggggtacaaccagtagcaccacgaacaagcacttctgtctccccggtagcattgcatagact gtccccacgggtgaaagcaattgatccgttaccgctctgtacttcgagaagcctagtagcatctt ggaatcatcgtatgcgttgcgctccacactcagctccagagtgtagcttaggctgatgagctgga cattcctcaccggcgacgggtgtccaggctgcgttggcggcctacctgtggcccaaagccaca ggacgctagatgtgaacaaggtgtgaagagcctattgagctataagagagctcctccggcccctg aatgcggctaatccaaccacggatcaagggtgcacgaaccagtgataacctgtcgtaacgcg caagtccgtggcggaaaccgactactttgggtgaccgtgtttcctttattatttcaatggctgcttatg gtgacaatcattgattgttatcataaagcgaattggactggccatccgggtgaaagtgaacatatt gtttgcctcctcgttgggtctacttcaaccaatcttacttacaatcttaccactacagtttgcgtgta gaagtgtgttcacg
690	Человеческий poliovirus 2 изолят IS_061	ttgtgcgcctgtttatactccccctcccgaacttagaagcacgaaaccaagttcaatagaagggg gtacaaccagtagcactacgaacaagcacttctgttccccggtagcattgcatagactgctcac gcggtgaaagtgatcgtatccgttaccgcttgtgtacttcgaaaagcctagtagccttggaaat ctcgacgcgttgcgctcagcaccgacccccggggtgtagcttaggccgatgagcttgagcatt cctcaccggtagcgggtgtccaggctgcgttggcggcctacctatggctaacgccataggacgt tagatgtgaacaaggtgtgaagagcctattgagctacataagagctcctccggcccctgaatgcg gctaacttaaccacggagcaggcggtcgcgaaccagtgactggcttgcgtaacgcgcaagt ctgtggcggaaaccgactactttgggtgtccgtgttctgttattttatcatggctgcttatggtgac aatcagagattgttatcataaagcgaattggattggccatccggtagtggtgtgcaggtatacaa ctgtttgttgaaccactgtgttagctttgcttctcatttaaccaattaatcaaaaacaatacaggat aaaacaacaatactaca
691	Coxsackieviru	cctttgtgcgcctgtttatgccccctcccccaattgaaacttagaagttcacacaccgatcaac

	s B5	agcgggctggcataccagccgcttctgatcaagcactcctgttccccggaccgagtatcaatagactgctcacgcggtgaaggagaaaacgttcgttaccgggtaactacttcgagaaacctagtagcatcatgaaagttgcgaagcgtttcgtcagcacatccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggacgctggcggtggctgcgttggcggcctgcctacggggcaaccgtaggacgctcaatacagacatggtgcgaagagtcgattgagctagttagtagtctccggccctgaatccggctaactcctaactgaggagcacataacctcaaccagggggcattgtgtcgtaacgggtaactctgcagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgtttctttattctataatggctgcttatggtgacaattgaaagattgtaccatatagctattggattggccatccgggtgctaacagagctattatatacctctttgttgattgtaccacttgatctaaaggaagtcaagacactacaattcatcataaattgaacacagcaaa
692	Coxsackievirus A10	tttgtgcgctgttttacaacccttccccaaactgtaacgtagaagtaatacacactactgatcaatagcaggcatggcgccagtcagctcgcagcaagcacttctgttccccggactgagatcaatagactgctcacgcggtgaaggagaaaacgttcgttaccgggtaactacttcgagaaacctagtagcaccatagaagctgcagagtggtcgtcagcacttccccgtgtagatcaggctgatgagtcactgcaatccccacgggtgaccgtggcagtggtgcgttggcggcctgcctatggggcaaccctagtagcgtctaatgtggacatggtgcgaagagctattgagctagttagtagtctccggccctgaatcgggctaactcctaactgaggagcacatgccttcaaccagaaggtagtggtcgtaacgggcaactctgcagcgggaaccgactactttgggtgtccgtgtttctttattctatattggctgcttatggtgacaatcacggaattgtgcatatagctattggattggccatccgggtgctaatagagctattgtgtacctattgttgattactccgctatcacataaatctctgaacactttgtgctttatattgaacttaaacaccgaaa

[0680] В некоторых вариантах осуществления IRES согласно изобретению представляет собой IRES, имеющий последовательность, приведенную в таблице 17 (SEQ ID NO: 1-72 и 348-389). В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой IRES salivirus. В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой IRES salivirus SZ1. В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой AP1.0 (SEQ ID NO:348). В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой СК1.0 (SEQ ID NO:349). В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой PV1.0 (SEQ ID NO:350). В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой SV1.0 (SEQ ID NO:351).

Таблица 18. Последовательности 5'-фрагмент интрона сайта перестановки Anabaena

SEQ ID NO	Сайт перестановки	Последовательность
73	L2-1	GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGA

		AGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAA TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCA AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
74	L2-2	AAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACC TAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAA GTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAAT CGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCA AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
75	L2-3	AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAG TAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
76	L5-1	GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAAT TAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGT GCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAG CGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
77	L5-2	TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGG TAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
78	L5-3	TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGC AGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
79	L5-4	ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGC AGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG

		AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
80	L5-5	TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAA AGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
81	L6-1	ACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA AGAGAATGAAAATCCGT
82	L6-2	CAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCG ACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGA GTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGT
83	L6-3	AATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGA CGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGT
84	L6-4	ATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT CCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGT
85	L6-5	TAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACG GGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGT
86	L6-6	AGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACG GGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGT
87	L6-7	GATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGG GAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGT

88	L6-8	ATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGG AGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCA ATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA ATGAAAATCCGT
89	L6-9	TGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAA TTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGT
90	L8-1	CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
91	L8-2	AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
92	L8-3	AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
93	L8-4	GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
94	L8-5	ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGG CAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
95	L9a-1	AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
96	L9a-2	ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
97	L9a-3	TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
98	L9a-4	AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
99	L9a-5	GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
100	L9-1	GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
101	L9-2	AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
102	L9-3	AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
103	L9-4	AGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
104	L9-5	GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
105	L9-6	CTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
106	L9-7	AAGAGAATGAAAATCCGT
107	L9-8	AGAGAATGAAAATCCGT
108	L9-9	GAGAATGAAAATCCGT
109	L9a-6	GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
110	L9a-7	AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT

111	L9a-8	GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
-----	-------	----------------------------------

[0681] В некоторых вариантах осуществления 5'-фрагмент интрона представляет собой фрагмент, имеющий последовательность, приведенную в таблице 18. Обычно конструкция, содержащая 5'-фрагмент интрона, приведенный в таблице 18, будет содержать соответствующий 3'-фрагмент интрона, приведенный в таблице 19 (например оба типовых фрагмента с сайтом перестановки L9a-8).

Таблица 19. Последовательности 3'-фрагмент интрона сайт перестановки Anabaena.

SEQ ID NO	Сайт перестановки	Последовательность
112	L2-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA
113	L2-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAG
114	L2-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA
115	L5-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTA
116	L5-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG
117	L5-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT
118	L5-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT T
119	L5-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TA
120	L6-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTA
121	L6-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAA
122	L6-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT

		TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAAC
123	L6-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACA
124	L6-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACA
125	L6-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAT
126	L6-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATA
127	L6-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAG
128	L6-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGA
129	L8-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT
130	L8-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA

		TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC
131	L8-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCA
132	L8-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA
133	L8-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG
134	L9a-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC
135	L9a-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA
136	L9a-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA

137	L9a-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT
138	L9a-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA
139	L9-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGC
140	L9-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCG
141	L9-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGA
142	L9-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT

		TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAA
143	L9-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAA
144	L9-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAG
145	L9-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAGCTGC
146	L9-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAGCTGCA
147	L9-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT

		TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAGCTGCAA
148	L9a-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG
149	L9a-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GC
150	L9a-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTT AAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGA CGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCA

[0682] В некоторых вариантах осуществления 3'-фрагмент интрона представляет собой фрагмент, имеющий последовательность, приведенную в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления конструкция, содержащая 3'-фрагмент интрона, приведенный в таблице 19, будет содержать соответствующий 5'-фрагмент интрона, приведенный в таблице 18 (например оба типовых фрагмента с сайтом перестановки L9a-8).

Таблица 20. Последовательности 5'-фрагмента интрона сайта перестановки Heanabaena.

SEQ ID NO	Интрон	Последовательность
-----------------	--------	--------------------

151	Azop1	tgcgccgatgaaggtgtagagactagacggcaccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtc ccagggagtgggcгаааgтсacacaaaccgгаатссgт
152	Azop2	ccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcggcgcctgcgccgatgaaggtgtagagactagacg gcaccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtcagggagtgggcгаааgтсacacaaacc gгаатссgт
153	Azop3	acggcaccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtcagggagtgggcгаааgтсacacaa accgгаатссgт
154	Azop4	acgctatggtgaaggcatagtcagggagtgggcгаааgтсacacaaaccgгаатссgт
155	S795p1	attaaagttatagaattatcagagaatgatatagtccaagccttatgtaacatgagggcacttgaccctg gtag
156	Twortp1	aagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagagaaagtcaacgactattccgataggaag tagggтcaagtгactгcгааатggggattacccttctagggtagtgatatagtctgaacatatatgгаааc atatagaaggataggagtaacgaacctattcгтаacataattgaaacttttagttat
157	Twortp2	taataagagaaagtcaacgactattccgataggaagtagggтcaagtгactгcгааатggggattacc cttctagggtagtgatatagtctgaacatatatgгаааcatatagaaggataggagtaacgaacctattc gтаacataattgaaacttttagttat
158	Twortp3	taggaagtagggтcaagtгactгcгааатggggattacccttctagggtagtgatatagtctgaacata tgгаааcatatagaaggataggagtaacgaacctattcгтаacataattgaaacttttagttat
159	Twortp4	ctagggtagtgatatagtctgaacatatatgгаааcatatagaaggataggagtaacgaacctattcгта acataattgaaacttttagttat
160	LSUp1	agttaataaagatgatgaaatagctgaaccattttgagaaaagtggaaataaaagaaaatctttatgata acataaattgaaaggctaa
161	Phip1	caaagactgatgatatagtccgacactcctagtaataggagaatacagaaaggatgaaatcc
162	Nostoc	agtcgagggtaaaggagagtgccaattctcaaagcctattggcagtagcgaaagctgcgggagaaatg aaaatccgt
163	Nostoc	agccgagggtaaaggagagtgccaattctcaaagccaataggcagtagcgaaagctgcgggagaaatg gaaaatccgt
164	Nodularia	agccgagggtaaaggagagtgccaattctcaaagccgaaggttattaaaacctggcagcagtgaaag ctgcgggagaaatgaaaatccgt
165	Pleurocap sa	agctgagggtaaagagagagtgccaattctcaaagccagcagatggcagtagcgaaagctgcgggag aatgaaaatccgt
166	Planktothr ix	agccgagggtaaagagagagtgccaattctcaaagccaattgtagtagcgaaagctacgggagaaatg aaaatccgt

[0683] В некоторых вариантах осуществления 5'-фрагмент интрона представляет собой фрагмент, имеющий последовательность, приведенную в таблице 20. Конструкция,

содержащая 5'-фрагмент интрона, приведенный в таблице 20, будет содержать соответствующий 3'-фрагмент интрона в таблице 21 (например оба типовых фрагмента с интроном Azop1).

Таблица 21. Последовательности 3'-фрагмента интрона сайта перестановки Heanabaena.

SEQ ID NO	Интрон	Последовательность
167	Azop1	gcggaactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaccacgcaagggatggtgtcaaattcggcg aaacctaagcgcccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgcc
168	Azop2	gcggaactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaccacgcaagggatggtgtcaaattcggcg aaacctaagcgcccgc
169	Azop3	gcggaactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaccacgcaagggatggtgtcaaattcggcg aaacctaagcgcccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgctgcgccgatg aagggttagagactag
170	Azop4	gcggaactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaccacgcaagggatggtgtcaaattcggcg aaacctaagcgcccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgctgcgccgatg aagggttagagactagacggcaccacctaaggcaa
171	S795p1	aggattagataactacactaagtgtccccagactggtgacagtctggtgtgcatccagctatatcgg tgaaacccattggggaataaccgaggggaagctatattatataataataatagccccgtagag actatgtaggtaaggagatagaagatgataaaatcaaaatcatc
172	Twortp1	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatcgaaaaatccttaattcagggg acacctaacaact
173	Twortp2	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatcgaaaaatccttaattcagggg acacctaacaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttag
174	Twortp3	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatcgaaaaatccttaattcagggg acacctaacaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagagaaagtgaac gactattccga
175	Twortp4	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatcgaaaaatccttaattcagggg acacctaacaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagagaaagtgaac gactattccgataggaagtagggtaagtgactcgaaatggggattaccctt
176	LSUp1	cgctagggattataactgtgagctcctcaatattataaaatgttggaatattgggtaaatcca gacaactttctccacgtcaggatatagtgtatttgaagcgaacttatttagcagtgaaaaagcaaa taaggacgttcaacgactaaaagggtgagtattgctaacaataatccttttttaatgcccaacatctt attaact
177	Phip1	gtgggtgcataaactatttcattgtgcacattaatctggtgaactcgggtaaaccctaattggggcaa

		taccgagccaagccatagggaggatatatgagaggcaagaagtaattcttgaggccactgagac tgctgtatcatccctacgtcacacaaactaatgccgatggttattcagaaagaaaaccaatggc gtcttagagatgtatcacagaacgggtgtggaaggagcataacgggagacatacctgatggcttca gatagaccataagtgtcgcaatagggcttctgtaatatagagcattacagatgcttgagggtaca gcccacactgtaagaccaatcgtgaacgctacgcagacagaaaggaaacagctaggggaact ggctggagactggatgtaccggcctagcactcgggtgagaagttgggtgtcgttcttctgcttgt aagtggattagagaatggaaggcgtagagactatccgaaaggagtagggccgagggtgagact ccctcgtaaccgaagcgcagacagtcaact
178	Nostoc	acggacttaagtaattgagcctaaagaagaattctttaagtggcagctctcaaacctcagggaaac ctaatctgttcacagacaaggcaatcctgagccaagccgaaagatcatgagtgtgagtagtg agtaaaataaaaagctcacaactcagaggttgaactctaagctagtcggaaggtgcagagactcga cgggagctaccctaacgtaa
179	Nostoc	acggacttaaacgaattgagccttagagaagaattctttaagtgtcagctctcaaacctcagggaa acctaatctgttgacagacaaggcaatcctgagccaagccgagaactctaagttattcggaggt gcagagactcgacgggagctaccctaacgtca
180	Nodularia	acggacttagaaaactgagccttgatcgagaaatcttcaagtggaagctctcaaacctcagggaaa cctaatctgtttacagatatggcaatcctgagccaagccgaaacaagtctgagtgttaaagctca taactcatcggaaggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtta
181	Pleurocapsa	acggacttaaaaaaattgagccttgagcagagaaatctgtcatgcaacgctctcaaacctcagggaa acctaagtctggcaacagatatggcaatcctgagccaagccttaatacaggaaaaaacattttac ctttaccttgaaaggaaggtgcagagactcaacgggagctaccctaacaggtca
182	Planktothrix	acggacttaagataaattgagccttgaggcgagaaatctctcaagtgaagctgtcaaacctcaggg aaacctaactctgtaaacctcagacaaggcaatcctgagccaagcctaggggtattagaaatgaggg agtttcccaatctaagatcaataccttaggaaggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtt a

[0684] В некоторых вариантах осуществления 3'-фрагмент интрона представляет собой фрагмент, имеющий последовательность, приведенную в таблице 21. Конструкция, содержащая 3'-фрагмент интрона, приведенный в таблице 21, будет содержать соответствующий 5'-фрагмент интрона, приведенный в таблице 20 (например оба типовых фрагмента с интроном Azor1).

Таблица 22. Последовательности спейсера и 5'-фрагмента интрона Anabaena.

SEQ ID NO	Спейсер	Последовательность
183	T25 L10	agtatataagaacaaccacTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG

		CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcgc
184	T25 L20	ctgaaattatacttataactcaaacaaaccacTAGATGACTTACAACCTAATCGGA AGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACG AGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGT AGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcgc
185	T25 L30 (I80-10) [Контроль]	ctgaaattatacttataactcagtatatgacaacaaaccacTAGATGACTTACAACCTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gcgc
186	T25 L40	catcaacaatatgaaattatacttataactcagtatatgacaacaaaccacTAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT AACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA GCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGTggctcgcgc
187	T25 L50	catcaacaatatgaaactatacttataactcagtatatgaagcattatcgcaacaaaccacTAGAT GACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgcgc
188	T50 L10	tagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcgc
189	T50 L20	atactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACCTAATCGG AAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGAC GAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcgc
190	T50 L30	gtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACCT AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggct

		cgcagc
191	T50 L40	cctcacctgagtgtagaagctatactcatactagcgtcagcaacaacaaaTAGATGACTT ACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC TAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA GCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGTggctcgcagc
192	T50 L50	ccgaatgatgcctcacctgagtgtagaagctatactcatactagcgtcagcaacaacaaaTAG ATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAAT GAAAATCCGTggctcgcagc
193	T75 L10	cggtgcgagcaacaacaaaTAGATGACTTACAAC TAATCGGAAGGT GCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
194	T75 L20	cgctccgaccagtcgagcaacaacaaaTAGATGACTTACAAC TAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGG CAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
195	T25 L30 1MM	ctgaaattatactAatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC T AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggct cgcagc
196	T25 L30 3MM	ctgaaaAtatactAatactcaCtataatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC T AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggct cgcagc
197	T25 L30 5MM	ctgaTaAtataGtAatactcaCtataatgacaacaaccacTAGATGACTTACAAC TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgg ctcgcagc

198	T25 L30 8MM	ctgaTaAtaAaGtAatacAcaCtataAgacaaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAA CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTg gctcgcagc
199	T25 L30 OffTarget 10	ctgaaattatacttatactctctaagttacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gcagc
200	T25 L30 OffTarget 20	ctgaaattatgtgtgttacAtctaagttacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gcagc
201	T25 L30 OffTarget 30	gttgatcgggtgtgtgttacAtctaagttacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc cgcagc
202	T25 L30 I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattaa acag
203	T25 L30 I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattca caatataattacg
204	T25 L30 I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatca tagc

205	T25 L30 I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacTAGATGACTTACA ACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatc gcagcataatatccg
206	T25 L30 I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacTAGATGACTTACA ACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gcagcgcgcctaccg
207	T25 L30 I80-20×2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacTAGATGACTTACA ACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gcagcgcgcctaccgaaagccggcgtcgacgttagcgc
208	T25 L30 I50-20×2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacTAGATGACTTACA ACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatc gcagcataatatccgaaacgaggatacaagtgacatgc
209	T25 L30 I25-20×2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaccacTAGATGACTTACA ACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattca caatctaaattacgaaacgataaatgataacttaac
210	T0 L0	aaacaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGA CTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
211	T100 L5	cgggcaacaacaacaTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCA GAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGA AAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
212	T75 L30	cgctccgacgagcttccggccagtgcgagcaacaacaacaTAGATGACTTACA AAC

		TAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgg ctcgcagc
213	T0 L0a	aaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGTggctcgcagc
214	T25 L10a	agtatataagaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATG AAAATCCGTggctcgcagc
215	T25 L20a	ctgaaattatacttatactcaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgcagc
216	T25 L30a (I80-10) [Контроль]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
217	T50 L10a	tagcgtcagcaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATG AAAATCCGTggctcgcagc
218	T50 L20a	atactcatactagcgtcagcaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
219	T50 L30a	gtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
220	T75 L10a	cggtgcgagcaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATG AAAATCCGTggctcgcagc
221	T75 L20a	cgctccgaccagtcgagcaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
222	T75 L30a	cgctccgacgagcttcggccagtcgagcaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
223	T0 L0b	aaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA AGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAAT CCGTggctcgcagc
224	T25 L10b	agtatataagaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAAT GAAAATCCGTggctcgcagc
225	T25 L20b	ctgaaattatacttatactcaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT CCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgcagc

226	T25 L30b (I80-10) [Контроль]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
227	T50 L10b	tagcgtcagcaacaacaacaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAAT GAAAATCCGTggctcgcagc
228	T50 L20b	atactcactagcgtcagcaacaacaacaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
229	T50 L30b	gtgtgaagctatactcactagcgtcagcaacaacaacaAAGACGAGGGTAAAG AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
230	T75 L10b	cggtcgcagcaacaacaacaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAAT GAAAATCCGTggctcgcagc
231	T75 L20b	cgctccgaccagtcgcagcaacaacaacaAAGACGAGGGTAAAGAGAGA GTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
232	T75 L30b	cgctccgacgagcttcggccagtcgcagcaacaacaacaAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
233	T25 L30 I0- 0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAATA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
234	T25 L30a I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGT
235	T25 L30a I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTgattaaacag
236	T25 L30a I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaatataaattacg
237	T25 L30a I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
238	T25 L30a	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG

	I50-20	CAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcataatatccg
239	T25 L30a I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctaccg
240	T25 L30b I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGT
241	T25 L30b I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTgattaaacag
242	T25 L30b I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaatataaattacg
243	T25 L30b I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
244	T25 L30b I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcataatatccg
245	T25 L30b I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctaccg

[0685] В некоторых вариантах осуществления спейсер и 5'-фрагмент интрона представляют собой спейсеры и фрагменты, имеющие последовательности, приведенные в таблице 22.

Таблица 23. Последовательности спейсера и 3'-фрагмента интрона *Anabaena*.

SEQ ID NO	Спейсер	Последовательность
246	T25 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaacttatatact
247	T25 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA

		TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagagtataagtataatttcag
248	T25 L30 (I80-10) [Контроль]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
249	T25 L40	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcattattgt tgatg
250	T25 L50	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagcgataatgcttcataactgagtataagtata gtttcattattgttgatg
251	T50 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgcta
252	T50 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgctagtagtat
253	T50 L30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgctagtagtatgagtagcttcacac
254	T50 L40	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgctagtagtagcttcacactc aggtgagg
255	T50 L50	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT

		AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgctagtagtagcttcacactc aggtgagggatcattcgg
256	T75 L10	gctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgcaccg
257	T75 L20	gctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgcactgggtcggagcg
258	T25 L30 1MM	gctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagctcatatactgagtataagtataatttcag
259	T25 L30 3MM	gctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagctcatatactgagtataagtataatttcag
260	T25 L30 5MM	gctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagctcatatactgagtataagtataatttcag
261	T25 L30 8MM	gctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagctcatatactgagtataagtataatttcag
262	T25 L30 OffTarget 10	gctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagagagtataagtataatttcag
263	T25 L30 OffTarget 20	gctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA

		TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagaTgtaacacacataatttcag
264	T25 L30 OffTarget 30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtaacttagaTgtaacacacaccgatcaac
265	T25 L30 I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
266	T25 L30 I25-20	cgtaatttatattgtaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTA GTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataattc cag
267	T25 L30 I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAAT TAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
268	T25 L30 I50-20	cggatattatgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGT AGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataat ttcag
269	T25 L30 I80-20	cggtaggcgctgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAG TAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtata atttcag
270	T25 L30 I80-20×2	gcgctaacgtcgacccggcaaacggtaggcgctgagccACGGACTTAAATA ATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCA AACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCC TGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaca caagtcataactgagtataagtataatttcag
271	T25 L30	gcatgtcacttgatcctcgaaacggatattatgctgcatccACGGACTTAAATAATT

	I50-20×2	GAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAAC TCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGA GCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagt catatactgagtataagtataatttcag
272	T25 L30 I25-20×2	gtagagttatcattatcgaacgtaatttagattgtaatcACGGACTTAAATAATTG AGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAAC CAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAG CCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaacacaagtc atatactgagtataagtataatttcag
273	T0 L0	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAcacaacacaaa
274	T100 L5	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaacacacagcccg
275	T75 L30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAaacaacacacagctcgactggccggaagctcgtcggagcg
276	T0 L0a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaaa
277	T25 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacacactta tatact

278	T25 L20a	<p>gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagag tataagtataatttcag</p>
279	T25 L30a (I80-10) [Контроль]	<p>gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtc atatactgagtataagtataatttcag</p>
280	T50 L10a	<p>gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagct gacgcta</p>
281	T50 L20a	<p>gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagct gacgctagtatgagtat</p>
282	T50 L30a	<p>gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagct gacgctagtatgagtatagcttcacac</p>

283	T75 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagct cgcaccg
284	T75 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagct cgcactgggtcggagcg
285	T75 L30a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagct cgcactggccggaagctcgtcggagcg
286	T0 L0b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaaa
287	T25 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaactta tatact
288	T25 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA

		TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaacacaagag tataagtataatttcag
289	T25 L30b (I80-10) [Контроль]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaacacaagtc atatactgagtataagtataatttcag
290	T50 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagct gacgcta
291	T50 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagct gacgctagtatgagtat
292	T50 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagct gacgctagtatgagtatagcttcacac
293	T75 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagct cgcaccg
294	T75 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT

		AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagct cgcaactgggtcggagcg
295	T75 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAAT TCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCT AGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGG TGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaaaaacaagct cgcaactggccggaagctcgtcggagcg
296	T25 L30 I0- 0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAAcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
297	T25 L30a I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAG AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtcataactgagt ataagtataatttcag
298	T25 L30a I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtcata actgagtataagtataatttcag
299	T25 L30a I25-20	cgtaatttatattggaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTA GTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGG AAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGAC GAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaac acaagtcataactgagtataagtataatttcag

300	T25 L30a I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATT CTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAAT TAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGT GCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacaagtc atatactgagtataagtataatttcag
301	T25 L30a I50-20	cggatattatgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGT AGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcaca aacacaagtcatactgagtataagtataatttcag
302	T25 L30a I80-20	cggtaggcgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAG TAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcac aacacaagtcatactgagtataagtataatttcag
303	T25 L30b I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAA GTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATA GACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAA GTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCCacaaacacaagtcatactgagtat aagtataatttcag
304	T25 L30b I25-10	ctgttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTG CAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCCacaaacacaagtcatat actgagtataagtataatttcag
305	T25 L30b I25-20	cgtaatttatattggaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA

		ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaca caagtcataactgagtataagtataatttcag
306	T25 L30b I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
307	T25 L30b I50-20	cggatattatgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaagtcataactgagtataagtataatttcag
308	T25 L30b I80-20	cggtaggcgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAATAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcaca aacacaagtcataactgagtataagtataatttcag

[0686] В некоторых вариантах осуществления спейсер и 3'-фрагмент интрона представляет собой спейсер и фрагмент интрона, имеющие последовательности, приведенные в таблице 23.

Таблица 24. Последовательности CAR

SEQ ID NO	CAR	Последовательность
309	FM C63-4-1BB	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGG

		<p>CGTGCCAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAC TACAGCCTGACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATC GCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAATCACC GGCTCTAC AAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGATCTAC CAAGGGCGAAGTGAAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACT GGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTC AGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTCTTGATCA GACAGCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGA TCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGA AGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCC AGGTGTTCTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACA CCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGG CAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGT GACCGTTTCTTCTGCCGCGCTATCGAAGTGATGTACCCT CCTCCTTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCA TCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGTCTTCTCCACTGTT CCCCGGACCTAGCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTT GGCGGCGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGG CCTTCATCATCTTTTGGGTCAAGAGAGGCCGGAAGAACT TCTTTATATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGA CTACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCCAGA AGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTGtaa</p>
310	FM C63- CD28	<p>ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGC CCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGAC CCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAG AGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA GTACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGACGGCACCGT GAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGG CGTGCCAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAC TACAGCCTGACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATC GCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAATCACC GGCTCTAC AAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGATCTAC CAAGGGCGAAGTGAAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACT</p>

		<p>GGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTC AGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTCCCTGGATCA GACAGCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGA TCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGA AGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCC AGGTGTTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACA CCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGG CAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGT GACCGTTTCTTCTGCCGCCGCTATCGAAGTGATGTACCCT CCTCCTTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCA TCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGTCTTCTCCACTGTT CCCCGGACCTAGCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTT GGCGGCGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGG CCTTCATCATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCCGGCT GCTGCACTCCGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCC GGACCAACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTA GAGACTTCGCCGCCTACCGGTCC^{taa}</p>
311	FM C63- CD28-дзета	<p>ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGC CCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGAC CCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAG AGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA GTACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGACGGCACCGT GAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGG CGTGCCAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAC TACAGCCTGACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATC GCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGCTCTAC AAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGATCTAC CAAGGGCGAAGTGAAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACT GGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTC AGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTCCCTGGATCA GACAGCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGA TCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGA AGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCC AGGTGTTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACA</p>

		<p>CCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGG CAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGT GACCGTTTCTTCTGCCGCCGCTATCGAAGTGATGTACCCT CCTCCTTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCA TCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGTCCTTCTCCACTGTT CCCCGGACCTAGCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTT GGCGGCGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGG CCTTCATCATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCCGGCT GCTGCACTCCGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCC GGACCAACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTA GAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG ATCCGCCGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGCCAAAACCAG CTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTAC GACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATG GGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTG TATAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTAC AGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAA GGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCAC CAAGGATACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCT CCAAGAtaa</p>
312	FM C63-дзета	<p>ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGC CCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGAC CCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAG AGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA GTACCTGAACTGGTATCAGCAAAGCCCGACGGCACCGT GAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGG CGTGCCAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAC TACAGCCTGACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATC GCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGCTCTAC AAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGATCTAC CAAGGGCGAAGTGAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACT GGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTC AGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTCTGGATCA</p>

		<p>GACAGCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGA TCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGA AGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCC AGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACA CCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGG CAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGT GACCGTTTCTTCTGCCGCGCTATCGAAGTGATGTACCCT CCTCCTTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCA TCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGTCCTTCTCCACTGTT CCCCGGACCTAGCAAGCCTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTT GGCGGCGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGG CCTTCATCATCTTTTGGGTCAGAGTGAAGTTCAGCAGATC CGCCGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGCCAAAACCAGCTG TACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGAC GTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGC GGCAAGCCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTAT AATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC GAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGG ACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAA GGATACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCA AGAtaa</p>
313	CircKymriah - Q388	<p>ATGGCTCTCCCGGTCACAGCCCTTCTCCTGCCCTGGCACT CTTGCTGCATGCGGCACGACCCGACATCCAGATGACCCAG ACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAGAGTG ACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTAC CTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGACGGCACCGTGAAG CTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGC CAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAG CCTGACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTAC CTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTT GGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGTGGAGGTGGT TCTGGCGGAGGGGGATCTGGTGGAGGCGGTTCAGAAGTG AAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTC AGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCT GCCTGATTACGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCTCCTCGG</p>

		AAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAG ACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCA TCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGAT GAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTATTGC GCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGATT ATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTTTCTTCTACCAC AACGCCC GCCCGCGACCGCCTACTCCCGCTCCCACAATT GCATCACAACCCCTGTCTTTGAGACCCGAAGCTTGTCGAC CAGCTGCCGGTGGCGCGGTTACACGCGGGGGCTCGATTT CGCCTGTGATATATATATATATGGGCCCCATTGGCTGGAACA TGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACCCTCTACT GTAAGAGAGGCCGGAAGAACTTCTTTATATATTCAAGCA GCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGACTACCCAAGAGGAAGAT GGATGCAGTTGCCGCTTTCAGAAAGAGGAGGAGGGCGGG TGCGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCTC CCGCCTATCAGCAGGGCCAAAACCAGCTGTACAACGAGC TGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGACA AGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCCA GACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGC AGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAA TGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGA CTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTAT GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa
314	CircKymriah - K388	ATGGCTCTCCCGGTCACAGCCCTTCTCCTGCCCTGGCACT CTTGCTGCATGCGGCACGACCCGACATCCAGATGACCCAG ACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAGAGTG ACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTAC CTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGACGGCACCGTGAAG CTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGC CAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAG CCTGACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTAC CTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTT GGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGTGGAGGTGGT TCTGGCGGAGGGGGATCTGGTGGAGGCGGTTTCAGAAGTG AAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTC

		<p>AGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCT GCCTGATTACGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCTCCTCGG AAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAG ACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCA TCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGAT GAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTATTGC GCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGATT ATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTTTCTTCTACCAC AACGCCCCGCCCCGCGACCGCCTACTCCCGCTCCCACAATT GCATCACAACCCCTGTCTTTGAGACCCGAAGCTTGTCGAC CAGCTGCCGGTGGCGCGGTTACACGCGGGGGCTCGATTT CGCCTGTGATATATATATATATGGGCCCCATTGGCTGGAACA TGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACCCTCTACT GTAAGAGAGGCCGGAAGAACTTCTTTATATATTCAAGCA GCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGACTACCCAAGAGGAAGAT GGATGCAGTTGCCGCTTTCAGAAAGAGGAGGAGGGCGGG TGCGAAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCTC CCGCCTATAAGCAGGGCCAAAACCAGCTGTACAACGAGC TGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGACA AGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCCA GACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGC AGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAA TGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGA CTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTAT GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa</p>
315	CircM971 - CD22	<p>ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGC CCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCAGGTTCAACTCCAG CAGTCTGGTCCCGGCCTCGTTAAACCAAGCCAGACTTTGT CTCTTACCTGTGCTATCAGTGGCGATAGCGTGTCTAGTAA TTCAGCCGCATGGAACCTGGATCCGACAATCACCGAGTAG GGGACTTGAATGGCTGGGTAGAACCTATTACCGGTCCAAA TGGTACAATGACTATGCAGTGTCTGTAAAAAGCAGGATCA CGATCAACCCTGATACGTCTAAAAACCAGTTTTCTCTGCA ACTTAATAGTGTGACCCCTGAAGACACCGCTGTGTATTAC TGTGCACGGGAGGTTACCGGTGATCTTGAAGATGCTTTTG</p>

		<p>ATATATGGGGCCAAGGTACGATGGTCACGGTGTCTAGTgg gggaggcggcagcGACATACAGATGACGCAGAGCCCATCCAGT CTCTCCGCGTCTGTTGGTGACAGAGTACTATTACATGTA GGGCGTCTCAGACCATTTGGTCTTACCTCAATTGGTATCA ACAGCGACCAGGCAAAGCACCGAACTTGCTCATTACGCT GCCAGCTCACTCCAAAGTGGTGTGCCGTCCAGATTTAGTG GTAGGGGCAGTGGCACTGATTTCACTCTGACTATTTCAAG TCTTCAAGCTGAGGATTTTGCCACATACTACTGCCAGCAA AGTTACTCAATACCTCAGACTTTTGGACAGGGGACAAAAT TGGAGATTAAtccggaACCACAACGCCCGCCCCGCGACCCG CTACTCCCGCTCCCACAATTGCATCACAACCCCTGTCTTTG AGACCCGAAGCTTGTCGACCAGCTGCCGGTGGCGCGGTTT ACACGCGGGGGCTCGATTTGCCTGTGATATATATATATG GGCCCCATTGGCTGGAACATGCGGAGTATTGCTTCTGAGC CTGGTGATTACCCTCTACTGTAAGAGAGGCCGGAAGAAA CTTCTTTATATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTCA GACTACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCCA GAAGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTGAGAGTGAAGTTC AGCAGATCCGCCGATGCTCCCGCCTATAAGCAGGGCCAA AACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAA GAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCT GAAATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAG GGCCTGTATAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAG GCCTACAGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGA GGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCACC GCCACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCC TGCCCTCCAAGAtaa</p>
316	<p>CircCD19_22 Биспецифиче ский 29</p>	<p>ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGC CCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGAC CCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAG AGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA GTACCTGAACTGGTATCAGCAAAGCCCCGACGGCACCGT GAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGG CGTGCCAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAC TACAGCCTGACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATC</p>

GCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCTGCCTTACA
CCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCCggcggcggagg
atccCAGGTTCAACTCCAGCAGTCTGGTCCCGGCCTCGTTAA
ACCAAGCCAGACTTTGTCTCTTACCTGTGCTATCAGTGGC
GATAGCGTGTCTAGTAATTCAGCCGCATGGA ACTGGATCC
GACAATCACCGAGTAGGGGACTTGAATGGCTGGGTAGAA
CCTATTACCGGTCCAAATGGTACAATGACTATGCAGTGTG
TGTA AAAAGCAGGATCACGATCAACCCTGATACGTCTAA
AAACCAGTTTTCTCTGCAACTTAATAGTGTGACCCCTGAA
GACACCGCTGTGTATTACTGTGCACGGGAGGTTACCGGTG
ATCTTGAAGATGCTTTTTGATATATGGGGCCAAGGTACGAT
GGTCACGGTGTCTAGTGGCTCTACAAGCGGCAGCGGCAA
ACCTGGATCTGGCGAGGGATCTACCAAGGGCGACATACA
GATGACGCAGAGCCATCCAGTCTCTCCGCGTCTGTTGGT
GACAGAGTACTATTACATGTAGGGCGTCTCAGACCATT
GGTCTTACCTCAATTGGTATCAACAGCGACCAGGCAAAGC
ACCGAACTTGCTCATTACGCTGCCAGCTCACTCCAAAGT
GGTGTGCCGTCCAGATTTAGTGGTAGGGGCAGTGGCACTG
ATTTCACTCTGACTATTTCAAGTCTTCAAGCTGAGGATTT
GCCACATACTACTGCCAGCAAAGTTACTCAATACCTCAGA
CTTTTGGACAGGGGACAAAATTGGAGATTAAGgggggaggcgg
cagcGAAGTGAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGTGG
CCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCGG
AGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTCTGGATCAGACAG
CCTCCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGG
GGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCC
CGGCTGACCATCATCAAGGACA ACTCCAAGAGCCAGGTG
TTCTTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC
ATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCT
ACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCG
TTTCTTCTtccggaACCACAACGCCCGCCCCGCGACCGCCTA
CTCCCGCTCCCACAATTGCATCACAACCCCTGTCTTTGAG
ACCCGAAGCTTGTCGACCAGCTGCCGGTGGCGCGGTTTAC
ACGCGGGGGCTCGATTTTCGCCTGTGATATATATATATGGG
CCCCATTGGCTGGAACATGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCT

		<p>GGTGATTACCCTCTACTGTAAGAGAGGGCCGGAAGAACTT CTTTATATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGA CTACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCCAGA AGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAGTGAAGTTTCAG CAGATCCGCCGATGCTCCCGCCTATAAGCAGGGCCAAAA CCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGA GTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGA AATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGG CCTGTATAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC CTACAGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGG CAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCACCGC CACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTG CCTCCAAGAtaa</p>
317	<p>CircCD19_22 Биспецифиче ский 30</p>	<p>ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGC CCCATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCAGGTTCAACTCCAG CAGTCTGGTCCCGGCCTCGTTAAACCAAGCCAGACTTTGT CTCTTACCTGTGCTATCAGTGGCGATAGCGTGTCTAGTAA TTCAGCCGCATGGAAGTGGATCCGACAATCACCGAGTAG GGGACTTGAATGGCTGGGTAGAACCCTATTACCGGTCCAAA TGGTACAATGACTATGCAGTGTCTGTAAAAAGCAGGATCA CGATCAACCCTGATACGTCTAAAACCAGTTTTCTCTGCA ACTTAATAGTGTGACCCCTGAAGACACCGCTGTGTATTAC TGTGCACGGGAGGTTACCGGTGATCTTGAAGATGCTTTTG ATATATGGGGCCAAGGTACGATGGTCACGGTGTCTAGTgg gggaggcggcagcGACATACAGATGACGCAGAGCCCATCCAGT CTCTCCGCGTCTGTTGGTGACAGAGTACTATTACATGTA GGGCGTCTCAGACCATTTGGTCTTACCTCAATTGGTATCA ACAGCGACCAGGCAAAGCACCGAACTTGCTCATTTACGCT GCCAGCTCACTCCAAAGTGGTGTGCCGTCCAGATTTAGTG GTAGGGGCAGTGGCACTGATTTCACTCTGACTATTTCAAG TCTTCAAGCTGAGGATTTTGCCACATACTACTGCCAGCAA AGTTACTCAATACCTCAGACTTTTGGACAGGGGACAAAAT TGGAGATTAAGGGGGAGGCGGATCCGGCGGTGGTGGCT CCGGCGGTGGTGGTTCTGGAGGCGGCGGAAGCGGTGGGG GTGGTAGCGACATCCAGATGACCCAGACCACAAGCAGCC</p>

TGTCTGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAG
AGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCA
GCAAAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCA
CACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTCT
GGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCTGACAATCAGC
AACCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGC
AAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTTGGCGGAGGCACCAA
GCTGGAAATCACCGGCTCTACAAGCGGCAGCGGCAAACC
TGGATCTGGCGAGGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAAACT
GCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCT
CTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTG
ATTACGGCGTGTCCCTGGATCAGACAGCCTCCTCGGAAAGG
CCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAAC
CTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATC
AAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAAC
AGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTATTGCGCCA
AGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGATTATTG
GGGCCAGGGCACCCAGCGTGACCGTTTCTTCTtccggaACCAC
AACGCCCCGCCCCGCGACCGCCTACTCCCGCTCCCACAATT
GCATCACAACCCTGTCTTTGAGACCCGAAGCTTGTCGAC
CAGCTGCCGGTGGCGCGGTTACACGCGGGGGCTCGATTT
CGCCTGTGATATATATATATATGGGCCCCATTGGCTGGAACA
TGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACCCTCTACT
GTAAGAGAGGCCGGAAGAACTTCTTTATATATTCAAGCA
GCCCTTTATGCGACCCGTTTCAGACTACCCAAGAGGAAGAT
GGATGCAGTTGCCGCTTTCAGAAAGAGGAGGAGGGCGGG
TGCGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCTC
CCGCCTATAAGCAGGGCCAAAACCAGCTGTACAACGAGC
TGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGACA
AGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCCA
GACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGC
AGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAA
TGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGA
CTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTAT
GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa

318	FM C63 CD28 человеческий CAR против CD19	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTSVTVSSAAAEVMPYPPYLDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRG RDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
319	FM C63 4- 1BB человеческий CAR против CD19	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI TGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSR LTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTSVTVSSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
320	человеческий CAR против BCMA	MALPVTALLPLALLHAARPDIVLTQSPASLAVSLGERATI NCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVP ARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAIIYYCLQSRIFPRTFGQGT KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGSELKKPGASVK VSKKASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLEWMGWINTETREPA YAYDFRGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYS YAMDYWGQGLVTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR

		KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
321	CAR против 1D3ζ мышинного CD19; Козий Kobuvirus IRES	MGVPTQLLGLLLLWITDAICDIQMTQSPASLSTSLGETVTIQC QASEDIYSGLAWYQQKPGKSPQLLIYGASDLQDGVPSRFSGS GSGTQYSLKITSMQTEDEGVYFCQQGLTYPRTFGGGTKLEL KGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKV SGDTITFYMHFVKQRPQGQLEWIGRIDPEDESTKYSEKFKN KATLTADTSSNTAYLKLSSLTSEDATYFCIYGGYYFDYWG QGVMTVSSIEFMYPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSP KLFWALVVVAGVLFYGLLVTVALCVIWTNSRRNRGGQSD YMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPRAKFSRSAETA ANLQDPNQLFNELNLGRREEFDVLEKKRARDPEMGGKQQR RRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLF QGLSTATKDTFDALHMQLAPR
322	мышинный CAR WTζ (дикого типа дзета)	MGVPTQLLGLLLLWITDAICDIQMTQSPASLSTSLGETVTIQC QASEDIYSGLAWYQQKPGKSPQLLIYGASDLQDGVPSRFSGS GSGTQYSLKITSMQTEDEGVYFCQQGLTYPRTFGGGTKLEL KGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKV SGDTITFYMHFVKQRPQGQLEWIGRIDPEDESTKYSEKFKN KATLTADTSSNTAYLKLSSLTSEDATYFCIYGGYYFDYWG QGVMTVSSIEFMYPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSP KLFWALVVVAGVLFYGLLVTVALCVIWTNSRRNRGGQSD YMNMTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRPRAKFSRSAETA ANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQQR RRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQLAPR

[0687] В некоторых вариантах осуществления CAR закодирован нуклеотидной последовательностью, приведенной в таблице 24.

Таблица 25. Последовательности домена CAR.

SEQ ID NO	Белок	Последовательность
318	4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
319	CD3ζ межклеточ	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG

	ный домен	KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
320	CD28 межклеточ ный сигнальный домен	QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHWRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGG SGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIRYYL SWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK
321	FMC63 VH	EVKLQESGPLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKG LEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
322	FMC63 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGKLEIT

[0688] В некоторых вариантах осуществления CAR домен, кодируемый полинуклеотидом согласно изобретению, имеет последовательность, приведенную в таблице 25.

таблица 26. последовательности PD-1 или PD-L1.

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
323	Тяжелая цепь пембролизумаба	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYMYW VRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTD SSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
324	Легкая цепь пембролизумаба	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHW YQQKPGQAPRLLIYLAASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKRTVAAP

		SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLISKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
325	Тяжелая цепь ниволумаба	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWV RQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK
326	Легкая цепь ниволумаба	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLISKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
327	Тяжелая цепь атезолизумаба	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVR QAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
328	Легкая цепь атезолизумаба	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL

		QPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
329	Тяжелая цепь авелумаба	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVR QAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
330	Легкая цепь авелумаба	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWY QQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDADYICSSYTSSTRVFGTGKVTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
331	Тяжелая цепь дурвалумаба	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWV RQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDY WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
332	Легкая цепь	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQ

дурвалумаба	KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
-------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[0689] В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, разделяющий последовательности экспрессии, кодируемый полинуклеотидом согласно изобретению, имеет последовательности, приведенные в таблице 26.

таблица 27. последовательности Цитокина.

SEQ ID NO	Цитокин	Последовательность
333	IL-2	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
334	IL-12A	RNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQI FLDQNMMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCI LLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
335	IL-12B	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKK EDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEC QEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPDPP KNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWAS VPCS
336	IL-7	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFK RHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEG TTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDL CFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH
337	IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQL DNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPD IKAHVNSLGENLKTLLRRLRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFN

		KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
338	IL-15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCF LLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
339	IL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAP RTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPP DNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDL FKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE
340	IL-27beta	RKGPPAALTLPRVQCRASRYPIAVDCSWTLPPAPNSTSPVSFIAT YRLGMAARGHSWPCLQQTPTSTSCITTDVQLFSMAPYVLNVT VHPWGSSSSSFVPFITEHIIKPDPEGVRLSPLAERQLQVQWEP SWPFPEIFSLKYWIRYKRQGAARFHRVGPPEATSFILRAVRPR YYVQVAAQDLTDYGELSDWSLPATATMSLGK
341	IFNgamma	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNK KKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPA AKTGKR KRSQMLFRG
342	TGFbeta1	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHAN FCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEP LPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

[0690] В некоторых вариантах осуществления цитокин, кодируемый полинуклеотидом согласно изобретению, имеет последовательность, приведенную в таблице 27.

таблица 28. Последовательности Фактора транскрипции.

SEQ ID NO	Фактор транскрипции	Последовательность
343	FOXP3	MPNPRPGKPSAPSLALGSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPG GTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGA RLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESP AMISLTPPTTATGVFSLKARPLPPGINVASLEWVSREPALLCT FPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLL ANGVCKWPGCEKVFEED FLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLS AMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVPAW SGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMR

		PPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPAT WKN AIRHNLSLHKCFVRVESEKGA VWTVD ELEFRKKRSQRPS RCSNPTPGP
344	FOXP3	MPNPRPGKPSAPSLALGPSWRAAPKASDLLGARGPG GTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGA RLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESP AMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCT FPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEED FLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLS AMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGCCIVAAGSQGPVPAW SGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMR PPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPAT WKN AIRHNLSLHKCFVRVESEKGA VWTVD ELEFRKKR
345	FOXP3	GGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQA LLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTA TGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKD STLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADH LLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGK MALKASSVASSDKGCCIVAAGSQGPVPAWSGPREAPDSL FAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIR WAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKN AIRHNLSLHKCFVRVESEKGA VWTVD ELEFRKKR
346	STAT5B	MAVWIQAQQLQGEALHQMQUALYGQHFPIEVRHYLSQWIESQ AWDSVDLDNPQENIKATQLLEGLVQELQKKAHQVGEDGFL LKIKLGHYATQLQNTYDRCPMELVRCIRHILYNEQRLVREAN NGSSPAGSLADAMSQKHLQINQTFEELRLVTQDTENELKKLQ QTQEYFIIQYQESLRIQAQFGPLAQLSPQERLSRETALQQKQVS LEAWLQREAQTLQQYRVELAEKHQKTLQLLRKQQTIIIDDEL IQWKRRQQLAGNGGPPEGLDVLQSWCEKLA EIHWQNRQQIR RAEHL CQQLPIPGPVEEMLA EVNATITDIISALVTSTFII EKQPP QVLKTQTKFAATVRLLVGGKLVHNMNPPQVKATIISEQQAKS LLKNENTRNDYSGEILNCCVMEYHQATGTL SAHFRNMSLK RIKRSDRRGAE SVTEEF TILFESQFSVGGNELVFQVKTL SLPV VVIVHGSQDNNATATVLWDNAFAEPGRVPFAVPDKVLWPQL CEALNMKFKA EVQSNRGLTKENLVFLAQKLFNNSSSHLEDYS

		GLSVSWSQFNRENLPGRNYTFWQWFDGVMVLEVLKHLKPHW NDGAILGFVNKQQAHDLLINKPDGTFLLRFSSEIGGITIAWK DSQERMFWNLMPFTTRDFSIRSLADRLGDLNYLIYVFPDRPKD EVYSKYYTPVPCESATAKAVDGYVKPQIKQVVEFVNASADA GGGSATYMDQAPSPAVCPQAHYNYMYPQNPDSVLDTDGDFDL EDTMDVARRVEELLGRPMDSQWIPHAQS
347	HELIOS	METEADGYITCDNELSPEREHSNMAIDLTSSTPNGQHASPSH MTSTNSVKLEMQSDEECDRKPLSREDEIRGHDEGSSLEEPLIES SEVADNRKVQELQEGGIRLPNGKCLKCDVCGMVCIGPNVLM VHKRSHTGERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLSGEEKPFKC PFCSYACRRRDALTGHLRTHSVGKPHKCNFCGRSYKQRSSLE EHKERCHNYLQNVSMEEAAGQVMSHHVPPMEDCKEQEPIMD NNISLVPFERPAVIEKLTGNMGRKRSSTPQKFVGEKLMRFSYP DIHFDMNLTYEKEAELMQSHMMDQAINNAITYLGAEALHPL MQHPPSTIAEVAPVISSAYSQVYHPNRIERPISRETADSHENNM DGPISLIRPKSRPQEREASPSNSCLDSTDSESSHDDHQSYQGHP ALNPKRKQSPAYMKEDVKALDTTKAPKGLKDIYKVFNGEG EQIRAFKCEHCRVFLDHVMYTIHMGCHGYRDPLECNICGYR SQDRYEFSSHIVRGEHTFH

[0691] В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, кодируемый полинуклеотидом согласно изобретению, имеет последовательность, приведенную в таблице 28.

таблица 29. Дополнительные Последовательности

SEQ ID NO	IRES	Последовательность
390	CK 3' UTR Scr	ccctgcagccgctaccgtaagtttgaagttaccgcatatcagcctctgcttcccagcgcgtcc aattcctgttctattgtttcccctccaggcggttacgcgtgacgacgaactgtgtcgcagctacc acattattccggagccttcattctcgcggctctgatcgt
391	CK 3' UTR S2M	ggagaccgcgccacgccgagtaggatcagggtacagtctcc
392	CK 3' UTR	gacaccaggatcactcttgctctgacccgcctgtgtagaatagactcatgcttccctaagac ctggatttcttcccaggcactttcaccgcctgcccctgctccttcagtggactgacccaggg aggeggctctctgactgtcctttactttctattctggattgc
393	CK 5' UTR 1	AAACCCCCCTAAGCCGCCGCCGCCACC
394	CK 5' UTR 2	CCCCCCAACCCGTCACG
395	CK 5' UTR 3	GTCACG

396	SZ1 3' UTR Scr	tctgcgactcgtaatcagtaactaacccttggcggacactatgcgataatgatccgcctt tttacecgcttcggaattttattacctcaactgatcctggagctctcttggttttcacggaggc ctccgcca
397	SZ1 S2M	ggagaccgcgccacgccgagtaggatcgagggtacagtctcc
398	SZ1 3' UTR	cccctgaaacccccgccccagggtcagctctcttcatcctctgtcctgcatggtgatacaa agaccctttgtggaccctaagccatgtagttgctgctccctcctccagttgtaattggtttc tgtaatcaca
399	SZ1 5' UTR 1	AAACCCCCCTAAGCCGCCGCCGCCGCCACC
400	SZ1 5' UTR 2	CCCCCCAACCCGTCACG
401	SZ1 5' UTR 3	GTCACG
402	UTR1	gTcacG
403	UTR2	AATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA GCCACC
404	UTR3	cgaactagtattcttctggtccccacagactcagagagaaccgcccacc
405	UTR4	Agccacc
406	STOP1	tgatAGctAaCtaG
407	STOP2	tagtAGctAaCtaG
408	STOP3	tGatGActGaGtGA
409	STOP4	tagtagctagGtag
410	STOP5	taa
411	STOP6	taatagCtaaCtag
412	STOP7	taaCtagCtaaCtag
718	CCL1	MQIITLALVCLLLAGMWPEDVDSKSMQVPPSRCCFSFAEQ EIPRLAILCYRNTSSICSNEGLIFKLKRGKEACALDTVGVV QRHRKMLRHCPKSRK
719	CCL2	MKVSAALLCLLLIAATFIPQGLAQPDAINAPVTCCYNFTNR KISVQLAS
720	CCL3	MQVSTAALAVLLCTMALCNQFSASLAADTPTACCFSTSR QIPQNFADYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWV QKYVSDLELSA
721	CCL4	MKLCVTVLSLLMLVA AFCSPALSAPMGSDPPTACCFSTYTA RKLPRNFVVDYYETSSLCSQPAVVVFQTKRSKQVCADPSES WVQEYVYDLELN

722	CCL5	MKVSAALAVILIATALCAPASASPYSSDTPCCFAYIARP LPRAHIKEYFYTSGKCSNPVVFVTRKNRQVCANPEKKW VREYINSLEMS
723	CCL6	MRNSKTAISFFILVAVLGSQAGLIQEMEKEEDRRYNPPIHQ GFQDTSSDCCFSYATQIPCKRFIYYFPTSGGCIKPGIIFISRR GTQVCADPSDRRVQRCLSTLKQGPRSGNKVIA
724	CCL7	MKASAALLCLLLTAAAFSPQGLAQPVGINTSTTCCYRFINK KIPKQRLESYRRITSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKW VQDFMKHLDKKTQTPKL
725	CCL8	MKVSAALLCLLLMAATFSPQGLAQPDSVSIPITCCFNVINR KIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKERW VRDSMKHLDQIFQNLKP
726	CCL9/CCL10	MKPFHTALSFLILTTALGIWAQITHATETKEVQSSLKAQQG LEIEMFHMGFQDSSDCLSYNSRIQCSRFIGYFPTSGGCTRP GIIFISKRGFQVCANPSDRRVQRCIERLEQNSQPRTYKQ
727	CCL11	MKVSAALLWLLLIAAFSPQGLAGPASVPTTCCFNLANRK IPLQRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICADPKKKWV QDSMKYLDQKSPTPKP
728	CCL12	MKISTLLCLLLIATTISPQVLGPDVSTPVTCCYNVVKQK IHVRKLSYRRITSSQCPREAVIFRTILDKEICADPKEKWVK NSINHLDKTSQTFILEPSCLG
729	CCL13	MKVSAVLLCLLLMTAAFNQGLAQPDALNVPSTCCFTFSS KKISLQRLKSYVITTSRCPQKAVIFRTKLGKEICADPKEKW VQNYMKHLGRKAHTLKT
730	CCL14	MKISVAAIPFFLLITIALGKTESSSRGPYHPSECCFTYTTYK IPRQRIMDYETNSQCSKPGIVFITKRGHSVCTNPSDKWVQ DYIKDMKEN
731	CCL15	MKVSVAAALSCLMLVAVLGSQAQFINDAETELMMSKLPLE NPVVLNSFHFAADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPG VIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKKLPYSI
732	CCL16	MKVSEAALSLLVLILIITSASRSQPKVPEWVNTPTCCLKY YEKVLPRRLVVGYRKALNCHLPAIIFVTKRNREVCTNPND DWVQEYIKDPNLPLPTRNLSTVKIITAKNGQPQLLNSQ
733	CCL17	MAPLKMLALVTLLLGASLQHIHAARGTNVGRECCLEYFK

		GAIPLRKLKTWYQTSSEDCSRDAIVFVTVQGRAICSDPNNK RVKNAV KYLQSLERS
734	CCL18	MKGLAAALLVLVCTMALCSCAQVGTNKELCCLVYTSWQI PQKFIVDYSETSPQC PKPGVILLTKRGRQICADPNKKWVQ KYISDLKLNA
735	CCL19	MALLLALSLVLWTSPAPTLSGTND AEDCCLSVTQKPIPG YIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCAPPDQPWVE RIIQLRQRTSAKMKRRSS
736	CCL20	MCCTKSLLLAALMSVLLLHL CGESEAA SNFDCCLGYTDRI LHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPKQTW VKYIVRLLSKKVKNM
737	CCL21	MAQSLALSLILVLAFGIPRTQGS DGAQDCCLKYSQRKIP AKVVR SYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELW VQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGKGSK GCKRTERSQTPKGP
738	CCL22	MDRLQTALLVVLVLLAVALQATEAGPYGANMEDSVCCR DYVRYRLPLRVVKH FYWTS DSCPRPGVVLLTFRDKEICAD PRVPWVKMILNKLSQ
739	CCL23	MKVSVAALSCLMLVTALGSQARVTKDAETEFMMSKLPLE NPVLLDRFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSECSKP GVIFLTKKGRRFCANPSDKQVQVCVRMLKLDTRIKTRKN
740	CCL24	MAGLMTIVTSLLFLGVCAHHIPTGSVVIPSPCCMFFVSKRI PENRVVSYQLSSRSTCLKAGVIFTTKKGQQFCGDPKQEWV QRYMKNLDAKQKKASPRARAVAVKGPVQRYPGNQTTTC
741	CCL25	MNLWLLACL VAGFLGAWAPAVHTQGVFEDCCLAYHYPI GWAVLRRAWTYRIQEVS GSCNLPAAIFYLPKRHRKVCGN PKSREVQRAMKLLDARNKVF AKLHHNTQTFQAGPHAVK KLSSGNSKLS SSKFSNPISSSKRNVSLLISANSGL
742	CCL26	MMGLSLASAVLLASLLSLHLGTATRGSDISKTC CFQYSHK PLPWTWVRSYEFTSN SCSQRAVIFTTKRGKKVCTHPRKK WVQKYISLLKTPKQL
743	CCL27	MKGPPTFC SLLLLSLLSPDPTAAFLPPSTACCTQLYRKPL SDKLLRKVIQVELQEADGDCHLQAFVLHLAQRSICHPQNP SLSQWFEHQERKLHGTLPKLNFGMLRKMKG

744	CCL28	MQQRGLAIVALAVCAALHASEAILPIASSCCTEVSHHISRR LLERVNMCRIQRADGDCDLAAVILHVKRRRICVSPHNHTV KQWMKVQAAKNGKGNVCHRKKHHGKRNSNRAHQGK HETYGHKTPY
745	CXCL1	MARAALSAAPSNPRLLRVALLLLLVAAGRRAAGASVAT ELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKN GRKACLNPASPIVKKIIEKMLNSDKSN
746	CXCL2	MARATLSAAPSNPRLLRVALLLLLVAASRRAAGAPLATE LRCQCLQTLQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKN GQKACLNPASPMVKKIIEKMLKNGKSN
747	CXCL3	MAHATLSAAPSNPRLLRVALLLLLVAASRRAAGASVTE LRCQCLQTLQGIHLKNIQSVNVRSPGPHCAQTEVIATLKN KKACLNPASPMVQKIIEKILNKGSTN
748	CXCL4	MAYYEEESIIFDNDNSSEESGDFDVFQGPCERAPNYDFHKI FLPTVFGIIFILGIFGNGLVVIVMGFQNKCKTSMTDKYRLH LSVADLMFVLTLPFWAVDAASSWYFGGFLCKAVHMIYTV NLYSSVLILAFISLDRYLAVVRATATSSQATRKLLAGKVIY VCVWLPAAILTVPDLVFASSFEVELDMGGSRMICQRIYPLE SNHIWVAAFRFQHILVGFVLPGLVILTCYCIISKLSQGSKG QALKRKALKTTVILILCFCCWLPYCAGIFVDTLMNLEVIP HSCALEQGVMKWISITEVLA YFHCCLNPILYAFLGVKFKK SARNALTFSSRSSHKMLTKKRGAISSASTESESSSVLYS
749	CXCL5	MSLLSSRAARVPGPSSSLCALLVLLLLLTQPGPIASAGPAA AVLRELRCVCLQTTQGVHPKMISNLQVFAIGPQCSKVEVV ASLKNGKEICLDPEAPFLKKVIQKILDGGNKEN
750	CXCL6	MSLPSSRAARVPGPSGLCALLALLLLLTPPGPLASAGPVS AVLTELRCTCLRVTLRVNPKTIGKLQVFPAGPQCSKVEVV ASLKNGKQVCLDPEAPFLKKVIQKILDSGNKKN
751	CXCL7	MSLRLDTPSCNSARPLHALQVLLLLSLLLTALASSTKGQT KRNLAKGKEESLSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEV IGKGTHCNQVEVIATLKDGRKICLDPDAPRIKKIVQKLAG DESAD
752	CXCL8	MTSKLAVALLAFLISAALCEGAVLPRSAKELRCQCIKTYS KPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKEN

		WVQRVVEKFLKRAENS
753	CXCL9	MKKSGLVFLGILLVLIGVQGTPVVRKGRCSISTNQGTIH LQSLKDLKQFAPSPSCEKIEIATLKNVQVQTCCLNPDSADV ELIKKWEKQVSQKQKNGKQHKKVVKVRSQRSRQ KKT
754	CXCL10	MNQTAILICCLIFLTLGSIQGVPLSRTVRCISISNPVNPR SLEKLEIPASQFCPRVEIATMCKKGEKRCCLNPESKAIKNL LKA VSKERSKRSP
755	CXCL11	MSVKGMAIALAVILCATVVQGFPMFKRGRCLCIGPGVKA VKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKGQRCLNPKSK QARLIKKVERKNF
756	CXCL12	MNAKVVVVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPFRFFESHV ARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKI QEYLEKALNKRFKM
757	CXCL13	MKFISTSLLLMLLVSSLSPVQGVLEVYYTSLRCRCVQESSV FIPRRFIDRIQILPRGNGCPRKEIIVWKKNSIVCVDPQAEWI QRMMEVLRKRSSTLPVPVFKRKIP
758	CXCL14	MSLLPRRAPPVSMRLAAALLLLLALYTARVDGSKCKCS RKGPKIRYSDVKKLEMKPKYPHCEEKMIITTKSVSRYRG QEHCLHPKLQSTKRFIKWYNWNEKRRVYEE
759	CXCL15	MAAQGWSMLLAVLNLGIFVRPCDTQELRCLCIQEHSEFIP LKLKINIMVIFETIYCNRKEVIAVPKNGSMICLDPDAPWVK ATVGPITNRFLPEDLKQKEFPAMKLLYSVEHEKPLYLSFG RPENKRIFPFPIRETSRHFADLAHNSDRNFLRDSSEVSLTGS DA
760	CXCL16	MGRDLRPGSRVLLLLLLLLVYLTQPGNGNEGSVTGSCYC GKRISDSDPPSVQFMNRLRKHLRAYHRCLYYTRFQLLSWS VCGGNKDPWVQELMSCLDLKECGHAYSGIVAHQKHLPT SPPISQASEGASSDIHTPAQMLLSTLQSTQRPTLPVGLSSD KELTRPNETTIHTAGHSLAAGPEAGENQKQPEKNAGPTAR TSATVPVLCLLAIIFILTAALSIVLCKRRRGQSPQSSDLPV HYIPVAP
761	CXCL17	MKVLISLLLLLPLMLMSMVSSSLNPGVARGHRDRGQASR RWLQEGGQECECKDWFLRAPRRKFMTVSGLPKKQCPCD

		HFKGNVKKTRHQRHHRKPNKHSRACQQFLKQCQLRSFAL PL
762	XCL1	MRLILALLGICSLTAYIVEGVGSEVSDKRTCVSLLTQRLP VSRIKTYTITEGSLRAVIFITKRGLKVCADPQATWVRDVVR SMDRKSNTNRNNMIQTKPTGTQQSTNTAVTLTG
763	XCL2	MRLILALLGICSLTAYIVEGVGSEVSHRRTCVSLLTQRLP VSRIKTYTITEGSLRAVIFITKRGLKVCADPQATWVRDVVR SMDRKSNTNRNNMIQTKPTGTQQSTNTAVTLTG
764	CX3CL1	MAPISLSWLLRLATFCHLTVLLAGQHGGVTKCNITCSKMT SKIPVALLIHYQQNQASCGKRAIILETRQHRLFCADPKEQW VKDAMQHLDRQAAALTRNGGTFEKQIGEVKPRTPAAGG MDESVVLEPEATGESSSLEPTPSSQEAQRALGTSPELPTGV TGSSGTRLPPTPKAQDGGPVGTELFRVPPVSTAATWQSSA PHQPGPSLWAEAKTSEAPSTQDPSTQASTASSPAPEENAPS EGQRVWGQQQSPRPENSLEREEMGPVPAHTDAFQDWGPG SMAHVSVPVSSEGTPSREPVASGSWTPKAEPIHATMDP QRLGVLITVPDAQAATTRQAVGLLAFLGLLFCLVAMFT YQSLQGCPRKMAGEMAEGRLYIPRSCGSNSYVLPV
765	Tbet	HLLWSKFNQHQTEMIITKQGRMFPPFLSFTVAGLEPTSHY RMFVDVVLVDQHHWRYQSGKWVQCGKAEGSMPGNRLY VHPDSPNTGAHWMRQEVSGKLLTNNKGASNNVTQMI VLQSLHKYQPRLHIVEVNEGEPETVCNASNTHIFTFQETQF IAVTAYQNAEITQLKIDNNPFAKGFRENFESMYASVDTSVP SPPGPNCQLLGGDPYSPLLSNQYPVP
766	GATA3	MEVTADQPRWVSHHHPAVLNGQHPDTHHPGLSHSYMDA AQYPLPEEVDVLFNIDGQGNHVPPYYGNSVRATVQRYPPT HHGSQVCRPPLLHGSLPWLDGGKALGSHHTASPWNLSPFS KTSIHHGSPGPLSVYPPASSSSLSGGHASPFLFTFPPTPKD VSPDPSLSTPGSAGSARQDEKECLKYQVPLPDSMKLESSHS RGSMTALGGASSSTHHPITTYPPYVPEYSSGLFPPSSLLGGS PTGFGCKSRPKARSSTGRECVNCGATSTPLWRRDGTGHYL CNACGLYHKMNGQNRPLIKPKRRLSAARRAGTSCANCQT TTTTLWRRNANGDPVCNACGLYKLNINRPLTMKKEGI QTRNRKMSSKSKKCKKVHDSLEDFPKNSSFNPAALSRHM SSLSHISPFSSHMLTTPTPMHPPSSLFSGPHHPSSMVTAM

		G
767	RORgt	MDRAPQRQHRASRELLAAKKTHTSQIEVIPCKICGDKSSGI HYGVITCEGCKGFFRRSQRCNAAYSCTRQQNCPIDRTSRN RCQHCRLOKCLALGMSRDAVKFGRMSKKQRDSLHAEVQ KQLQQRQQQQQEPVVKTPPAGAQQGADTLTYTLGLPDGQL PLGSSPDLPEASACPPGLLKASGSGPSYSNNLAKAGLNGAS CHLEYS PERGKAEGRESFYSTGSQ LTPDR CGLRFEEHRHPG LGELGQQPDSYGSPSFRSTPEAPYASLTEIEHLVQSVCKSY RETCQLRLEDLLRQRSNIFSRREEVTGYQRKSMWEMWERC AHLHTEAIQYVVEFAKRLSGFMELCQNDQIVLLKAGAME VVLVRMCRAYNADNRTVFFEGKYGGMELFRALGCSELIS SIFDFSHLSALHFSEDEIALYTALVLINAHRPGLQEKRKVE QLQYNLELAFHHHLCKTHRQSILAKLPPKGKLRSLCSQHV ERLQIFQHLHPIVVQAAFPLYKELFSTETESPVGLSK
768	Cd25	MEPCLLMWGILTFITVSGYTTDL CDDDPPNLKHATFKALT YKTGTVLNDC CERGFRRISSYMHCTGNSSHASWENKCQC KSISPENRKGKVTTKPEEQKGENPTEMQSQTTPMDEVDLV GHCREPPPWEHENS KRIYHFVVGQTLHYQCMQGFTALHR GPAKSICKTIFGKTRWTQPPLKCISESQFPDDEELQASTDAP AGRDTSSPFITTSTPDFHKHTEVATTMESFIFTTEYQIAVAS CVLLISIVLVSGLTWQRRRRKSRTI
769	Skp1	MPSIKLQSSDGEIFEVDVEIAKQSVTIKTMLEDLGMDDEGD DDPVPLPNVNAAILKKVIQWCTHHKDDPPPPEDDENKEKR TDDIPVWDQEFLKVDQGTLFELILAANYLDIKGLLDVTCK TVANMIKGKTPPEIRKTFNIKNDFTEEEEAQVRKENQWCE EK
770	Spy	MRKLTALFVASTLALGAANLAHAADTTTAAPADAKPMM HHKGKFGPHQDMMFKDLNL TDAQKQQIREIMKGQRDQM KRPPLEERRAMHDIIASDTFDKAKAEAQIAKMEEQRKAN MLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKG KMPATAE
771	Fkpa	MKSLFKVTLLATTMAVALHAPITFAAEAAKPATAADSKA AFKNDDQKSAYALGASLGRYMENSLKEQEKLGIKLDKDQ LIAGVQDAFADKSKLSDQEIEQTLQAFEARVKSSAQAKME

		KDAADNEAKGKEYREKFAKEKGVKTSSTGLVYQVVEAG KGEAPKSDTVVVNYKGTLDGKEFDNSYTRGEPLSFRLD GVIPGWTEGLKNIKKGGKIKLVIPPELAYGKAGVPGIPPNS TLVFDVELLDVVKPAPKADAKPEADAKAADSACK
772	Sura	MKNWKTLLLGIAMIAN TSFAAPQVVDKVA AVVNNGVVL ESDVDGLMQSVKLNAAQARQQLPDDATLRHQIMERLIMD QIILQMGQKMGVKISDEQLDQAIANIAKQNNMTLDQMRS RLAYDGLNYNTYRNQIRKEMIISEVRNNEVRRRITILPQEV ESLAQQVGNQNDASTE LNLSHILIPENPTSDQVNEAESQ ARAIVDQARNGADFGKLAIAHSADQQALNGGQMGWGRI QELPGIFAQALSTAKKGDIVGPIRSGVGFHILKVNDLRGES KNISVTEVHARHILLKPSIMTDEQARVKLEQIAADIKSGK TTF AAAAKEFSQDPGSANQGGDLGWATPDIFDPAFRDAL T RLNKGQMSAPVHSSFGWHLIELLDTRNVDKTDAAQKDRA YRMLMNRKFSEE AASWMQEQRASAYVKILSN
773	Hsp60	MLRVNSKSSIKTFVRHLSHKELKFGVEGRAALLKGVNTLA DAVSVTLGPKGRNVLIEQQFGAPKITKDGVTVAKAITLED KFEDLGAKLLQEVASKTNESAGDGTTSATVLGRSIFTESV KNVAAGCNPMDLRRGSQA AVEAVIEFLQKNKKEITTSEEI AQVATISANGDKHIGDLLANAMEKVGKEGVITVKEGKTL EDELEVTEGMKFDRGFISPYFITNTKTGKVEFENPLILLSEK KISSIQDILPSLELSNQTRRPLLIAEDVDGEALAACILNKL R GQVQVCAVKAPGFGDNRKNTLGDIAILSGGTVFTEELDIK PENATIEQLGSAGAVTITKEDTVLLNGEGSKDNLEARCEQI RSVIADVHTTEYEKEKLQERLAKLSGGVAVIKVGGASEVE VGEKKDRYEDALNATRAAVEEGILPGGGTALIKATKILDE VKEKAVNFDQKLGVDTIRAAITKPAKR IENAGEEGAVIVG KIYDEPEFNKGYDSQKGEFTDMIAAGIIDPFKVVKNGLVD ASGVASLLATTECAIVDAPQPKGSPAAPPAPGMGGMPGM F
774	Hsp70	MAPAVGIDLGTTYSCVGIFRDDRIEIIANDQGNRTTPSFVAF TDTERLIGDAAKNQVAMNPANTVFD AKRLIGRKFADPEV QADMKHFPFKITDKGGKPV IQVEFKGETKEFTPEEISSMVL TKMRETAEA YLGGTVNNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAG LIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDKKADGERNVLIFDLGGG

		TFDVSLLTIEEGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRLVNHFVSE FKRKFKKISPAERARALRRSPTACERAKRTLSSAAQTSIEID SLYEGIDFYTSITRARFEELCQDLFRSTMEPVERVLRDAKID KSSVHEIVLVGGSTRIPRIQKLVSDFFNGKEPNKSINPDEAV AYGAAVQAAILSGDTSSKSTNEILLDDVAPLSLGIETAGGV MTPLIKRNTTIPTKKSETFSTFSDNQPGLIQVFEGERARTK DNNLLGKFELTGIPRARGVPQIEVTFDVDANGIMNVSALE KGTRKTNKIVITNDKGRLSKEEIERMLAEAEKYKAEDEAE ASRIRPKNGLESYAYSLRNSLRHSKVDEKLEAGDKEKLKS EIDKTVQWLDENQTATKEEYESQKKELEAVANPIMMKFY AGGEGAPGGFPGAGGPGGFPGGPGAGHASGGGDDGPTVE EVDLKFPMPLPWQLSVRKMHRPFFLFLFLIFLIFLILFLF YFFLPVRFNESCFS
775	GroEL	MAAKDVKFGNDARVKMLRGVNVLADAVKVTLGPKGRN VVLDKSFGAPTITKDGVSVAAREIELEDKFENMGAQMVKE VASKANDAAGDGTATVLAQAIITEGLKAVAAGMNPMD LKRIGDKAVTAAVEELKALSVPCSDSKAIAQVGTISANSDE TVGKLI AEAMDKVGKEGVITVEDGTGLQDEL DVVEGMQF DRGYLSPYFINKPETGAVELESPFILLADKKISNIREMLPVL EAVAKAGKPLLI AEDVEGEALATLVVNTMRGIVKVA AV KAPGFGDRRKAMLQDIATLTGGTVISEEIGMELEKATLED LGQAKRVVINKDTTTIIDGVGEEAAIQGRVAQIRQQIEEAT SDYDREKLQERVAKLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKAR VEDALHATRAAVEEGVVAGGGVALIRVASKLADLRGQNE DQNVGIKVALRAMEAPLRQIVLNCGEEPSVVANTVKGGD GNYGYNAATEEYGNMIDMGILDPTKVTRSALQYAASVAG LMITTECMVTDLPKND AADLGAAGGMGGMGGMGGMM
776	GroES	MNIRPLHDRVIVKRKEVETKSAGGIVLTGSAAAKSTRGEV LAVGNRILENGEVKPLDVKVGDIVIFNDGYGVKSEKIDN EEVLIMSESDILAIVEA
777	Hsp90-alpha	MPEETQTQDQPMEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNK EIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDPSKLD SGKELHINLIPNK QDRTLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKSGTKAFMEALQA GADISMIGQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWE SSAGGSFTVRTDTGEPMGRGTKVILHLKEDQTEYLEE

		<p> RRIKEIVKKHSQFIGYPITLFEKERDKEVSDDEAEEKEDK EEKEKEEKESEDKPEIEDVGSDEEEEEKKDGDKKKKKKIK EKYIDQEELNKTPIWTRNPDDITNEEYGEFYKSLTNDWE DHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDL FENRKKKNNI KLYVRRVFIMDNCEELIPEYLN FIRGVV DSEDLPLNISR EMLQQSKILKVIRKNLVKKCLELFTELAEDKENYKKFYEQ FSKNIKLGIHEDSQNRK KLS ELLRYYTSASGDEMVS LKDY CTRMKENQKHYYITGETKDQVANS AFVERLRKHGLEVIY MIEPIDEYCVQQLKEFEGKTLVSVTKEGLELPEDEEEKKKQ EEKKTKFENLCKIMKDILEKKVEKV VVSNRLVTSPCCIV TSTYGWTANMERIMKAQALRDNSTMGYMAAKKHLEINP DHSIETLRQKAEADKNDKSVKDLVILL YETALLSSGFSLE DPQTHANRIYRMIKLG LGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPPL EGDDDTSRMEEVD </p>
778	HtpG	<p> MKGQETRGFQSEVKQLLHLMIHSLYSNKEIFLRELISNASD AADKLRFRALSNPDL YEGDGELRVRVSFDKDKRTL TISDN GVGMTRDEVIDHLGTIAKSGTKSFLESLGSDQAKDSQLIG QFGVGFYSAFIVADKVTVRTRAAGEKPENG VFWESAGEG EYTVADITKEDRGTEITLHLREGEDEF LDDWRVRSISKY SDHIALPVEIEKREEKDGETVISWEKINKA QALWTRNKSEI TDEEYKEFYKHIAHDFNDPL TWSHNRVEGKQEYTSLLYIP SQAPWDMWNRDHKHGLKLYVQRVFIMDDAEQFMPNYL RFVRGLIDSSDLPLNVSREILQDSTVTRNLRN ALTKRVLQMLEKLAKDDAEKYQTFWQQFGL VLKEGPAE DFANQEAIAKLLRFASHTDSSAQTVSLEDYVSRMKEGQE KIYYITADSYAAKSSPHLELLRKKGIEVLLL SDRIDEWM MNYLTEFDGKPFQSVSKVDESLEKL ADEVDESAKEAEKA LTPFIDRVKALLGERVKDVRLTHRL TDTPAIVSTDADEMST QM AKLFAAAGQKVPEVKYIFELNPDHVL VKRAADTEDEAKF SEWVELLLDQALLAERGTLEDPNLFIRRMNQLLVS </p>
779	Hsp40	<p> MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEP GAEKFKIEIAEAYDVLSDPRKREIFDRY GEEGLKGS GSPSGG SGGGANGTSFSYTFHGDPHAMFAEFFGGRNPFDTFFGQRN GEEGMDIDDPFSGFPMGMGGFTNVNFGRSRSAQEPARKK </p>

		<p>QDPPVTHDLRVSLEEIYSGCTKKMKISHKRLNPDGKSIRNE DKILTIEVKKGWKEGTKITFPKEGDQTSNNIPADIVFVLKD KPHNIFKRDGSDVIYPARISLREALCGCTVNVPTLDGRTIPV VFKDVIRPGMRRKVPGEGLPLPKTPEKRGDLIEFEVIFPERI PQTSRTVLEQVLPI</p>
780	ClpP	<p>MWPGILVGGARVASCYPALGPRLAAHFPAQRPPQRTLQ NGLALQRCLHATATRALPLIPIVVEQTGRGERAYDIYSRLL RERIVCVMGPIDDSVASLVIAQLLFLQSESNKKPIHMYINSP GGVVTAGLAIYDTMQYILNPICWCVGQAASMGSLLLAA GTPGMRHSLPNSRIMIHQPSGGARGQATDIAIQAEEMKLLK KQLYNIYAKHTKQSLQVIESAMERDRYMSPMEAQEFGILD KVLVHPPQDGEDEPTLVQKEPVEAAPAAEPVPAST</p>
781	ClpX	<p>MPSCGACTCGAAAVRLITSSLASAQRGISGGRIHMSVLGR LGTFFETQILQRAPLRSFTETPAYFASKDGISKDGS GDGNKK SASEGSSKKS GSGNSGKGG</p> <p>NQLRCPKCGDLCTHVETFVSSTRFVKCEKCHHFFVVLSEA DSKKSIIKEPESAAEAVKLAFQKPPPPPKKIYNYLDKYVV GQSFARKVLSVA VYNHYKRIYNNIPANLRQQA EVEKQTSL TPRELEIRRREDEYRFTKLLQIAGISPHG</p> <p>NALGASMQQQVNQQIPQEKRGGEVLDSSHDDIKLEKSNIL LLGPTGSGKTLAQTAKCLDVPFAICDCTTLTQAGYVGE DIESVIAKLLQDANYNVEKAQQGIVFLDEVDKIGSVPGIHQ LRDVGEGEVQQGLLKLLEGTIVNVPEKNSRKL RGETVQV DTTNILFVASGAFNGLDRIISRRKNEKYLGFGTSPNLGKG RRAAAAADLANRSGESNTHQDIEEKDRLLRHVEARDLIEF GMIPEFVGRLPVVVPLHSLDEKTLVQILTEPRNAVIPQYQA LFSMDKCELVNTE DALKAIARLALERKTGARGLR SIMEKL LLEPMFEVPNSDIVCVEVDKEVVEGKKEPGYIRAPT KESSE EEYDSGVEEEGWPRQADAANS</p>
782	CDKN1C	<p>MSDASLRSTSTMERLVARGTFPVLVRTSACRSLFGPVDHE ELSRELQARLAELNAEDQNRWDYDFQQDMPLRGPGR LQ WTEVSDSDSVP AFYRETVQVGRCRLLLAPRPVAVAVAVSP PLEPAAESLDGLEEAPEQLPSVPVPAPASTPPPVPVLAPAPA PAPAPVAAPVAAPVAVAVLAPAPAPAPAPAPAPAPVAAPA PAPAPAPAPAPAPAPAPDAAPQESAEQGANQGQRGQEPLA</p>

		DQLHSGISGRPAAGTAAASANGAAIKKLSGPLISDFFAKRK RSAPEKSSGDVPAPCSPSAAPGVGSVEQTPRKRLR
783	ингибитор BAX	MNIFDRKINFDALLKFSHITPSTQQHLKKVYASFALCMFVA AAGAYVHMVTHFIQAGLLSALGSLILMIWLMATPHSHETE QKRLGLLAGFAFLTGVGLGPALEFCIAVNPSILPTAFMGTA MIFTCFTLSALYARRRSYLFLGGILMSALSLLLLSSLGNVFF GSIWLFQANLYVGLVVMCGFVLFDTQLIEKAEHGD
784	codA	MSNNALQTIINARLPGEGLWQIHLQDGKISAIDAQSGVM PITENSLDAEQGLVIPPFVEPHIHLDTTQTAGQPNWNQSGT LFEGIERWAERKALLTHDDVKQRAWQTLKWQIANGIQHV RTHVDVSDATLTALKAMLEVKQEVAPWIDLQIVAFPQEGI QDYIWHCIDLFLDFITVFRKLMMLAMNEKDKKKEKKSLSY PNGEALLEEALRLGADVVGAIHPHFETREYGVESLHKTF LAQKYDRLIDVHCDEIDDEQSRFVETVAALAHHEGMGAR VTASHTTAMHSYNGAYTSRLFRLKMSGINFVANPLVNIH LQGRFDTPKRRGITRVKEMLESGINVCFGHDDVDFPWYP LGTANMLQVLHMGLHVCQLMGYGQINDGLNLITHHSART LNLQDYGIAAGNSANLILPAENGFDALRRQVPVRYSVRG GKVIASTQPAQTTVYLEQPEAIDYKR

[0692] В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК или предшественник РНК (например предшественник линейной РНК), раскрытые в настоящем документе, содержат последовательность, приведенную в Таблице 29.

[0693] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или белок, кодируемый полинуклеотидом, содержит последовательность со сходством по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% с одной или несколькими раскрытыми в данном документе последовательностями. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или белок, кодируемый полинуклеотидом, содержит последовательность, идентичную одной или нескольким последовательностям, раскрытым в настоящем документе.

[0694] В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления. Варианты этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области после прочтения вышеприведенного описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие варианты по мере необходимости, и авторы изобретения предполагают, что изобретение будет осуществлено иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, это изобретение включает в себя все модификации и эквиваленты предмета, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, как это разрешено применимым законодательством.

Более того, любое сочетание вышеописанных элементов во всех их возможных вариантах охватывается изобретением, если иное не указано в настоящем документе или иным образом явно не противоречит контексту.

[0695] Wesselhoeft et al., (2019) RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In vivo. *Molecular Cell*. 74(3), 508-520 and Wesselhoeft et al., (2018) Engineering circular RNA for Potent and Stable Translation in Eukaryotic Cells. *Nature Communications*. 9, 2629 полностью включены посредством ссылки.

[0696] Изобретение дополнительно подробно описано со ссылкой на следующие примеры, но не предполагается, что оно ограничено следующими примерами. Эти примеры охватывают любые и все варианты иллюстраций с намерением предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как создать и использовать предмет изобретения, и не предназначены для ограничения объема того, что считается предметом изобретения.

ПРИМЕР 1

Пример 1А: Области внешней гомологии обеспечивают циркуляризацию длинного предшественника РНК с использованием стратегии циркуляризации с перестановкой экзонов и интронов (PIE).

[0697] Последовательность из 1100 нуклеотидов, содержащая полноразмерный IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia* (GLuc) и два коротких фрагмента экзона конструкции с перестановкой экзонов и интронов (PIE), вставляли между 3'- и 5'-интронами каталитического интрона группы I с перестановкой в гене тимидилатсинтазы (Td) фага T4. Предшественник РНК синтезировали методом прерванной транскрипции. Была предпринята попытка циркуляризации путем нагревания предшественника РНК в присутствии ионов магния и GTP, но продукты сплайсинга не были получены.

[00698] Идеально комплементарные области гомологии длиной 9 нуклеотидов и 19 нуклеотидов были сконструированы и добавлены на 5'- и 3'-концы предшественника РНК. Добавление этих плечей гомологии увеличило эффективность сплайсинга с 0 до 16% для областей гомологии с 9 нуклеотидами и до 48% для областей гомологии с 19 нуклеотидами, что оценивалось по исчезновению полосы предшественника РНК.

[0699] Продукт сплайсинга обрабатывали РНКазой R. Секвенирование предполагаемой границы сплайсинга в реакциях сплайсинга с обработкой РНКазой R, выявило лигированные экзоны, а расщепление в реакции сплайсинга с обработкой РНКазой H, нацеленной на олигонуклеотиды РНКазой H, давало единственную полосу в отличие от двух полос, полученных линейным предшественником, расщепленным РНКазой H. Это показывает, что кольцевая РНК является основным продуктом реакций сплайсинга предшественника РНК, содержащей области внешней гомологии длиной 9 или 19 нуклеотидов.

Пример 1В: Спейсеры, которые сохраняют вторичные структуры сайтов сплайсинга IRES и PIE, повышают эффективность циркуляризации.

[0700] Ряд спейсеров был разработан и вставлен между 3'-сайтом сплайсинга PIE и IRES. Эти спейсеры были разработаны либо для сохранения, либо для разрушения вторичных структур внутри последовательностей интронов в IRES, 3'-сайте сплайсинга PIE и/или 5'-сайте сплайсинга. Добавление спейсерных последовательностей, предназначенных для сохранения вторичных структур, привело к эффективности сплайсинга 87%, в то время как добавление разрушающих спейсерных последовательностей привело к отсутствию обнаруживаемого сплайсинга.

ПРИМЕР 2

Пример 2А: внутренние области гомологии в дополнение к внешним областям гомологии создают сплайсинговый пузырь и позволяют транслировать несколько последовательностей экспрессии.

[0701] Спейсеры были сконструированы так, чтобы они были неструктурированными, негомологичными последовательностям интрона и IRES и содержали области гомологии спейсер-спейсер. Их вставляли между 5'-экзоном и IRES и между 3'-экзоном и последовательностью экспрессии в конструкциях, содержащих области внешней гомологии, EMCV IRES и последовательности экспрессии для люциферазы *Gaussia* (общая длина: 1289 нт), люциферазы светлячка (2384 нт), EGFP (1451 нт), человеческого эритропоэтина (1313 нт) и эндонуклеазы Cas9 (4934 нт). Циркуляризация всех 5 конструкций была достигнута. Циркуляризация конструкций с использованием интронов фага T4 и *Anabaena* была примерно одинаковой. Эффективность циркуляризации была выше для более коротких последовательностей. Для измерения трансляции каждую конструкцию трансфицировали в клетки HEK293. Клетки, трансфицированные люциферазой *Gaussia* и Firefly, давали устойчивый ответ, измеренный по люминесценции, человеческий эритропоэтин определялась в среде клеток, трансфицированных эритропоэтиновой circRNA, а флуоресценция EGFP наблюдалась в клетках, трансфицированных EGFP circRNA. Совместная трансфекция circRNA Cas9 с sgRNA, направленной против GFP, в клетки, конститутивно экспрессирующие GFP, приводила к исчезновению флуоресценции до 97% клеток по сравнению с контролем, содержащим только sgRNA.

Пример 2В: Использование CVB3 IRES увеличивает продукцию белка.

[0702] Были получены конструкции с областями внутренней и внешней гомологии и отличающиеся IRES, содержащие последовательности экспрессии либо люциферазы *Gaussia*, либо люциферазы Firefly. Продукцию белка измеряли по люминесценции в супернатанте клеток HEK293 через 24 часа после трансфекции. Конструкция IRES вируса Коксаки В3 (CVB3) продуцировала наибольшее количество белка в обоих случаях.

Пример 2С: Использование спейсеров polyA или polyAC увеличивает продукцию белка.

[0703] Спейсеры polyA- или polyAC длиной тридцать нуклеотидов добавляли между IRES и границей сплайсинга в конструкции с каждым IRES, который продуцировал белок в примере 2В. Активность люциферазы *Gaussia* измеряли по люминесценции в

супернатанте клеток НЕК293 через 24 часа после трансфекции. Оба спейсера улучшали экспрессию в каждой конструкции по сравнению с контрольными конструкциями без спейсеров.

ПРИМЕР 3

Клетки НЕК293 или HeLa, трансфицированные кольцевой РНК, продуцируют больше белка, чем клетки, трансфицированные сопоставимой немодифицированной или модифицированной линейной РНК.

[0704] Очищенную HPLC circRNA, кодирующую люциферазу *Gaussia* (CVB3-GLuc-pAC), сравнивали с канонической немодифицированной линейной мРНК GLuc, кэпированной 5'-метилгуанозином и 3'-хвост polyAом, и коммерчески доступной с модифицированным нуклеозидом (псевдоуридин, 5-метилцитозин) линейной мРНК GLuc (от Trilink). Люминесценцию измеряли через 24 часа после трансфекции, показывая, что circRNA продуцирует на 811,2% больше белка, чем немодифицированная линейная мРНК в клетках НЕК293, и на 54,5% больше белка, чем модифицированная мРНК. Аналогичные результаты были получены в клетках HeLa и при сравнении оптимизированной circRNA, кодирующей эритропоэтин человека, с линейной мРНК, модифицированной 5-метоксиуридином.

[0705] Данные люминесценции собирали в течение 6 дней. В клетках НЕК293 трансфекция circRNA приводила к периоду полужизни продукции белка 80 часов по сравнению с 43 часами при немодифицированной линейной мРНК и 45 часами при модифицированной линейной мРНК. В клетках HeLa трансфекция circRNA приводила к периоду полужизни белка, равному 116 часам, по сравнению с 44 часами при немодифицированной линейной мРНК и 49 часами при модифицированной линейной мРНК. CircRNA давала значительно больше белка, чем немодифицированная и модифицированная линейные мРНК за время своего существования в клетках обоих типов.

ПРИМЕР 4

Пример 4А: Очистка circRNA путем расщепления РНКазой, очистки HPLC и обработки фосфатазой снижает иммуногенность. Полностью очищенная кольцевая РНК значительно менее иммуногенна, чем неочищенная или частично очищенная кольцевая РНК. Стабильность экспрессии белков и жизнеспособность клеток зависят от типа клеток и чистоты кольцевой РНК.

[0706] Клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293) и карциномы легкого человека A549 трансфицировали:

- продуктами неочищенной кольцевой РНК GLuc в реакции сплайсинга,
- продуктами расщепления РНКазой R в реакции сплайсинга,
- продуктами расщепления РНКазой R и очистки HPLC в реакции сплайсинга, или
- продуктами расщепления РНКазой, очистки HPLC и обработки фосфатазой в реакции сплайсинга.

[0707] Расщепление РНКазой R в реакциях сплайсинга было недостаточным для предотвращения высвобождения цитокинов в клетках A549 по сравнению с

нетрансфицированными контролями.

[0708] Добавление очистки HPLC также было недостаточным для предотвращения высвобождения цитокинов, хотя наблюдалось значительное снижение интерлейкина-6 (IL-6) и значительное увеличение интерферона- α 1 (IFN- α 1) по сравнению с неочищенной реакцией сплайсинга.

[0709] Добавление обработки фосфатазой после очистки HPLC и перед расщеплением РНКазой R резко снижало экспрессию всех активированных цитокинов, оцененных в клетках A549. Секретируемый хемоаттрактантный белок 1 моноцитов (MCP1), IL-6, IFN- α 1, фактор некроза опухоли α (TNF α) и белок-10, индуцируемый IFN γ (IP-10), упал до неопределяемого или нетрансфицированного исходного уровня.

[0710] Не было значительного высвобождения цитокинов в клетках HEK293. Клетки A549 имели повышенную стабильность экспрессии GLuc и жизнеспособность клеток при трансфекции кольцевой РНК более высокой чистоты. Полностью очищенная кольцевая РНК имела стабильный фенотип, аналогичный фенотипу трансфицированных клеток 293.

Пример 4B: кольцевая РНК не вызывает значительной иммуногенности и не является лигандом RIG-I.

[0711] Клетки A549 трансфицировали продуктами реакции сплайсинга:

[0712] Клетки A549 трансфицировали:

- неочищенной кольцевой РНК,
- высокомолекулярными (цепочками линейной и кольцевой) РНК,
- кольцевой (содержащей разрыв) РНК,
- ранней фракцией очищенной кольцевой РНК (большее совпадение с пиком содержащей разрыв РНК),
- поздней фракцией очищенной кольцевой РНК (меньшее перекрытие с пиком содержащей разрыв РНК),
- интронами, вырезанными во время циркуляризации, или
- переносчиком (то есть нетрансфицированным контролем).

[0713] Предшественник РНК синтезировали отдельно и очищали в форме мутанта с делецией сайта сплайсинга (DS) из-за трудностей с получением достаточно чистого предшественника линейной РНК в результате реакции сплайсинга. В каждом случае измеряли высвобождение цитокинов и жизнеспособность клеток.

[0714] Сильное высвобождение IL-6, RANTES и IP-10 наблюдали в ответ на большинство видов, присутствующих в реакции сплайсинга, а также на предшественник РНК. Ранние фракции *circRNA* вызывали цитокиновый ответ, сравнимый с другими фракциями, не относящимися к *circRNA*, что указывает на то, что даже относительно небольшие количества примесей линейной РНК способны индуцировать значительный клеточный иммунный ответ в клетках A549. Поздние фракции *circRNA* не вызывали цитокинового ответа, превышающего ответ у нетрансфицированного контроля. Жизнеспособность клеток A549 через 36 часов после трансфекции была значительно выше для поздних фракций *circRNA* по сравнению со всеми другими фракциями.

[0715] Анализировали индукцию транскриптов RIG-I и IFN- β 1 при трансфекции клеток A549 фракциями HPLC поздней circRNA, предшественниками РНК или неочищенными реакциями сплайсинга. Индукция транскриптов как RIG-I, так и IFN- β 1 была слабее для поздних фракций circRNA, чем для предшественников РНК и неочищенных реакций сплайсинга. Одной только обработки реакций сплайсинга РНКазой R было недостаточно для устранения этого эффекта. Добавление очень малых количеств 3p-hpRNA лиганда RIG-I к кольцевой РНК индуцировало существенную транскрипцию RIG-I. В клетках HeLa трансфекция реакций сплайсинга, расщепленных РНКазой R, индуцировала RIG-I и IFN- β 1, но очищенная circRNA этого не делала. В целом клетки HeLa были менее чувствительны к загрязняющим видам РНК, чем клетки A549.

[0716] Временной эксперимент по наблюдению за индукцией транскриптов RIG-I, IFN- β 1, IL-6 и RANTES в течение первых 8 часов после трансфекции клеток A549 реакциями сплайсинга или полностью очищенной circRNA не выявил преходящего ответа на circRNA. Очищенная circRNA также не смогла индуцировать провоспалительные транскрипты в мышинных макрофагах RAW264.7.

[0717] Клетки A549 трансфицировали очищенной circRNA, содержащей последовательность экспрессии EMCV IRES и EGFP. Это не привело к существенной индукции провоспалительных транскриптов. Эти данные демонстрируют, что некольцевые компоненты реакции сплайсинга ответственны за иммуногенность, наблюдаемую в предыдущих исследованиях, и что circRNA не является естественным лигандом для RIG-I.

ПРИМЕР 5

Кольцевая РНК не поддается обнаружению TLR.

[0718] Репортерные клеточные линии TLR 3, 7 и 8 трансфицировали множеством конструкций линейной или кольцевой РНК и измеряли секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP).

[0719] Переведенную в линейную форму РНК конструировали путем удаления последовательностей интрона и плеча гомологии. Затем конструкции линейной РНК обрабатывали фосфатазой (в случае кэпированных РНК после кэпирования) и очищали с помощью HPLC.

[0720] Ни одна из попыток трансфекции не вызывала ответа в репортерных клетках TLR7. Репортерные клетки TLR3 и TLR8 активировали кэпированной переведенной в линейную форму РНК, polyАденилированной переведенной в линейную форму РНК, фракцией HPLC содержащей разрыв кольцевой РНК и ранней фракцией кольцевой РНК. Поздняя фракция circRNA и m1 ψ -мРНК не вызывали TLR-опосредованного ответа ни в одной клеточной линии.

[0721] Во втором эксперименте circRNA переводили в линейную форму с использованием двух способов: обработка circRNA нагреванием в присутствии ионов магния и расщепление РНКазой H под управлением ДНК-олигонуклеотидов. Оба метода дали большую часть линейной РНК полной длины с небольшим количеством интактной circRNA. Репортерные клетки TLR3, 7 и 8 трансфицировали кольцевой РНК, кольцевой

РНК, расщепленной нагреванием, или кольцевой РНК, расщепленной РНКазой H, и секрецию SEAP измеряли через 36 часов после трансфекции. Репортерные клетки TLR8 секретировали SEAP в ответ на обе формы деградированной кольцевой РНК, но не давали большего ответа на трансфекцию кольцевой РНК, чем имитация трансфекции. Не наблюдалось активации репортерных клеток TLR3 и TLR7 в деградированных или интактных условиях, несмотря на активацию TLR3 переведенной в линейную форму РНК, транскрибированной *in vitro*.

ПРИМЕР 6

Немодифицированная кольцевая РНК вызывает повышенную устойчивую экспрессию белка *in vivo*, чем линейная РНК.

[0722] Мышам вводили инъекции, и клетки HEK293 трансфицировали немодифицированными и m1ψ-модифицированными линейными мРНК и circRNA человеческого эритропоэтина (hEpo). Эквимоллярная трансфекция m1ψ-мРНК и немодифицированной circRNA приводила к устойчивой экспрессии белка в клетках HEK293. Линейная мРНК hEpo и circRNA демонстрировали сходные относительные модели экспрессии белка и жизнеспособность клеток по сравнению с линейной мРНК и circRNA GLuc при трансфекции клеток HEK293 и A549 одинаковой массы.

[0723] У мышей hEpo обнаруживали в сыворотке после инъекции circRNA или линейной мРНК hEpo в висцеральный жир. hEpo, обнаруженный после инъекции немодифицированной circRNA, распадался медленнее, чем hEpo из немодифицированной или m1ψ-мРНК, и все еще присутствовал через 42 часа после инъекции. Уровень hEpo в сыворотке быстро снижался при введении неочищенной circRNA реакции сплайсинга или немодифицированной линейной мРНК. Инъекция неочищенных продуктов реакций сплайсинга вызывала цитокиновый ответ, обнаруживаемый в сыворотке, который не наблюдался для других РНК, включая очищенную circRNA.

ПРИМЕР 7

Кольцевая РНК может быть эффективно доставлена *in vivo* или *in vitro* с помощью липидных наночастиц.

[0724] Очищенную кольцевую РНК превращали в липидные наночастицы (LNP) с ионизируемым липидом cKK-E12 (Dong et al., 2014; Kauffman et al., 2015). Частицы образовывали однородные многослойные структуры со средним размером, индексом полидисперсности и эффективностью инкапсуляции, аналогичными частицам, содержащим коммерчески доступную контрольную линейную мРНК, модифицированную 5moU.

[0725] Очищенная circRNA hEpo демонстрировала более высокую экспрессию, чем 5moU-мРНК, при инкапсулировании в LNP и добавлении в клетки HEK293. Стабильность экспрессии из LNP-РНК в клетках HEK293 была аналогична стабильности РНК, доставляемой реагентом для трансфекции, за исключением небольшой задержки распада как для 5moU-мРНК, так и для circRNA. Как немодифицированная circRNA, так и 5moU-мРНК не активировали RIG-I/IFN-β1 *in vitro*.

[0726] У мышей LNP-РНК доставляли путем местной инъекции в висцеральную жировую ткань или внутривенно доставляли в печень. Экспрессия hЕго в сыворотке из circRNA была ниже, но сравнима с экспрессией из 5moU-мРНК через 6 часов после доставки в обоих случаях. Сывороточный hЕго, обнаруженный после инъекции в жировую ткань немодифицированной LNP-circRNA, распадался медленнее, чем hЕго из LNP-5moU-мРНК, при этом в сыворотке наблюдалась задержка затухания экспрессии, аналогичная наблюдаемой *in vitro*, но сывороточный hЕго после внутривенной инъекции LNP-circRNA или LNP-5moU-mRNA распались примерно с одинаковой скоростью. Ни в одном из этих случаев не было повышения сывороточных цитокинов или локальной индукции транскриптов RIG-I, TNF α или IL-6.

ПРИМЕР 8

Пример 8А: Экспрессия и функциональная стабильность с помощью IRES в клетках HEK293, HepG2 и 1C1C7.

[0727] Конструкции, содержащие области интрона/экзона anabaena, последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia* и различные IRES, были циркуляризованы. 100 нг продуктов каждой реакции циркуляризации отдельно трансфицировали в 20000 клеток HEK293, клеток HepG2 и клеток 1C1C7 с использованием Lipofectamine MessengerMax. Люминесценцию в каждом супернатанте оценивали через 24 часа как меру экспрессии белка. В клетках HEK293 конструкции, содержащие Crohivirus B, Salivirus FHB, вирус Aichi, Salivirus HG-J1 и Enterovirus J IRES, продуцировали наибольшую люминесценцию через 24 часа (фиг. 1А). В клетках HepG2 конструкции, содержащие вирус Aichi, Salivirus FHB, EMCV-Cf и CVA3 IRES, давали высокую люминесценцию через 24 часа (фиг. 1В). В клетках 1C1C7 конструкции, содержащие Salivirus FHB, вирус Aichi, Salivirus NG-J1 и Salivirus A SZ-1 IRES, давали высокую люминесценцию через 24 часа (фиг. 1С).

[0728] Наблюдалась тенденция увеличения IRES, вызывающего большую люминесценцию через 24 часа. Более короткая общая длина последовательности имеет тенденцию к увеличению эффективности циркуляризации, поэтому выбор высокой экспрессии и относительно короткого IRES может привести к улучшенной конструкции. В клетках HEK293 конструкция с использованием IRES Crohivirusa B давала самую высокую люминесценцию, особенно по сравнению с другими IRES аналогичной длины (фиг. 2А). График экспрессии из конструкций IRES в клетках HepG2 и 1C1C7 в зависимости от размера IRES представлен на фиг. 2В и 2С.

[0729] Функциональную стабильность выбранных конструкций IRES в клетках HepG2 и 1C1C7 измеряли в течение 3 дней. Люминесценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* в супернатанте измеряли каждые 24 часа после трансфекции 20000 клеток 100 нг продуктов каждой реакции циркуляризации с последующей полной заменой среды. Salivirus A GUT и Salivirus FHB проявляли самую высокую функциональную стабильность в клетках HepG2, а Salivirus N-J1 и Salivirus FHB давали наиболее стабильную экспрессию в клетках 1C1C7 (фиг. 3А и 3В).

Пример 8В: Скринирование дополнительных IRES

[0730] Измеряли функциональную стабильность дополнительных конструкций IRES в клетках HEK293. Вкратце, интересующие 5'-нетранслируемые области (UTR) были идентифицированы из GenBank. Выбранные UTR были укорочены до 675 нуклеотидов с 5'-конца и вставлены в каркасную конструкцию кольцевой РНК, кодирующую люциферазу *Gaussia (Gluc)*, и перед кодирующей областью *Gluc*. Кольцевые РНК трансфицировали в клетки HEK293. Через 24 часа супернатанты собирали и измеряли люминесценцию секретируемого белка *Gluc* с использованием коммерчески доступных реагентов. Результаты представлены на фиг. 1D и 1E и в таблице 30, что свидетельствует о том, что многие природные последовательности IRES усиливают экспрессию белка в контексте кольцевой РНК.

Таблица 30

SEQ ID NO	IRES	Экспрессия	SEQ ID NO	IRES	Экспрессия
413	RhPV	1,10E+05	553	Pestivirus вилорогой антилопы	1,35E+06
414	Halastavi arva (1x mut)	9,46E+04	554	Pestivirus свиней изолят Bungowannah	1,10E+07
415	Oscivirus	4,55E+07	555	Pestivirus свиней 1	9,46E+04
416	Cadicivirus B	2,10E+05	556	Pestivirus жирафа-1	4,72E+05
417	PSIV (2x mut для Xba1)	9,70E+04	557	вирус классической чумы свиней	3,16E+05
418	PSIV IGR	1,01E+05	558	Pegivirus человека изолят JD2B11	6,85E+05
419	PV Mahoney	1,09E+05	559	Pegivirus человека изолят GBV-C-ZJ	N/A
420	REV A	9,44E+04	560	Pegivirus человека изолят JD2B8C	5,36E+05
421	Tropivirus A	9,52E+04	561	вирус гепатита GB A	N/A
422	Symapivirus A	1,27E+05	562	Pegivirus обезьян	8,56E+04
423	SaKobuvirus FFUP1 (1x mut)	8,82E+06	563	Pegivirus I	8,02E+04
424	Rosavirus C NFSM6F	6,84E+05	564	Pegivirus K	8,07E+04
425	Rosavirus 2 GA7403	5,05E+06	565	Вирус, связанный с	7,84E+04

				заболеванием Тейлера	
426	Rhinaвирус А	8,42E+05	566	pegivirus грызунов	1,79E+05
427	Rafivirus LPXY C222841	2,22E+05	567	Pegivirus человека 2	3,14E+05
428	Rafivirus WHWGGF74766	4,53E+06	568	GB вирус С/вирус гепатита G	1,36E+05
429	Poecivirus BCCH- 449	3,43E+05	569	Pegivirus лошадей 1	8,80E+04
430	Megirivirus LY	1,80E+06	570	Culex theileri Flavivirus	8,52E+04
431	Megirivirus E	1,10E+07	571	вирус Bussuquara	8,20E+04
432	Megirivirus C	1,24E+05	572	Вирус Zika	8,61E+04
433	Ludopivirus	1,05E+05	573	вирус Yokose	8,55E+04
434	Livupivirus	2,10E+05	574	вирус Wesselsbron	N/A
435	Aichivirus FSS693	6,25E+07	575	heracivirus лошадей	8,40E+04
436	Aichivirus KVGH	1,72E+07	576	Heracivirus B	8,84E+04
437	Aichivirus DV	7,79E+07	577	Heracivirus I	7,50E+04
438	Kobuvirus Мышей 1	1,60E+07	578	Heracivirus J	7,65E+04
439	Kobuvirus Свиной K-30	N/A	579	Heracivirus K	8,91E+04
440	Kobuvirus Свиной XX	1,32E+07	580	Icavirus	4,41E+06
441	Kobuvirus Коз 12Q108	2,87E+08	581	вирус Antarctic pEnguin A	8,42E+04
442	Kobuvirus Кроликов	3,73E+07	582	Arterivirus лесных сумчатых белохвостых крыс	N/A
443	Aalivirus	2,65E+05	583	Avisivirus Pf-CHK1	1,19E+05
444	Grusopivirus A	1,09E+05	584	paramyxovirus pEnguin птиц	9,91E+04
445	Grusopivirus B	2,12E+05	585	Вирус ньюкаслской болезни	8,86E+04
446	YanchEng osbecks	1,57E+06	586	Нр-бетаCoronavirus	8,47E+04

	grenadier anchovy Picornavirus			Летучих мышей	
447	Gallivirus индеек M176	4,37E+05	587	Basella alba endornavirus	7,65E+04
448	Falcovirus A1	1,48E+05	588	Nidovirus королевского питона	8,25E+04
449	Tremovirus B	1,31E+05	589	sapelovirus Летучих мышей	8,05E+04
450	Didelphis aurita HAV	1,38E+05	590	Picornavirus Летучих мышей 3	N/A
451	Hepatovirus G1	1,41E+05	591	Picornavirus Летучих мышей 2	7,99E+07
452	Hepatovirus D	1,47E+06	592	Picornavirus Летучих мышей 1	1,85E+07
453	Hepatovirus H2	1,08E+05	593	Iflavirus Летучих мышей	9,76E+04
454	Hepatovirus I	8,79E+05	594	dicibavirus Летучих мышей	7,43E+04
455	Hepatovirus C	5,08E+05	595	БетаCoronavirus HKU24	8,96E+04
456	Fipivirus A	2,69E+05	596	БетаCoronavirus England 1	8,74E+04
457	Fipivirus C	1,09E+05	597	Boone Cardiovirus 1	2,62E+06
458	Fipivirus E	1,10E+05	598	вирус Breda	1,16E+05
459	Aquamavirus	4,51E+06	599	вирус вирусной диареи крупного рогатого скота 3	2,70E+06
460	Avisivirus A	1,91E+05	600	вирус ринита А Крупного рогатого скота	3,62E+06
461	Avisivirus B	8,68E+04	601	Picornavirus Крупного рогатого скота изолят ТСН6	1,21E+05
462	Crohivirus A	9,96E+04	602	nidovirus Крупного	1,17E+05

				рогатого скота ТСН5	
463	Kunsagivirus B	8,01E+04	603	herpesvirus Крупного рогатого скота	1,89E+05
464	Limnipivirus A	8,30E+04	604	Botrytis cinerea Mitovirus 4 RdRp	9,68E+04
465	Limnipivirus C	1,35E+05	605	Botrytis cinerea Mitovirus 2 RdRp	8,73E+04
466	Orivirus	6,09E+05	606	picodicrovirus Собак штамм 209	2,79E+06
467	HAV FH1	1,24E+05	607	Вирус собачьей чумки	3,02E+05
468	HAV HM175	4,96E+05	608	Kobuvirus Собак	1,48E+08
469	Parechovirus F	6,56E+05	609	альфаCoronavirus Верблюдов	2,48E+05
470	Parechovirus D	3,10E+05	610	Cripavirus	1,95E+05
471	Parechovirus C	1,24E+06	611	вирус коксаки человека A2	7,75E+07
472	Ljungan Вирус 87- 012	2,00E+06	612	Coronavirus AcCoV- JC34	1,82E+05
473	Parechovirus A2	1,80E+07	613	Picornavirus кур 3	9,13E+04
474	Parechovirus A3	3,58E+06	614	Picornavirus кур 1	1,21E+05
475	Parechovirus A8	1,61E+07	615	Orivirus Кур 1	3,16E+05
476	Parechovirus A17	1,20E+06	616	Gallivirus Кур 1	1,51E+07
477	Potamipivirus A	8,43E+05	617	calicivirus Кур	1,28E+05
478	Potamipivirus B	7,20E+05	618	Picornavirus карпов 1	1,13E+05
479	Beihai Conger Picornavirus	1,15E+06	619	Picornavirus соколов	3,08E+06
480	Sapelovirus Свиней JD2011	N/A	620	вирус ринита В лошадей 1	1,01E+05
481	Sapelovirus Свиней A2	4,34E+06	621	вирус ринита лошадей А	3,73E+05
482	Sapelovirus Обезьян 1	6,55E+07	622	вирус артериита лошадей	1,89E+05
483	Sapelovirus Обезьян 2	4,24E+07	623	Enterovirus sp. Изолят CPML	6,83E+07

484	Rabovirus C	2,49E+06	624	Enterovirus AN12	3,87E+06
485	Rabovirus NYC-B10	1,24E+06	625	Morbillivirus дельфинов	1,22E+05
486	PaRabovirus C	1,83E+07	626	вирус Dianke	1,35E+05
487	PaRabovirus B	7,85E+06	627	Guereza hepacivirus	1,38E+05
488	PaRabovirus A3	2,44E+08	628	Grapevine associated Narnavirus-1	1,30E+05
489	Felipivirus 127F	8,92E+06	629	Torovirus коз	1,19E+05
490	Boosepivirus A	7,07E+07	630	вирус Ящура О изолят	1,12E+05
491	Boosepivirus B	1,17E+08	631	вирус Инфекционного перитонита кошек	1,35E+05
492	Phacovirus Pf-CHK1	5,87E+06	632	вирус Farmington	1,22E+05
493	HRVC3 QPM	1,64E+07	633	вирус Инфекционного бронхита кур	2,84E+05
494	HRVB27	2,04E+08	634	rhinovirus человека 1	7,40E+07
495	HRVA73	1,08E+08	635	EV22	1,95E+07
496	EV L	6,49E+07	636	TMEV-подобный Cardiovirus Человека	4,48E+07
497	EV K	7,52E+07	637	Coronavirus 229E Человека	N/A
498	EV J 1631	9,88E+07	638	Вирус, подобный Hubei zhaovirus 1	1,03E+05
499	EV J N125	2,90E+07	639	Вирус, подобный Hubei tombus 9	9,28E+04
500	EV I	1,31E+08	640	Вирус, подобный Hubei tombus 32	9,23E+04
501	EV F1 BEV 261	1,12E+07	641	Вирус, подобный Hubei sobemo 3	1,17E+05
502	EV D94	9,25E+07	642	Вирус, подобный вирусу Hubei picorna 2	1,95E+05
503	PV3	1,25E+08	643	Hepacivirus P	6,04E+05
504	EV C ₁₀ 2	8,85E+07	644	Harrier Picornavirus 1	1,47E+05
505	EV 30	5,48E+06	645	Kunsagivirus 1	4,15E+05

506	SA5	1,61E+08	646	Kagoshima-2-24-KoV	9,30E+07
507	EV A114	1,50E+08	647	вирус Kashmir bee	1,65E+05
508	Mobovirus A	3,44E+06	648	Вирус, подобный вирусу Jingmen picorna	9,32E+04
509	Вирус BurpEngary	1,09E+07	649	вирус Mumps	1,47E+05
510	Hunnivirus A1	1,61E+06	650	Mosavirus мышей	9,00E+04
511	Hunnivirus A2	6,38E+06	651	Miniopterus schreibersii Picornavirus 1	6,05E+06
512	Ia Io	1,35E+06	652	вирус Linda	7,37E+05
513	Вирус синдрома Taura	8,30E+05	653	Lesavirus 2	3,67E+07
514	ABPV	6,48E+05	654	Lesavirus 1	6,37E+06
515	BRAV-2	3,98E+06	655	Phopivirus штамм NewEngland	1,06E+05
516	BRBV-1	3,34E+06	656	Pestivirus штамм Aydin	3,11E+06
517	ERAV-1 U188	N/A	657	Quail Picornavirus QPV1	6,55E+07
518	GFTV	1,23E+06	658	sapelovirus 1 Свиней	N/A
519	SAFV V13C	9,32E+07	659	Вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома 2	1,29E+05
520	SAV P-113	4,37E+07	660	enterovirus Свиней 9	3,20E+07
521	VHEV	1,74E+08	661	Picornavirus голубей B	1,24E+05
522	TRVNGS910	3,84E+07	662	Picornavirus НК21	4,09E+05
523	EMCV2 RD1338	1,97E+06	663	Picornavirales Tottori- HG1	9,54E+04
524	EMCV1 JZ1203	N/A	664	Нератовирус Грызунов	1,39E+05
525	EMCV1 AnrB-3741	2,55E+06	665	вирус Rinderpest	4,26E+05
526	Cosavirus D1	2,11E+06	666	Rabovirus A	2,88E+06
527	Cosavirus B1	1,91E+06	667	Shingleback nidovirus	2,62E+05

				1	
528	Cosavirus SH1	2,16E+06	668	вирус Seneca valley	1,46E+07
529	Malagasivirus B	5,05E+06	669	Sclerotinia sclerotiorum dsRNA mycovirusL	1,69E+05
530	Mosavirus A2 SZAL6	8,27E+06	670	Yak enterovirus	6,19E+06
531	SVV	1,06E+06	671	Вирус болезни Wobbly possum	2,60E+05
532	PTV A	7,29E+05	672	orthoreovirus сегмент S1 птиц	4,37E+05
533	PTV B	6,02E+06	673	Kobuvirus Коз d10	2,20E+08
534	TottOrivirus	2,76E+07	674	Kobuvirus Коз d20	2,00E+08
535	Posavirus 1	1,55E+06	675	Kobuvirus Коз d30	1,87E+08
536	A105-675	2,18E+07	676	Kobuvirus Коз d40	2,15E+08
537	A110-675	1,24E+08	677	Kobuvirus Коз d50	9,65E+07
538	18-675	6,04E+07	678	Picornavirales sp. Изолят RtMruf-PicoV	2,26E+08
539	A115-675	5,93E+07	679	Apodemus agrarius Picornavirus штамм Longquan-Aa118	1,90E+08
540	A73-675	1,30E+08	680	Niviventer confucianus Picornavirus	6,10E+07
541	Kobuvirus 16317	2,03E+07	681	Picornavirus Летучих мышей изолят BtRs- PicoV	1,13E+06
542	Aichivirus Chshc7	1,87E+07	682	Rhinolophus Picornavirus штамм Guizhou-R R ₁₀₀	N/A
543	Aichivirus Goiania	1,66E+07	683	Rhinolophus Picornavirus штамм Henan-Rf265	3,85E+05
544	Aichivirus EHP4	1,78E+07	684	Enterovirus человека C ₁₀₅	5,49E+05
545	Aichivirus DVI2169	2,98E+06	685	poliovirus человека 1	3,94E+05

				штамм NIE1116623	
546	Aichivirus DVI2321	6,63E+07	686	Enterovirus человека 109	4,92E+05
547	Aichivirus rat08	3,51E+07	687	poliovirus человека 2 штамм NIE0811460	2,59E+07
548	Aichivirus Rt386	5,71E+07	688	Picornavirus Крупного рогатого скота	3,82E+06
549	Pestivirus серых крыс	N/A	689	poliovirus человека 1 штамм EQG1419328	2,44E+05
550	Kobuvirus Свиной GS2	44200000	690	poliovirus человека 2 изолят IS_061	5,84E+06
551	Kobuvirus SZAL6	98850000	691	Coxsackievirus B5	N/A
552	Kobuvirus овец TB3	N/A	692	Coxsackievirus A10	N/A

ПРИМЕР 9

Экспрессия и функциональная стабильность IRES в клетках Jurkat.

[0731] Было циркуляризовано 2 набора конструкций, включающих области интрона/экзона anabaena, последовательность экспрессии люциферазы Gaussia и подмножество ранее протестированных IRES. 60000 клеток Jurkat подвергали электропорации с 1 мкг продукта каждой реакции циркуляризации. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации. Конструкция CVB3 IRES была включена в оба набора для сравнения между наборами и для ранее определенной эффективности IRES. Конструкции CVB1 и Salivirus A SZ1 IRES давали наибольшую экспрессию через 24 часа. Данные можно найти на фиг. 4A и 4B.

[0732] Функциональную стабильность конструкций IRES в каждом раунде электропорации клеток Jurkat измеряли в течение 3 дней. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли каждые 24 часа после электропорации 60000 клеток с использованием 1 мкг продукта каждой реакции циркуляризации с последующей полной заменой среды (фиг. 5A и 5B).

[0733] Конструкции Salivirus A SZ1 и Salivirus A BN2 IRES обладали высокой функциональной стабильностью по сравнению с другими конструкциями.

ПРИМЕР 10

Экспрессия, функциональная стабильность и высвобождение цитокинов кольцевой и линейной РНК в клетках Jurkat.

[0734] Циркуляризовали конструкцию, содержащую области интрона/экзона anabaena, последовательность экспрессии люциферазы Gaussia и IRES FHB Salivirusa. мРНК, содержащая последовательность экспрессии люциферазы Gaussia и хвост polyA ~150 нуклеотидов и модифицированная с заменой 100% уридина на 5-метоксиуридин

(5moU), является коммерчески доступной и была приобретена у Trilink. Было показано, что модификации нуклеотидов 5moU улучшают стабильность и экспрессию мРНК (Bioconjug Chem. 2016 Mar 16;27(3):849-53). Измеряли и сравнивали экспрессию модифицированной мРНК, продукта реакции циркуляризации (неочищенного) и circRNA, очищенной с помощью эксклюзионной HPLC (чистая) в клетках Jurkat (фиг. 6A). Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации 60000 клеток 1 мкг каждого вида РНК.

[0735] Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли каждые 24 часа после электропорации 60000 клеток 1 мкг каждого вида РНК с последующей полной заменой среды. Сравнение данных функциональной стабильности модифицированных мРНК и circRNA в клетках Jurkat в течение 3 дней представлено на фиг. 6B.

[0736] Индукцию транскрипта IFN γ (фиг. 7A), IL-6 (фиг. 7B), IL-2 (фиг. 7C), RIG-I (фиг. 7D), IFN- β 1 (фиг. 7E) и TNF α (фиг. 7F) измеряли через 18 часов после электропорации 60000 клеток Jurkat 1 мкг каждого вида РНК, описанного выше, и 3p-hpRNA (5'-трифосфатная шпилечная РНК, которая является известным агонистом RIG-I).

ПРИМЕР 11

Экспрессия кольцевой и линейной РНК в моноцитах и макрофагах.

[0737] Циркуляризовали конструкцию, содержащую области интрона/экзона anabaena, последовательность экспрессии люциферазы Gaussia и Salivinus FHB IRES. мРНК, содержащую последовательность экспрессии люциферазы Gaussia и хвост polyA ~150 нуклеотидов, и модифицированную с заменой 100% уридина на 5-метоксиуридин (5moU), приобретали у Trilink. Экспрессию кольцевой и модифицированной мРНК измеряли в первичных моноцитах человека (фиг. 8A) и первичных макрофагах человека (фиг. 8B). Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации 60000 клеток 1 мкг каждого вида РНК. Люминесценцию также измеряли через 4 дня после электропорации первичных макрофагов человека с заменой среды каждые 24 часа (фиг.8C). Результаты можно найти на фиг. 8. Различие в люминесценции в каждом случае было статистически значимым ($p < 0,05$).

ПРИМЕР 12

Экспрессия и функциональная стабильность IRES в первичных Т-клетках.

[0738] Конструкции, содержащие области интрона/экзона anabaena, последовательность экспрессии люциферазы Gaussia и подмножество ранее протестированных IRES, были циркуляризованы, и продукты реакции были очищены с помощью эксклюзионной HPLC. 150000 первичных CD3+ Т-клеток человека подвергли электропорации с 1 мкг каждой кольцевой РНК. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации (фиг. 9A). Конструкции вирус Aichi и CVB3 IRES имели наибольшую экспрессию через 24 часа.

[0739] Люминесценцию также измеряли каждые 24 часа после электропорации в течение 3 дней, чтобы сравнить функциональную стабильность каждой конструкции (фиг.

9В). Наиболее стабильной оказалась конструкция с *Salivirus A SZ1 IRES*.

ПРИМЕР 13

Экспрессия и функциональная стабильность кольцевой и линейной РНК в первичных Т-клетках и РВМС.

[0740] Конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia* и *Salivirus A SZ1 IRES* или *Salivirus FNB IRES*, были циркуляризованы. мРНК, содержащая последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia* и хвост polyA ~150 нуклеотидов, и модифицированная с заменой 100% уридина на 5-метоксиуридин (5moU), была приобретена у Trilink. Экспрессию очищенной кольцевой и модифицированной мРНК *Salivirus A SZ1 IRES* HPLC измеряли в первичных CD3+ Т-клетках человека. Экспрессию *Salivirus FNB*, очищенной HPLC кольцевой, неочищенной кольцевой и модифицированной мРНК, измеряли в РВМС человека. Люминесценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации 150000 клеток 1 мкг каждого вида РНК. Данные для первичных Т-клеток человека показаны на фиг. 10А и 10В, а данные для РВМС показаны на фиг. 10С. Различие в экспрессии между очищенной кольцевой РНК и неочищенной кольцевой РНК или линейной РНК было значительным в каждом случае ($p < 0,05$).

[0741] Люминесценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* в супернатанте первичных Т-клеток измеряли каждые 24 часа после электропорации в течение 3 дней, чтобы сравнить функциональную стабильность конструкции. Данные показаны на фиг. 10В. Разница в относительной люминесценции по результатам измерений на 1 день между очищенной кольцевой РНК и линейной РНК была значимой как на 2, так и на 3 день для первичных Т-клеток.

ПРИМЕР 14

Эффективность циркуляризации по сайту перестановки в интроне *Anabaena*.

[0742] Были получены РНК-конструкции, содержащие CVB3 IRES, последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia*, интронные/экзонные области *anabaena*, спейсеры, внутренние области гомологии и плечи гомологии. Эффективность циркуляризации конструкций с использованием традиционного сайта перестановки интрона *anabaena* и 5 последовательных сайтов перестановки в Р9 измеряли с помощью HPLC. Хроматограммы HPLC для 5 последовательных сайтов перестановки в Р9 показаны на фиг. 11А.

[0743] Эффективность циркуляризации измеряли в различных сайтах перестановки. Эффективность циркуляризации определяется как площадь под кривой хроматограммы HPLC для каждого из: circRNA/(circRNA+предшественник РНК). Ранжированная количественная оценка эффективности циркуляризации в каждом сайте перестановки показана на фиг. 11В. Для дальнейшего исследования были выбраны 3 сайта перестановки (указанные на фиг. 11В).

[0744] Кольцевую РНК в этом примере циркуляризовали с помощью транскрипции *in vitro* (IVT), а затем очищали на центрифужной колонке. Эффективность циркуляризации

для всех конструкций, вероятно, была бы выше, если бы был включен дополнительный этап инкубации с Mg^{2+} и гуанозиновым нуклеотидом; однако удаление этой стадии позволило сравнить и оптимизировать конструкции кольцевой РНК. Этот уровень оптимизации особенно полезен для поддержания высокой эффективности циркуляризации с большими конструкциями РНК, такими как конструкции, которые кодируют химерные антигенные рецепторы.

ПРИМЕР 15

Эффективность циркуляризации альтернативных интронов.

[0745] Получали предшественник РНК, содержащий интрон с перестановкой группы 1 различного происхождения или сайта перестановки, и несколько константных элементов, включая: IRES CVB3, последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia*, спейсеры, внутренние области гомологии и плечи гомологии. Данные о циркуляризации можно найти на фиг. 12. На фиг. 12А показаны хроматограммы, разделяющие предшественник, *circRNA* и интроны. На фиг. 12В представлена ранжированная количественная оценка эффективности циркуляризации, основанная на хроматограммах, показанных на фиг. 12А, в зависимости от конструкции интрона.

[0746] Кольцевую РНК в этом примере циркуляризовали транскрипцией *in vitro* (IVT), а затем очисткой на центрифужной колонке. Эффективность циркуляризации для всех конструкций, вероятно, была бы выше, если бы был включен дополнительный этап инкубации с Mg^{2+} и гуанозиновым нуклеотидом; однако удаление этой стадии позволяет сравнивать и оптимизировать конструкции кольцевой РНК. Этот уровень оптимизации особенно полезен для поддержания высокой эффективности циркуляризации с большими конструкциями РНК, такими как конструкции, которые кодируют химерные антигенные рецепторы.

ПРИМЕР 16

Эффективность циркуляризации по наличию или длине плеча гомологии.

[0747] Были получены РНК-конструкции, содержащие CVB3 IRES, последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia*, области интрона/экзона *anabaena*, спейсеры и области внутренней гомологии. Конструкции, представляющие 3 сайта перестановки интронов *anabaena*, тестировали с 30 нуклеотидами, плечами гомологии 25% GC или без плеч гомологии («NA»). Этим конструкциям давали возможность циркуляризоваться без стадии инкубации с Mg^{2+} . измеряли и сравнивали эффективность циркуляризации. Данные можно найти на фиг. 13А и 13В. Эффективность циркуляризации была выше для каждой конструкции без плеч гомологии. На фиг. 13А представлена количественная ранжированная оценка эффективности циркуляризации; на фиг. 13В представлены хроматограммы, разделяющие предшественник, *circRNA* и интроны.

[0748] Для каждого из 3 сайтов перестановки были получены конструкции с длиной плеча 10 нуклеотидов, 20 нуклеотидов и 30 нуклеотидов и содержанием GC 25%, 50% и 75%. Эффективность сплайсинга этих конструкций измеряли и сравнивали с конструкциями без плечей гомологии (фиг. 14). Эффективность сплайсинга определяется

как доля свободных интронов по отношению к общей РНК в реакции сплайсинга.

[0749] На фиг. 15А (слева) показаны хроматограммы HPLC, указывающие на вклад сильных плеч гомологии в улучшенную эффективность сплайсинга. Вверху слева: содержание GC 75%, плечи гомологии 10 нуклеотидов. В центре слева: содержание GC 75%, плечи гомологии 20 нуклеотидов. Внизу слева: содержания GC 75%, плечи гомологии 30 нуклеотидов.

[0750] На фиг. 15А (справа) показаны хроматограммы HPLC, показывающие повышенную эффективность сплайсинга в сочетании с увеличенным разрывом, проявляющимся в виде плеча на пике *circRNA*. Вверху справа: содержание GC 75%, плечи гомологии 10 нуклеотидов. В центре справа: содержание GC 75%, плечи гомологии 20 нуклеотидов. Внизу справа: содержание GC 75%, плечи гомологии 30 нуклеотидов.

[0751] На фиг. 15В (слева) показаны избранные комбинации сайтов перестановки и плеч гомологии, предположительно демонстрирующие повышенную эффективность циркуляризации.

[0752] На фиг. 15В (справа) показаны избранные комбинации сайтов перестановки и плеч гомологии, предположительно демонстрирующие улучшенную эффективность циркуляризации, обработанные polyA-полимеразой *E. coli*.

[0753] Кольцевую РНК в этом примере циркуляризовали с помощью транскрипции *in vitro* (IVT), а затем очищали на центрифужной колонке. Эффективность циркуляризации для всех конструкций, вероятно, была бы выше, если бы была включена дополнительная стадия инкубации Mg^{2+} с гуанозиновым нуклеотидом; однако удаление этой стадии позволило сравнить и оптимизировать конструкции кольцевой РНК. Этот уровень оптимизации особенно полезен для поддержания высокой эффективности циркуляризации с большими конструкциями РНК, такими как конструкции, которые кодируют химерные антигенные рецепторы.

ПРИМЕР 17

Кольцевая РНК, кодирующая химерные антигенные рецепторы

[0754] Конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, последовательность экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR) *Kymriah* и IRES CVB3, были циркуляризованы. 100000 первичных CD3⁺ Т-клеток человека подвергали электропорации с 500 нг *circRNA* и совместно культивировали в течение 24 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка. Отношение эффектора к мишени (отношение Е:Т) 0,75:1. 100000 первичных CD3⁺ Т-клеток человека подвергали имитационной электропорации и совместно культивировали в качестве контроля (фиг. 16).

[0755] Наборы из 100000 первичных CD3⁺ Т-клеток человека подвергали имитационной электропорации или электропорации с 1 мкг *circRNA*, затем совместно культивировали в течение 48 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка в соотношении Е:Т 10:1 (фиг. 17).

[0756] Количественную оценку специфического лизиса клеток-мишеней Raji

определяли путем обнаружения люминесценции светлячков (фиг. 18). 100000 первичных CD3⁺ Т-клеток человека, подвергнутых имитационной электропорации или электропорации с *circRNA*, кодирующей различные последовательности CAR, совместно культивировали в течение 48 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка. % специфического лизиса, определяемого как 1-[люминесценция в условиях CAR]/[люминесценция в псевдоусловиях]. Соотношение E:T 10:1.

ПРИМЕР 18

Экспрессия и функциональная стабильность кольцевой и линейной РНК в клетках Jurkat и покоящихся Т-клетках человека.

[0757] Конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, последовательность экспрессии люциферазы *Gussia* и подмножество ранее протестированных IRES, были циркуляризованы, и продукты реакции были очищены с помощью эксклюзионной HPLC. 150000 клеток Jurkat подвергали электропорации с 1 мкг кольцевой РНК или 5moU-мРНК. Люминесценцию секретируемой люциферазы *Gussia* в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации (фиг. 19А слева). 150000 покоящихся первичных CD3⁺ Т-клеток человека (через 10 дней после стимуляции) подвергали электропорации с 1 мкг кольцевой РНК или 5moU-мРНК. Люминесценцию секретируемой люциферазы *Gussia* в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации (фиг. 19А справа).

[0758] Люминесценцию секретируемой люциферазы *Gussia* в супернатанте измеряли каждые 24 часа после электропорации с последующей полной заменой среды. Данные функциональной стабильности показаны на фиг. 19В. Кольцевая РНК в каждом случае обладала большей функциональной стабильностью, чем линейная РНК, с более выраженной разницей в клетках Jurkat.

ПРИМЕР 19

Индукция транскриптов IFN-β1, RIG-I, IL-2, IL-6, IFNγ и TNFα клеток, подвергнутых электропорации с линейной РНК или различными конструкциями кольцевой РНК.

[0759] Конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, последовательность экспрессии люциферазы *Gussia* и подмножество ранее протестированных IRES, были циркуляризованы, и продукты реакции были очищены с помощью эксклюзионной HPLC. 150000 CD3⁺ Т-клеток человека подвергали электропорации с 1 мкг кольцевой РНК, 5moU-мРНК или иммуностимулирующего положительного контроля полиинозин:цитозин. IFN-β1 (фиг. 20А), RIG-I (фиг. 20В), IL-2 (фиг. 20С), IL-6 (фиг. 20D), IFNγ (фиг. 20Е) и TNFα (фиг. 20F) Индукцию транскрипта измеряли через 18 часов после электропорации.

ПРИМЕР 20

Специфический лизис клеток-мишеней и индукция транскрипта IFNγ клетками, экспрессирующими CAR, электропорированными различными количествами кольцевой или линейной РНК; специфический лизис клеток-мишеней и клеток, не являющихся

клетками-мишенями, экспрессирующими CAR, при различных соотношениях Е:Т.

[0760] Конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, последовательность экспрессии CAR против CD19 и CVB3 IRES, циркуляризовали, и продукты реакции очищали с помощью эксклюзионной HPLC. 150000 первичных CD3+ Т-клеток человека, подвергнутых имитационной электропорации или электропорации с различными количествами *circRNA*, кодирующей последовательность CAR против CD19, совместно культивировали в течение 12 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка, при соотношении Е:Т 2:1. Специфический лизис клеток-мишеней Raji определяли по люминесценции светлячков (фиг. 21А). % специфического лизиса определяли как 1-[люминесценция в условиях CAR]/[люминесценция в псевдоусловиях]. Индукцию транскрипта IFN γ измеряли через 24 часа после электропорации (фиг. 21В).

[0761] 150000 первичных CD3+ Т-клеток человека подвергали либо имитационной электропорации, либо электропорации с 500 нг *circRNA* или m1 ψ -мРНК, кодирующей последовательность CAR против CD19, затем совместно культивировали в течение 24 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими люциферазу светлячка при различных соотношениях Е:Т. % специфического лизиса клеток-мишеней Raji определяли по обнаружению свечения светлячков (фиг. 22А). % специфического лизиса определяли как 1-[люминесценция в условиях CAR]/[люминесценция в псевдоусловиях].

[0762] Т-клетки, экспрессирующие CAR, также совместно культивировали в течение 24 часов с клетками Raji или K562, стабильно экспрессирующими люциферазу светлячка, при различных соотношениях Е:Т. Специфический лизис клеток-мишеней Raji или клеток, не являющихся мишенями K562, определяли путем обнаружения люминесценции светлячков (фиг. 22В). % специфического лизиса определяют как 1-[люминесценция в условиях CAR]/[люминесценция в псевдоусловиях].

ПРИМЕР 21

Специфический лизис клеток-мишеней Т-клетками, электропорированными кольцевой РНК или линейной РНК, кодирующей CAR.

[0763] Конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, экспрессирующую последовательность CAR против CD19 и IRES CVB3, циркуляризовали, и продукты реакции очищали с помощью эксклюзионной HPLC. Первичные CD3+ Т-клетки человека подвергали электропорации с 500 нг кольцевой РНК или эквимольным количеством m1 ψ -мРНК, каждая из которых кодирует CAR, нацеленный на CD19. Клетки Raji добавляли к культурам клеток CAR-Т в течение 7 дней при соотношении Е:Т 10:1. % специфического лизиса измеряли для обеих конструкций через 1, 3, 5 и 7 дней (фиг. 23).

ПРИМЕР 22

Специфический лизис клеток Raji Т-клетками, экспрессирующими CAR против CD19 или CAR против BCMA.

[0764] Конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, последовательность экспрессии CAR против CD19 или против BCMA и CVB3 IRES,

циркуляризовали, и продукты реакции очищали с помощью эксклюзионной HPLC. 150000 первичных человеческих CD3+ Т-клеток подвергали электропорации с 500 нг circRNA, затем совместно культивировали с клетками Raji при соотношении E:T 2:1. % специфического лизиса измеряли через 12 часов после электропорации (фиг. 24).

ПРИМЕР 23

Пример 23А: Синтез соединений

[0765] Синтез репрезентативных ионизируемых липидов согласно изобретению описан в заявках PCT/US2016/052352, PCT/US2016/068300, PCT/US2010/061058, PCT/US2018/058555, PCT/US2018/053569, PCT/US2017/028981, PCT/US2019/025246, PCT/US2018/035419, PCT/US2019/015913 и заявках США с номерами публикаций 20190314524, 20190321489 и 20190321489 и 20190314284, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Пример 23В: Синтез соединений

[0766] Синтез репрезентативных ионизируемых липидов согласно изобретению описан в публикации патента США номер US20170210697A1, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ПРИМЕР 24

Экспрессия белка по органам

[0767] Циклическую или линейную РНК, кодирующую FLuc, получали и загружали в переносчики со следующим составом: 50% ионизируемого липида 15 в таблице 10b, 10% DSPC, 1,5% PEG-DMG, 38,5% холестерина. Мышам CD-1 вводили дозу 0,2 мг/кг, и измеряли люминесценцию через 6 часов (живой IVIS) и 24 часа (живой IVIS и IVIS ex vivo). Измеряли общий поток (фотонов/секунду над интересующей областью) печени, селезенки, почек, легких и сердца (фиг. 25 и 26).

ПРИМЕР 25

Распределение экспрессии в селезенке

[0768] Получают кольцевую или линейную РНК, кодирующую GFP, и загружают в переносчики со следующим составом: 50% ионизируемого липида 15 в таблице 10b, 10% DSPC, 1,5% PEG-DMG, 38,5% холестерина. Состав вводят мышам CD-1. Проточную цитометрию проводят на клетках селезенки для определения распределения экспрессии по типам клеток.

ПРИМЕР 26

Получение композиций на основе наночастиц

[0769] Для исследования безопасных и эффективных композиций на основе наночастиц для использования при доставке кольцевой РНК в клетки получают и тестируют ряд составов. В частности, оптимизированы конкретные элементы и их соотношения в липидном компоненте композиций на основе наночастиц.

[0770] Наночастицы могут быть получены в одном потоке жидкости или с помощью процессов смешивания, таких как микрофлюидика и Т-образное смешивание двух потоков жидкости, один из которых содержит кольцевую РНК, а другой содержит липидные

компоненты.

[0771] Липидные композиции получают путем объединения ионизируемого липида, необязательно вспомогательного липида (такого как DOPE, DSPC или олеиновая кислота, получаемая от Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), PEG-липиды (такого как 1,2-димиристоил-sn-глицерин метоксиполиэтиленгликоль, также известный как PEG-DMG, поставляемый Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), и структурного липида, такого как холестерин, в концентрациях, например, примерно 40 или 50 мМ в растворителе, например, этаноле. Растворы следует хранить в холодильнике при температуре, например, -20°C. Липиды объединяют для получения нужных молярных соотношений (см., например, таблицы 31a и 31b ниже) и разбавляют водой и этанолом до конечной концентрации липидов, например, от примерно 5,5 мМ до примерно 25 мМ

Таблица 31a

Номер состава	Описание
1	Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов C12-200, DOPE, Chol и DMG-PEG2K (40:30:25:5) смешивают и разбавляют этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно получают водный забуференный раствор (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4,5) circRNA из маточного раствора 1 мг/мл. Липидный раствор быстро вводят в водный раствор circRNA и встряхивают, чтобы получить конечную суспензию в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтруют, диафильтруют с 1×PBS (pH 7,4), концентрируют и хранят при 2-8°C.
2	Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов DODAP, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (18:56:20:6) смешивают и разбавляют этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно получают водный буферный раствор (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4,5) circRNA EPO из маточного раствора 1 мг/мл. Липидный раствор быстро вводят в водный раствор circRNA и встряхивают, чтобы получить конечную суспензию в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтруют, диафильтруют с 1×PBS (pH 7,4), концентрируют и хранят при 2-8°C. Конечная концентрация=1,35 мг/мл circRNA EPO (инкапсулированная). Zave=75,9 нм (Dv(50)=57,3 нм; Dv(90)=92,1 нм).
3	Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов HGT4003, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (50:25:20:5) смешивают и разбавляют этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно получают водный забуференный раствор (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4,5) circRNA из маточного раствора 1 мг/мл. Липидный раствор быстро вводят в водный раствор circRNA и встряхивают,

	чтобы получить конечную суспензию в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтруют, диафильтруют с 1×PBS (pH 7,4), концентрируют и хранят при 2-8°C.
4	Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов ICE, DOPE и DMG-PEG2K (70:25:5) смешивают и разбавляют этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно получают водный забуференный раствор (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4,5) siсrNA из маточного раствора 1 мг/мл. Липидный раствор быстро вводят в водный раствор siсrNA и встряхивают, чтобы получить конечную суспензию в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтруют, диафильтруют с 1×PBS (pH 7,4), концентрируют и хранят при 2-8°C.
5	Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов HGT5000, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (40:20:35:5) смешивают и разбавляют этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно получают водный буферный раствор (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4,5) siсrNA EPO из маточного раствора 1 мг/мл. Липидный раствор быстро вводят в водный раствор siсrNA и встряхивают, чтобы получить конечную суспензию в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтруют, диафильтруют с 1×PBS (pH 7,4), концентрируют и хранят при 2-8°C. Конечная концентрация=1,82 мг/мл мРНК EPO (инкапсулированная). Zave=105,6 нм (Dv(50)=53,7 нм; Dv(90)=157 нм).
6	Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов HGT5001, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (40:20:35:5) смешивают и разбавляют этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно получают водный буферный раствор (10 мМ цитрата/150 мМ NaCl, pH 4,5) siсrNA EPO из маточного раствора 1 мг/мл. Липидный раствор быстро вводят в водный раствор siсrNA и встряхивают, чтобы получить конечную суспензию в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц фильтруют, диафильтруют с 1×PBS (pH 7,4), концентрируют и хранят при 2-8°C.

[0772] В некоторых вариантах осуществления переносчик имеет состав, описанный в таблице 31а.

Таблица 31b

Композиция (моль %)	Компоненты
40:20:38,5:1,5	Соединение: Фосфолипид: Фитостерол*: PEG-DMG
45:15:38,5:1,5	Соединение: Фосфолипид: Фитостерол*: PEG- DMG

50:10:38,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
55:5:38,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
60:5:33,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
45:20:33,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
50:20:28,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
55:20:23,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
60:20:18,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
40:15:43,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
50:15:33,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
55:15:28,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Phytostero)*:PEG- DMG
60:15:23,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
40:10:48,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
45:10:43,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
55:10:33,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
60:10:28,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
40:5:53,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
45:5:48,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
50:5:43,5:1,5	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
40:20:40:0	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
45:20:35:0	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
50:20:30:0	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
55:20:25:0	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG
60:20:20:0	Соединение:Фосфолипид:Фитостерол)*:PEG- DMG

40:15:45:0	Соединение: Фосфолипид: Фитостерол* :PEG- DMG
------------	-----------------------------------------------

[0773] В некоторых вариантах осуществления переносчик имеет состав, как описано в Таблице 31b.

[0774] Для композиций на основе наночастиц, включающих *si*crRNA, растворы *si*crRNA в концентрации 0,1 мг/мл в деионизированной воде разводят в буфере, например, 50 мМ буфере цитрата натрия при pH от 3 до 4, с получением маточного раствора. В качестве альтернативы растворы *si*crRNA в концентрации 0,15 мг/мл в деионизированной воде разбавляют в буфере, например, 6,25 мМ буфере ацетата натрия при pH от 3 до 4,5, с получением маточного раствора.

[0775] Композиции на основе наночастиц, содержащие кольцевую РНК и липидный компонент, получают путем комбинирования липидного раствора с раствором, содержащим кольцевую РНК, при массовом соотношении липидный компонент к *si*crRNA от примерно 5:1 до примерно 50:1. Липидный раствор быстро вводят с помощью, например, микрожидкостной системы NanoAssembler со скоростью потока от примерно 10 мл/мин до примерно 18 мл/мин или от примерно 5 мл/мин до примерно 18 мл/мин в раствор *si*crRNA для получения суспензии с соотношением воды и этанола от примерно 1:1 до примерно 4:1.

[0776] Композиции на основе наночастиц могут быть обработаны диализом для удаления этанола и замены буфера. Составы подвергают диализу дважды против фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7,4, в объемах, в 200 раз превышающих объемы первичного продукта, с использованием кассет Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) с порогом молекулярной массы 10 кДа или 20 кДа. Затем составы подвергают диализу в течение ночи при 4°C. Полученную суспензию наночастиц фильтруют через стерильные фильтры 0,2 мкм (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) в стеклянные пробирки и закупоривают обжимными крышками. Обычно получают растворы композиции на основе наночастиц от 0,01 мг/мл до 0,15 мг/мл.

[0777] Описанный выше способ вызывает nanoосаждение и образование частиц.

[0778] Альтернативные процессы, включая без ограничения T-образный переход и прямое впрыскивание, могут быть использованы для достижения такого же nanoосаждения.

В. Характеристика композиций на основе наночастиц

[0779] Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK) можно использовать для определения размера частиц, индекса полидисперсности (PDI) и дзета-потенциала композиций на основе наночастиц в 1×PBS при определении размера частиц и 15 мМ PBS при определении дзета-потенциала.

[0780] Ультрафиолетово-видимая спектроскопия может быть использована для определения концентрации *si*crRNA в композициях наночастиц. 100 мкл разведенного состава в 1×PBS добавляют к 900 мкл смеси метанола и хлороформа 4:1 (o/o). После смешивания регистрируют спектр поглощения раствора, например, между 230 нм и 330 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). Концентрация *si*crRNA в композиции на основе наночастиц может быть рассчитана на

основе коэффициента экстинкции *circRNA*, используемой в композиции, и разницы между поглощением при длине волны, например, 260 нм, и исходным значением при длине волны, например, 330 нм.

[0781] Анализ РНК QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA) можно использовать для оценки инкапсуляции *circRNA* содержащей наночастицы композицией. Образцы разводят до концентрации примерно 5 мкг/мл или 1 мкг/мл в буферном растворе TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). 50 мкл разведенных образцов переносят в полистироловый 96-луночный планшет и в лунки добавляют либо 50 мкл TE-буфера, либо 50 мкл 2-4%-ного раствора Triton X-100. Планшет инкубируют при температуре 37°C в течение 15 минут. Реактив RIBOGREEN® разбавляют 1:100 или 1:200 в TE-буфере и в каждую лунку добавляют по 100 мкл этого раствора. Интенсивность флуоресценции можно измерить с помощью флуоресцентного планшетного ридера (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) при длине волны возбуждения, например, примерно 480 нм, и при длине волны испускания, например, примерно 520 нм. Значения флуоресценции контрольной пробы реагента вычитают из значений каждого из образцов и определяют процент свободной *circRNA* путем деления интенсивности флуоресценции интактного образца (без добавления Triton X-100) на значение флуоресценции разрушенного образца (вызванного добавлением Triton X-100). С.

Исследования составов *in vivo*:

[0782] Чтобы контролировать, насколько эффективно различные композиции на основе наночастиц доставляют *circRNA* в клетки-мишени, получают и вводят популяциям грызунов различные композиции на основе наночастиц, содержащие *circRNA*. Мышам внутривенно, внутримышечно, внутриартериально или внутриопухолево вводят разовую дозу, содержащую композицию на основе наночастиц с составом липидных наночастиц. В некоторых случаях мышей можно заставить вдыхать дозы. Размеры доз могут находиться в диапазоне от 0,001 мг/кг до 10 мг/кг, где 10 мг/кг означает дозу, содержащую 10 мг *circRNA* в составе на основе наночастиц на каждый 1 кг массы тела мыши. Также можно использовать контрольную композицию, содержащую PBS.

[0783] При введении мышам композиций на основе наночастиц профили доставки дозы, ответ на дозу и токсичность конкретных составов и их доз можно измерить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), биолюминесцентной визуализации или других способов. Также можно оценить временной ход экспрессии белка. Образцы, взятые у грызунов для оценки, могут включать кровь и ткани (например мышечную ткань с места внутримышечной инъекции и внутреннюю ткань); сбор проб может включать умерщвление животных.

Более высокие уровни экспрессии белка, индуцированные введением композиции, содержащей *circRNA*, будут свидетельствовать о более высокой эффективности трансляции *circRNA* и/или эффективности доставки *circRNA* композиции на основе наночастиц. Поскольку считается, что компоненты, отличные от РНК, не влияют на сами механизмы трансляции, более высокий уровень экспрессии белка, вероятно, указывает на более

высокую эффективность доставки circRNA с помощью данной композиции на основе наночастиц по сравнению с другими композициями на основе наночастиц или их отсутствие.

ПРИМЕР 27

Характеристика композиций на основе наночастиц

[0784] Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK) можно использовать для определения размера частиц, индекса полидисперсности (PDI) и дзета-потенциала композиций носителя-переносчика в 1×PBS при определении размера частиц и 15 мМ PBS при определении дзета-потенциала.

[0785] Ультрафиолетовую-видимую спектроскопию можно использовать для определения концентрации терапевтического и/или профилактического средства (например РНК) в композициях переносчиков. 100 мкл разведенного состава в 1×PBS добавляют к 900 мкл смеси метанола и хлороформа 4:1 (o/o). После смешивания регистрируют спектр поглощения раствора, например, между 230 нм и 330 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). Концентрация лечебного и/или профилактического средства в композиции переносчика может быть рассчитана на основании коэффициента экстинкции лечебного и/или профилактического средства, используемого в композиции, и разницы между поглощением при длине волны, например, 260 нм и базовым значением при длине волны, например, 330 нм.

[0786] Для композиций переносчика, содержащих РНК, можно использовать анализ РНК QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) для оценки инкапсуляции РНК композицией переносчика. Образцы разводят до концентрации примерно 5 мкг/мл или 1 мкг/мл в буферном растворе TE (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH 7,5). 50 мкл разведенных образцов переносят в полистироловый 96-луночный планшет, и в лунки добавляют либо 50 мкл TE-буфера, либо 50 мкл 2-4%-ного раствора Triton X-100. Планшет инкубируют при температуре 37°C в течение 15 минут. Реактив RIBOGREEN® разбавляют 1:100 или 1:200 в TE-буфере и в каждую лунку добавляют по 100 мкл этого раствора. Интенсивность флуоресценции можно измерить с помощью флуоресцентного планшет-ридера (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) при длине волны возбуждения, например, примерно 480 нм, и при длине волны испускания, например, примерно 520 нм. Значения флуоресценции контрольного реагента

[0787] вычитают из этого показателя каждого из образцов, и процент свободной РНК определяют путем деления интенсивности флуоресценции интактного образца (без добавления Triton X-100) на значение флуоресценции разрушенного образца (вызванного добавлением Triton X-100).

ПРИМЕР 28

Нацеливание на Т-клетки

[0788] Для нацеливания переносчиков на Т-клетки, связывающее Т-клеточный антиген средство, например, антитела против CD8, соединяют с поверхностью

переносчика. Антитела против Т-клеточного антигена слегка восстанавливают избытком DTT в присутствии EDTA в PBS, чтобы обнажить тиолы свободной шарнирной области. Для удаления DTT антитела пропускают через обессоливающую колонку. Гетеробифункциональное сшивающее средство SM(PEG)24 используется для закрепления антител на поверхности переносчиков, нагруженных siRNA (аминогруппы присутствуют в головных группах PEG-липидов, свободные тиоловые группы на антителах были получены с помощью DTT, SM(PEG)24 образует поперечные связи между аминогруппами и тиоловыми группами). Переносчики сначала инкубируют с избытком SM(PEG)24 и центрифугируют для удаления непрореагировавшего сшивающего средства. Активированные переносчики затем инкубируют с избытком восстановленного антитела против Т-клеточного антигена. Несвязавшееся антитело удаляют с помощью устройства центробежной фильтрации.

ПРИМЕР 29

РНК, содержащая переносчик, с использованием RV88.

[0789] В этом примере РНК, содержащие переносчики, синтезируют с использованием 2-D вихревого микрожидкостного чипа с катионным липидом RV88 для доставки siRNA.

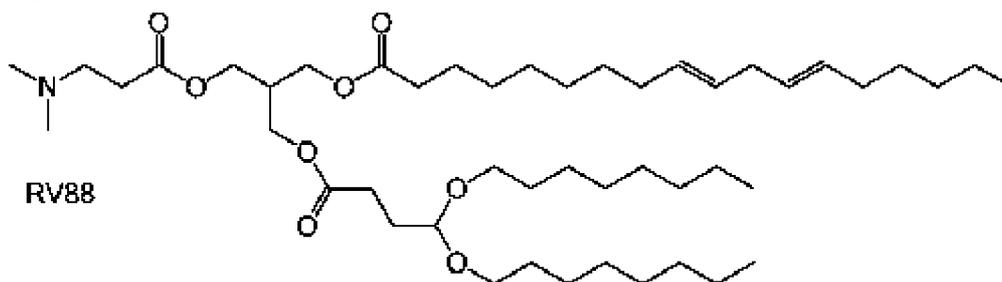


Таблица 32а

Материалы и инструмент	Поставщик	Cat #
1 M Tris-HCl, pH 8,0. Стерильный	Teknova	T1080
5 M Раствора хлорида натрия	Teknova	S0250
Цитратный буфер QB, pH 6,0 (100 мМ)	Teknova	Q2446
Вода, не содержащая нуклеазу	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV88	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
Холестерин	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
Этанол	Acros Organic	615090010

Боросиликатные стеклянные пробирки 5 мл	Thermo Scientific	ST5-20
Колонки для обессоливания PD MiniTrap G-25	GE Healthcare	VWRCat. #95055-984
набор для анализа РНК Quant-iT RiboGreen	Molecular Probes/ Life Technologies	R11490
Черные 96-луночные микропланшеты	Greiner	655900

[0790] RV88, DSPC и холестерин готовили в этаноле в концентрации 10 мг/мл в пробирках из боросиликата. Липид 14:0-PEG2K PE получают в концентрации 4 мг/мл также в пробирке из боросиликатного стекла. Растворение липидов в исходных концентрациях достигается путем обработки липидов ультразвуком в этаноле в течение 2 мин. Затем растворы нагревают на орбитальном шейкере с наклоном при 170 об/мин при 37°C в течение 10 мин. Затем пробирки уравнивают при 26°C в течение как минимум 45 мин. Затем липиды смешивают, добавляя объемы маточного липида, как показано в таблице 32b. Затем раствор доводят этанолом до конечной концентрации липидов 7,92 мг/мл.

таблица 32b

Композиция	MW	%	нмоль	мг	Маточный раствор (мг/мл)	мкл	Этанол (мкл)
RV88	794,2	40%	7200	5,72	10	571,8	155,3
DSPC	790,15	10%	1800	1,42	10	142,2	
Холестерин	386,67	48%	8640	3,34	10	334,1	
PEG2K	2693,3	2%	360	0,97	4	242,4	

[0791] РНК получают в виде маточного раствора с 75 мМ цитратного буфера при pH 6,0 и концентрации РНК 1,250 мг/мл. Затем концентрацию РНК доводят до 0,1037 мг/мл с помощью 75 мМ цитратного буфера при pH 6,0, уравнивая до 26°C. Затем раствор инкубируют при 26°C в течение как минимум 25 мин.

[0792] Микрожидкостную камеру очищают этанолом и получают шприцевые насосы neMYSIS путем загрузки в один шприц раствора РНК, а в другой шприц - этанольного липида. Оба шприца загружают и переводят под управление программного обеспечения neMESYS. Затем растворы наносят на смесительный чип при соотношении водной и органической фаз, равном 2, и общей скорости потока 22 мл/мин (14,67 мл/мин для РНК и 7,33 мл/мин для липидного раствора. Оба насоса запускаются синхронно). Раствор смесителя, вытекающий из микрожидкостного чипа, собирают фракциями 4×1 мл, причем первую фракцию отбрасывают как отходы. 1 мМ EDTA, pH 7,5. После замены буфера материалы характеризуются по размеру и захвату РНК с помощью анализа DLS и анализов Ribogreen соответственно.

ПРИМЕР 30

РНК, содержащую переносчик, с использованием RV94.

[0793] В этом примере РНК-содержащие липосомы синтезируют с использованием

двумерного вихревого микрожидкостного чипа с катионным липидом RV94 для доставки circRNA.

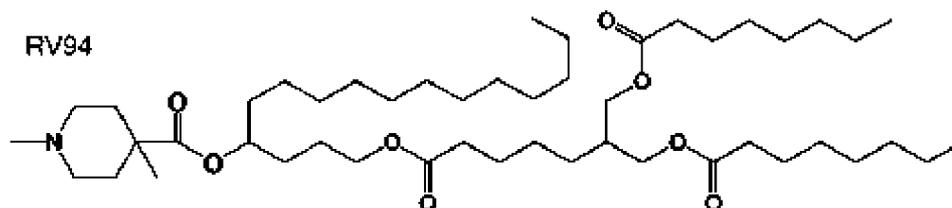


таблица 33

Материалы и инструмент	Поставщик	Cat #
1 M Tris-HCl, pH 8,0. Стерильный	Teknova	T1080
5 М Раствора хлорида натрия	Teknova	S0250
Цитратный буфер QB, pH 6,0 (100 мМ)	Teknova	Q2446
Вода, не содержащая нуклеазу	Ambion	AM9937
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV94	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
Холестерин	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
Этанол	Acros Organic	615090010
Боросиликатные стеклянные пробирки 5 мл	Thermo Scientific	ST5-20
Колонки для обессоливания PD MiniTrap G-25	GE Healthcare	VWRCat. #95055-984
набор для анализа РНК Quant-iT RiboGreen	Molecular Probes/ Technologies	LifeR11490
Черные 96-луночные микропланшеты	Greiner	655900

[0794] Липиды получали, как в примере 29, используя количества материала, указанные в таблице 34, до конечной концентрации липидов 7,92 мг/мл.

таблица 34

Композиция	MW	%	нмоль	мг	Маточный раствор (мг/мл)	мкл	Этанол (мкл)
RV94	808,22	40%	2880	2,33	10	232,8	155,3
DSPC	790,15	10%	720	0,57	10	56,9	

Холестерин	386,67	48%	3456	1,34	10	133,6	
PEG2K	2693,3	2%	144	0,39	4	97,0	

[0795] Водный раствор circRNA получают в виде маточного раствора с 75 мМ цитратного буфера при pH 6,0 и circRNA при концентрации 1,250 мг/мл. Затем концентрацию РНК доводят до 0,1037 мг/мл с помощью 75 мМ цитратного буфера при pH 6,0, уравнивая до 26 °С. Затем раствор инкубируют при 26°С в течение как минимум 25 мин.

[0796] Микрожидкостную камеру очищают этанолом, и готовят шприцевые насосы neMYSIS путем загрузки в один шприц раствора РНК, а в другой шприц - этанольного липида. Оба шприца загружают и переводят под управление программного обеспечения neMESYS. Затем растворы наносят на смесительный чип при соотношении водной и органической фаз, равном 2, и общей скорости потока 22 мл/мин (14,67 мл/мин для РНК и 7,33 мл/мин для липидного раствора. Оба насоса включаются синхронно. Раствор смесителя, вытекающий из микрофлюидного чипа, собирают фракциями 4×1 мл, причем первую фракцию выбрасывают как отходы. 1 мМ EDTA при pH 7,5, как описано выше. После замены буфера материалы характеризуются по размеру и захвату РНК с помощью анализа DLS и анализа Ribogreen, соответственно. Биофизический анализ липосом показан в таблице 35.

Таблица 35

Название образца	Отношение N:P	TFR	Отношение (водная/ органическая фаза)	Величина инкапсуляции РНК (пг/мл)	Выход инкапсуляции и РНК %	Размер	
						d, нм	PDI
SAM-RV94	8	22	2	31,46	86,9	113,1	0,12

ПРИМЕР 31

Общий протокол для смешивания в потоке.

[0797] Получают индивидуальные и отдельные маточные растворы, один из которых содержит липид, а другой - circRNA. Липидный раствор, содержащий нужный липид или смесь липидов, DSPC, холестерин и PEG-липид, получают растворением в 90% этаноле. Остальные 10% представляют собой цитратный буфер с низким pH. Концентрация маточного раствора липидов составляет 4 мг/мл. pH этого цитратного буфера может варьироваться от pH 3 до pH 5, в зависимости от типа используемого липида. CircRNA также растворяют в цитратном буфере в концентрации 4 мг/мл. Получают по 5 мл каждого маточного раствора.

[0798] Маточные растворы полностью прозрачны, а липиды полностью солюбилизированы перед объединением с circRNA. Маточные растворы можно нагревать

до полного растворения липидов. CircRNA, используемые в этом процессе, могут представлять собой немодифицированные или модифицированные олигонуклеотиды и могут быть конъюгированы с липофильными остатками, такими как холестерин.

[0799] Индивидуальные маточные растворы объединяют путем перекачки каждого раствора в Т-образное соединение. Двойной насос Watson-Marlow использовали для одновременного управления запуском и остановкой двух потоков. Полипропиленовая трубка диаметром 1,6 мм дополнительно уменьшена до 0,8 мм, чтобы увеличить линейную скорость потока. Полипропиленовая линия (внутренний диаметр=0,8 мм) крепится к каждой стороне Т-образного соединения. Полипропилен Т имеет линейную кромку 1,6 мм, что дает результирующий объем 4,1 мм³. Каждый из больших концов (1,6 мм) полипропиленовой лески помещен в пробирки, содержащие либо солюбилизованный маточный раствор липидов, либо солюбилизованную circRNA. После Т-образного соединения находится одна трубка, куда выходит объединенный поток. Затем трубка проходит в контейнер с 2-кратным объемом PBS, который быстро перемешивают. Скорость потока насоса составляет 300 об/мин или 110 мл/мин. Этанол удаляют и заменяют PBS диализом. Липидные составы затем концентрируют с помощью центрифугирования или диафильтрации до соответствующей рабочей концентрации.

[0800] Мыши C57BL/6 (Charles River Labs, MA) получают либо физиологический раствор, либо композицию circRNA посредством инъекции в хвостовую вену. В различные моменты времени после введения образцы сыворотки собирают путем ретроорбитального кровопускания. Уровни белка фактора VII в сыворотке определяют в образцах с использованием хромогенного анализа (Biophen FVTI, Anigra Corporation, OH). Для определения уровней РНК фактора VII в печени животных забивают, печень собирают и быстро замораживают в жидком азоте. Тканевые лизаты получают из замороженных тканей, и уровни РНК фактора VII в печени определяют количественно, используя анализ разветвленной ДНК (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

[0801] Активность FVII оценивают у животных, получавших миРНК FVTI, через 48 часов после внутривенной (болюсной) инъекции мышам C57BL/6. FVII измеряют с использованием имеющегося в продаже набора для определения уровня белка в сыворотке или ткани в соответствии с инструкциями производителя на весах для микропланшетов. Снижение FVII определяют по сравнению с необработанными контрольными мышами, и результаты выражают в виде % остаточного FVII. Два уровня доз (0,05 и 0,005 мг/кг миРНК FVII) используются при скрининге каждой новой липосомной композиции.

ПРИМЕР 32

Состав circRNA с использованием предварительно образованных везикул.

[0802] Переносчики, содержащие катионный липид, получают с использованием метода предварительно образованных везикул. Катионный липид, DSPC, холестерин и PEG-липид солюбилизируют в этаноле при молярном соотношении 40/10/40/10 соответственно. Смесь липидов добавляют к водному буферу (50 мМ цитрата, pH 4) при перемешивании до конечной концентрации этанола и липидов 30% (о/о) и 6,1 мг/мл

соответственно и оставляют для уравнивания при комнатной температуре в течение 2 мин перед экструзией. Гидратированные липиды экстрадируют через два расположенных друг над другом фильтра с размером пор 80 нм (Nuclepore) при 22°C с использованием экструдера Lipex (Northern Lipids, Vancouver, BC) до получения диаметра везикул 70-90 нм, что определяют с помощью анализа Nicomp. Для смесей катионных липидов, которые не образуют маленьких везикул, гидратация смеси липидов буфером с более низким pH (50 мМ цитрата, pH 3) для протонирования фосфатной группы в головной группе DSPC помогает формировать стабильные везикулы размером 70-90 нм.

[0803] CircRNA FVII (солюбилизованную в 50 мМ цитрате, водном растворе с pH 4, содержащем 30% этанола) добавляли к везикулам, предварительно уравновешенным до 35°C, со скоростью ~5 мл/мин при перемешивании. После достижения конечного целевого соотношения circRNA/липиды, равного 0,06 (м/м), смесь инкубируют еще 30 мин при 35°C, чтобы обеспечить реорганизацию везикул и инкапсуляцию РНК FVII. Затем этанол удаляют, и внешний буфер заменяют PBS (155 мМ NaCl, 3 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ KH₂PO₄, pH 7,5) либо диализом, либо диафильтрацией с тангенциальным потоком. Окончательное отношение инкапсулированной circRNA к липиду определяют после удаления неинкапсулированной РНК с использованием центрифужной колонок с эксклюзионным размером или ионообменных центрифужной колонок.

ПРИМЕР 33

Экспрессия триспецифических антигенсвязывающих белков из сконструированной кольцевой РНК

[0804] Кольцевые РНК сконструированы так, чтобы включать: (1) 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга; (2) внутренний сайт посадки рибосомы (IRES); (3) область, кодирующую триспецифический антигенсвязывающий белок; и (4) 3'-область гомологии. Области триспецифического антигенсвязывающего белка сконструированы для получения типичного триспецифического антигенсвязывающего белка, который будет связываться с антигеном-мишенью, например, GPC3.

Получение домена связывания scFv CD3

[0805] Каноническая последовательность CD3-эпсилон-цепи человека имеет регистрационный номер Uniprot P07766. Каноническая последовательность гамма-цепи CD3 человека имеет регистрационный номер Uniprot P09693. Каноническая последовательность дельта-цепи CD3 человека имеет регистрационный номер Uniprot P043234. Антитела против CD3эпсилон, CD3гамма или CD3дельта получают с помощью известных технологий, таких как созревание аффинности. Когда в качестве исходного материала используют мышинные антитела против CD3, гуманизация мышинных антител против CD3 желательна для клинических условий, когда специфичные для мышей остатки могут индуцировать ответ человека против мышинового антигена (НАМА) у субъектов, получающих лечение триспецифическим антигенсвязывающим белком, описанным в настоящем документе. Гуманизацию осуществляют путем прививки CDR-областей мышинового антитела против CD3 на соответствующие каркасные области акцептора

зародышевой линии человека, необязательно включая другие модификации CDR и/или каркасных областей.

[0806] Таким образом, человеческие или гуманизированные антитела против CD3 используют для получения последовательностей scFv для доменов, связывающих CD3, триспецифического антигенсвязывающего белка. Получают последовательности ДНК, кодирующие человеческие или гуманизированные домены VL и VH, и кодоны для конструкций, необязательно, оптимизируют для экспрессии в клетках *Homo sapiens*. Порядок, в котором домены VL и VH появляются в scFv, варьируется (то есть ориентация VL-VH или VH-VL), и три копии субъединицы «G4S» или «G4S» (G4S)₃ соединяют переменные домены с получением домена scFv. Плазмидные конструкции scFv против CD3 могут иметь необязательные Flag, His или другие аффинные метки, и их электропорировать в HEK293 или другие подходящие клеточные линии человека или млекопитающих и очищают. Валидационные анализы включают анализ связывания с помощью FACS, кинетический анализ с использованием Proteon и окрашивание клеток, экспрессирующих CD3.

Получение связывающего домена scFv Глипикан-3 (GPC3)

[0807] Глипикан-3 (GPC3) представляет собой один из белков клеточной поверхности, присутствующих в гепатоцеллюлярной карциноме, но не присутствующих в здоровой нормальной ткани печени. Часто наблюдается его повышение при гепатоцеллюлярной карциноме, что связано с неблагоприятным прогнозом для пациентов с НСС. Известно, что он активирует передачу сигналов Wnt. Были получены антитела против GPC3, включая MDX-1414, HN3, GC33 и YP7.

[0808] scFv, связывающийся с GPC-3 или другим антигеном-мишенью, получают аналогично описанному выше способу получения scFv-связывающего домена с CD3.

Экспрессия триспецифических антигенсвязывающих белков *in vitro*

[0809] Система экспрессии клеток CHO (Flp-In®, Life Technologies), производная клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao and Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968; 60 (4):1275-81). Адгезивные клетки пересевают в соответствии со стандартными протоколами культивирования клеток, предоставленными Life Technologies.

[0810] Для адаптации к росту в суспензии клетки отделяют от колб с тканевой культурой и помещают в бессывороточную среду. Адаптированные к суспензии клетки криоконсервируют в среде с 10% DMSO.

[0811] Рекомбинантные клеточные линии CHO, стабильно экспрессирующие секретруемые триспецифические антигенсвязывающие белки, получают путем трансфекции адаптированных к суспензии клеток. Во время селекции с помощью антибиотика гигромицина В плотность жизнеспособных клеток измеряют два раза в неделю, клетки центрифугируют и ресуспендируют в свежей среде для селекции при максимальной плотности $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Пулы клеток, стабильно экспрессирующие триспецифические антигенсвязывающие белки, выделяют через 2-3 недели селекции, после чего клетки переносят в стандартную культуральную среду во

встряхиваемых колбах. Экспрессию рекомбинантных секретлируемых белков подтверждают с помощью электрофореза в белковом геле или проточной цитометрии. Стабильные клеточные пулы криоконсервируют в среде, содержащей DMSO.

[0812] Триспецифические антигенсвязывающие белки продуцируют в 10-дневных культурах стабильно трансфицированных клеточных линий СНО с подпиткой путем секреции в супернатант клеточной культуры. Супернатанты клеточных культур собирают через 10 дней при жизнеспособности культур обычно >75%. Образцы собирают из культур для продуцирования через день, и оценивают плотность и жизнеспособность клеток. В день сбора супернатанты клеточных культур очищают центрифугированием и вакуумной фильтрацией перед дальнейшим использованием.

[0813] Титры экспрессии белков и целостность продукта в супернатантах клеточных культур анализируют с помощью SDS-PAGE.

Очистка триспецифических антигенсвязывающих белков

[0814] Триспецифические антигенсвязывающие белки очищают из супернатантов клеточной культуры СНО с помощью двухстадийной процедуры. Конструкции подвергают аффинной хроматографии на первом этапе с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (SEC) на Superdex 200 на втором этапе. Образцы заменяют буфером и концентрируют с помощью ультрафильтрация до типичной концентрации >1 мг/мл. Чистоту и гомогенность (обычно >90%) конечных образцов оценивают с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с последующим иммуноблоттингом с использованием антител против (домена продления периода полужизни) или против идиотипа, а также с помощью аналитической SEC, соответственно. Очищенные белки хранят аликвотами при температуре -80°C до использования.

ПРИМЕР 34

Экспрессия сконструированной кольцевой РНК с доменом продления периода полужизни имеет улучшенные фармакокинетические параметры, чем без домена продления периода полужизни.

[0815] Триспецифический антигенсвязывающий белок, кодируемый молекулой *circRNA* из примера 23, вводят яванским макакам в виде болюсной инъекции 0,5 мг/кг внутримышечно. Другая группа яванских макак получает сравнимый по размеру белок, кодируемый на молекуле *circRNA*, с доменами связывания с CD3 и GPC-3, но без домена продления периода полужизни. Третья и четвертая группы получают белок, закодированный на молекуле *circRNA*, с доменами связывания CD3 и доменом продления периода полужизни, и белок с доменами GPC-3 и доменом продления периода полужизни, соответственно. Оба белка, кодируемые *circRNA*, сопоставимы по размеру с триспецифическим антигенсвязывающим белком. Каждая тестовая группа состоит из 5 обезьян. Образцы сыворотки берут в указанные моменты времени, серийно разбавляют и определяют концентрацию белков с помощью ELISA связывания с CD3 и/или GPC-3.

[0816] Фармакокинетический анализ проводят с использованием концентраций испытуемого состава в плазме. Средние групповые данные по плазме для каждого

тестируемого изделия соответствуют многоэкспоненциальному профилю при построении графика зависимости от времени после введения дозы. Данные соответствуют стандартной двухкомпонентной модели с введением болюса и константами скорости первого порядка для фаз распределения и элиминации. Общее уравнение наилучшего соответствия данных для в/в введения: $c(t) = Ae^{-at} + Be^{-\beta t}$, где $c(t)$ - концентрация в плазме в момент времени t , A и B - точки пересечения на оси Y , а a и β - кажущиеся константы скорости первого порядка для фаз распределения и элиминации, соответственно. A -фаза представляет собой начальную фазу клиренса и отражает распределение белка во всей внеклеточной жидкости животного, тогда как вторая часть или β -фаза кривой затухания представляет собой истинный плазменный клиренс. Способы подгонки таких уравнений хорошо известны в данной области. Например, $A = D/V(a - k_{21})/(a - p)$, $B = D/V(p - k_{21})/(a - p)$, а a и β (при $\alpha > \beta$) являются корнями квадратного уравнения: $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ с использованием оценочных параметров V = объем распределения, k_{10} = скорость элиминации, k_{12} = скорость переноса из отсека 1 в отсек 2 и k_{21} = скорость переноса из отсека 2 в отсек 1, и D = введенная доза.

[0817] Анализ данных. Графики зависимости концентрации от времени строят с использованием KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, PA). Значения, о которых сообщается, что они ниже регистрируемых (LTR), не включают в фармакокинетический анализ и не представляют графически. Фармакокинетические параметры определяют путем отдельного анализа с использованием программного обеспечения WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, CA). Фармакокинетические параметры рассчитывают, как описано в Ritschel WA and Kearns GL, 1999, EST: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 5-е издание, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D C.

[0818] Ожидается, что триспецифический антигенсвязывающий белок, кодируемый молекулой *circRNA* из примера 23, имеет улучшенные фармакокинетические параметры, такие как увеличение периода полужизни, по сравнению с белками, не имеющими домена, удлиняющего период полужизни.

ПРИМЕР 35

Цитотоксичность триспецифического антигенсвязывающего белка

[0819] Триспецифический антигенсвязывающий белок, кодируемый молекулой *circRNA* из примера 23, оценивают *in vitro* на его опосредование Т-клеточно-зависимой цитотоксичности по отношению к клеткам-мишеням GPC-3+.

[0820] Флуоресцентно меченные клетки-мишени GPC3 инкубируют с изолированными РВМС случайных доноров или Т-клетками в качестве эффекторных клеток в присутствии триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 23. После инкубации в течение 4 ч при 37°C. во влажном инкубаторе выделение флуоресцентного красителя из клеток-мишеней в супернатант определяют на спектрофлуориметре. Клетки-мишени, инкубированные без триспецифического

антигенсвязывающего белка из примера 23, и клетки-мишени, полностью лизированные добавлением сапонина в конце инкубации, служат в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

[0821] На основании измеренных оставшихся живых клеток-мишеней процент специфического клеточного лизиса рассчитывают по следующей формуле: $[1 - (\text{количество живых мишеней (образец)} / \text{количество живых мишеней (спонтанных)})] \times 100\%$. Сигмоидальные кривые доза-эффект и значения EC50 рассчитываются с помощью нелинейной регрессии/4-параметрической логистической подгонки с использованием программного обеспечения GraphPad. Значения лизиса, полученные для данной концентрации антител, используют для расчета сигмоидальных кривых доза-реакция с помощью анализа логистической подгонки по 4 параметрам с использованием программного обеспечения Prism.

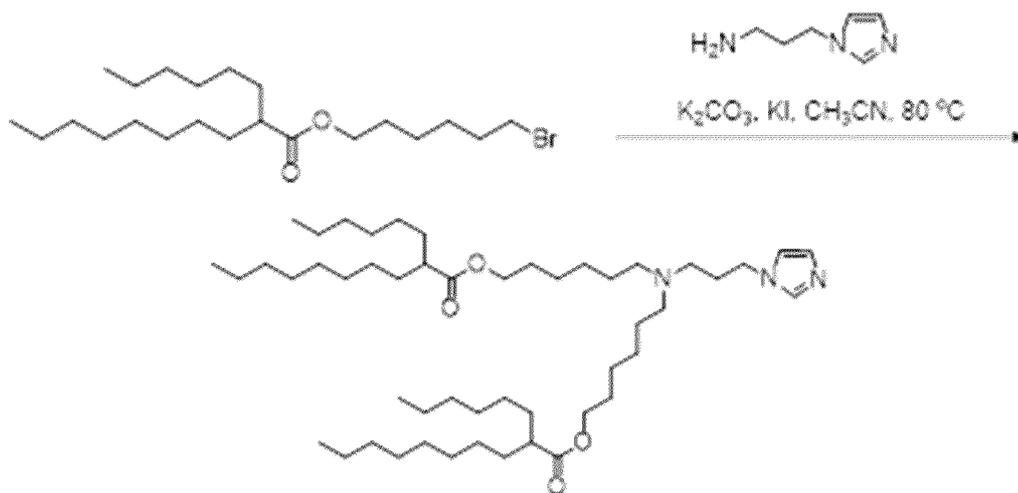
ПРИМЕР 36

Синтез ионизируемых липидов

38.1 Синтез ((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеcanoат) (липид 27, таблица 10a) и ((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеcanoат)) (липид 26, таблица 10a)

[0822] В круглодонную колбу на 100 мл, соединенную с холодильником, помещают 3-(1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (100 мг, 0,799 ммоль) или 3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (0,799 ммоль), 6-бромгексил-2-гексилдеcanoат (737,2 мг, 1,757 ммоль), карбонат калия (485 мг, 3,515 ммоль) и иодид калия (13 мг, 0,08 ммоль) смешивали в ацетонитриле (30 мл), и реакционную смесь нагревали до 80°C в течение 48 часов. Смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через слой целита. Фильтрат разбавляли этилацетатом. После промывки водой, рассолом сушат над безводным сульфатом натрия. Растворитель выпаривали, и неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO₂:CH₂Cl₂=от 100% до 10% метанола в CH₂Cl₂) и получали бесцветный масляный продукт (92 мг, 15%). Молекулярная формула ((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеcanoат)) представляет собой C₅₀H₉₅N₃O₄, а молекулярная масса (M_w) составляет 801,7.

Схема реакции синтеза ((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеcanoата)) (Липид 26, таблица 10a).



[0824] Характеристика липида 26 была выполнена с помощью LC-MS. фиг. 27А-С показывает характеристику липида 26. На фиг. 27А показан протонный ЯМР, наблюдаемый для липида 26. На фиг. 27В показана репрезентативная кривая LC-MS для липида 26 с показанными хроматограммами полных ионов и УФ.

38.2 Синтез липида 22-S14

38.2.1 Синтез 2-(тетрадецилтио)этан-1-ола

[0825] К смеси 2-сульфанилэтанола (5,40 г, 69,11 ммоль, 4,82 мл, 0,871 экв.) в ацетонитриле (200 мл) добавляли 1-бромтетрадекан (22 г, 79,34 ммоль, 23,66 мл, 1 экв.) и карбонат калия (17,55 г, 126,95 ммоль, 1,6 экв.) при 25°C. Реакционную смесь нагревали до 40°C и перемешивали в течение 12 часов. TLC (этилацетат/петролейный эфир=25/1, Rf=0,3, окраска I2) показала, что исходный материал полностью израсходован, и образовалось новое основное пятно. Реакционную смесь фильтровали, осадок на фильтре промывали ацетонитрилом (50 мл), а затем фильтрат концентрировали в вакууме с получением остатка, который очищали на колонке с силикагелем (этилацетат/петролейный эфир=от 1/100 до 1/25) с получением 2-(тетрадецилтио)этан-1-ола (14 г, выход 64,28%) в виде белого твердого вещества.

[0826] 1H ЯМР (ET36387-45-P1A, 400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 0,87-0,91 (m, 3H) 1,27 (s, 20H) 1,35-1,43 (m, 2H) 1,53-1,64 (m, 2H) 2,16 (br s, 1H) 2,49-2,56 (m, 2H) 2,74 (t, J=5,93 Гц, 2H) 3,72 (br d, J=4,89 Гц, 2H). На фиг. 28 показан соответствующий спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

38.2.2 Синтез 2-(тетрадецилтио)этилакрилата

[0827] К раствору 2-(тетрадецилтио)этан-1-ола (14 г, 51,00 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (240 мл) по каплям добавляли триэтиламин (7,74 г, 76,50 ммоль, 10,65 мл, 1,5 экв.) и проп-2-еноилхлорид (5,54 г, 61,20 ммоль, 4,99 мл, 1,2 экв.) при 0°C в атмосфере азота. Реакционную смесь нагревали до 25°C и перемешивали в течение 12 часов. TLC (этилацетат/петролейный эфир=25/1, Rf=0,5, окраска I2) показала, что исходный материал полностью израсходован, и образовалось новое основное пятно. Реакционный раствор концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который очищали на

колонке с силикагелем (этилацетат/петролейный эфир=от 1/100 до 1/25) с получением 2-(тетрадецилтио)этилакрилата (12 г, выход 71,61%) в виде бесцветного масла.

[0828] ^1H ЯМР (ET36387-49-P1A, 400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 0,85-0,93 (m, 3H) 1,26 (s, 19H) 1,35-1,43 (m, 2H) 1,53-1,65 (m, 2H) 2,53-2,62 (m, 2H) 2,79 (t, J=7,03 Гц, 2H) 4,32 (t, J=7,03 Гц, 2H) 5,86 (dd, J=10,39, 1,47 Гц, 1H) 6,09-6,19 (m, 1H) 6,43 (dd, J=17,30, 1,41 Гц, 1H). На фиг. 29 показан соответствующий спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

38.2.3 Синтез бис(2-(тетрадецилтио)этил) 3,3'-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (Липид 22-S14)

[0829] В колбу загружали 3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (300 мг, 2,16 ммоль) и 2-(тетрадецилтио)этилакрилат (1,70 г, 5,17 ммоль). Чистую реакционную смесь нагревали до 80°C и перемешивали в течение 48 часов. TLC (этилацетат, Rf=0,3, окраска I2, добавление одной капли гидроксида аммония) показала, что исходный материал полностью израсходован, и образовалось новое основное пятно. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (4 мл) и очищали на колонке с силикагелем (петролейный эфир/этилацетат=от 3/1 до 0/1, добавляли 0,1% гидроксид аммония) с получением бис(2-(тетрадецилтио)этил) 3,3'-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионат (501 мг, выход 29,1%) в виде бесцветного масла.

[0830] ^1H ЯМР (ET36387-51-P1A, 400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 0,87 (t, J=6,73 Гц, 6H) 1,25 (s, 40H) 1,33-1,40 (m, 4H) 1,52-1,61 (m, 4H) 1,81-1,90 (m, 2H) 2,36 (s, 3H) 2,39-2,46 (m, 6H) 2,53 (t, J=7,39 Гц, 4H) 2,70-2,78 (m, 8H) 3,84 (t, J=7,17 Гц, 2H) 4,21 (t, J=6,95 Гц, 4H) 6,85 (s, 1H) 6,89 (s, 1H). фиг. 30 показан соответствующий спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

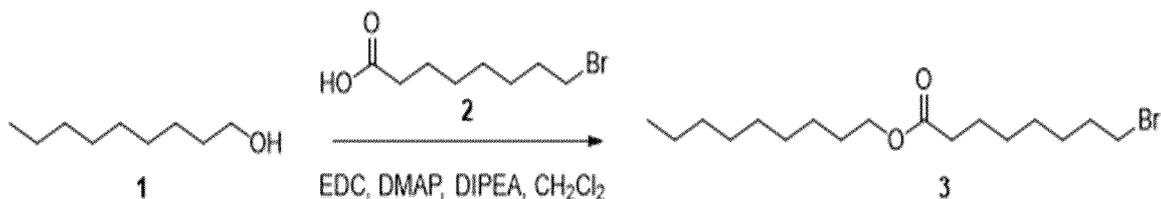
38.3 Синтез бис(2-(тетрадецилтио)этил) 3,3'-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (Липид 93-S14)

[0831] В колбу загружали 3-(1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (300 мг, 2,40 ммоль, 1 экв.) и 2-(тетрадецилтио)этилакрилат (1,89 г, 5,75 ммоль, 2,4 экв.). Чистую реакционную смесь нагревали до 80°C и перемешивали в течение 48 часов. TLC (этилацетат, Rf=0,3, окраска I2, добавление одной капли гидроксида аммония) показала, что исходный материал полностью израсходован, и образовалось новое основное пятно. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (4 мл) и очищали на колонке с силикагелем (петролейный эфир/этилацетат=1/20-0/100, добавляли 0,1% гидроксид аммония) с получением бис(2-(тетрадецилтио)этил) 3,3'-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (512 мг, выход 27,22%) в виде бесцветного масла.

[0832] ^1H ЯМР (ET36387-54-P1A, 400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 0,89 (t, J=6,84 Гц, 6H) 1,26 (s, 40H) 1,34-1,41 (m, 4H) 1,58 (br t, J=7,50 Гц, 4H) 1,92 (t, J=6,62 Гц, 2H) 2,36-2,46 (m, 6H) 2,55 (t, J=7,50 Гц, 4H) 2,75 (q, J=6,84 Гц, 8H) 3,97 (t, J=6,95 Гц, 2H) 4,23 (t, J=6,95 Гц, 4H) 6,95 (s, 1H) 7,06 (s, 1H) 7,51 (s, 1H). На фиг. 31 показан соответствующий спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

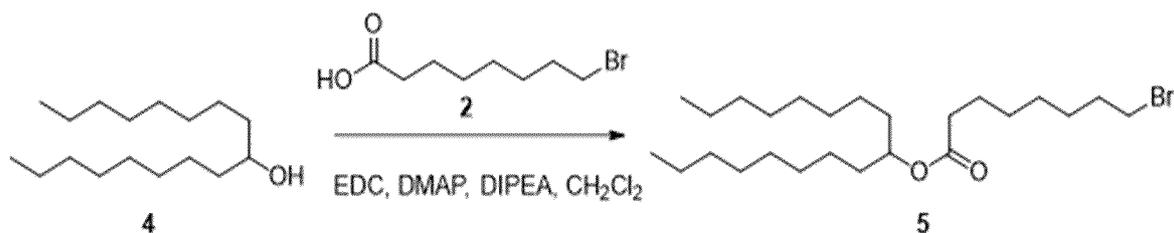
38.4 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (липид 54, таблица 10а)

38.4.1 Синтез нонил-8-бромоктаноата (3)



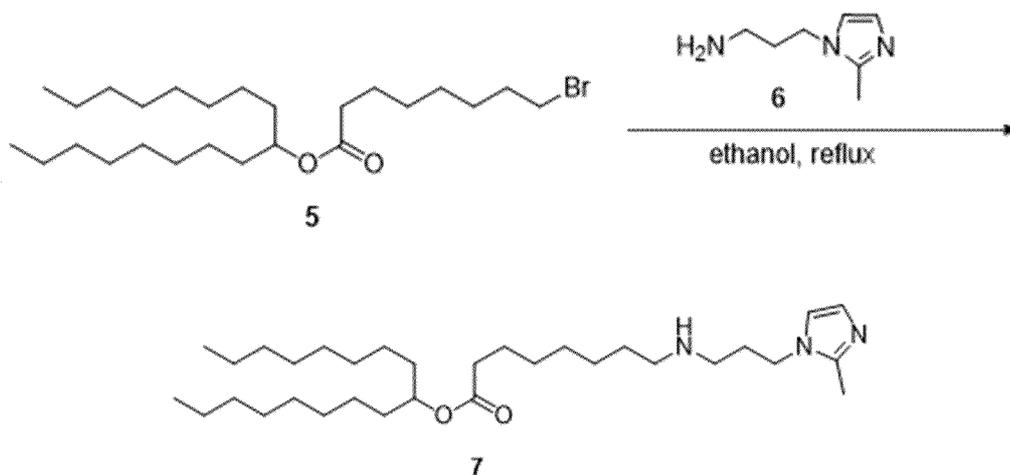
[0833] К смеси 8-бромоктановой кислоты (2) (18,6 г, 83,18 ммоль) и нонан-1-ола (1) (10 г, 69,32 ммоль) в CH₂Cl₂ (500 мл) добавляли DMAP (1,7 г, 13,86 ммоль), DIPEA (48 мл, 277,3 ммоль) и EDC (16 г, 83,18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После концентрирования реакционной смеси неочищенный остаток растворяли в этилацетате (500 мл), промывали 1 N HCl, насыщ. NaHCO₃, водой и рассолом. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄. Растворитель выпаривали, и неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO₂:гексан=от 100% до 30% EtOAc в гексане), и получали бесцветный масляный продукт 3 (9 г, 37%).

38.4.2 Синтез гептадекан-9-ил 8-бромоктаноата (5)



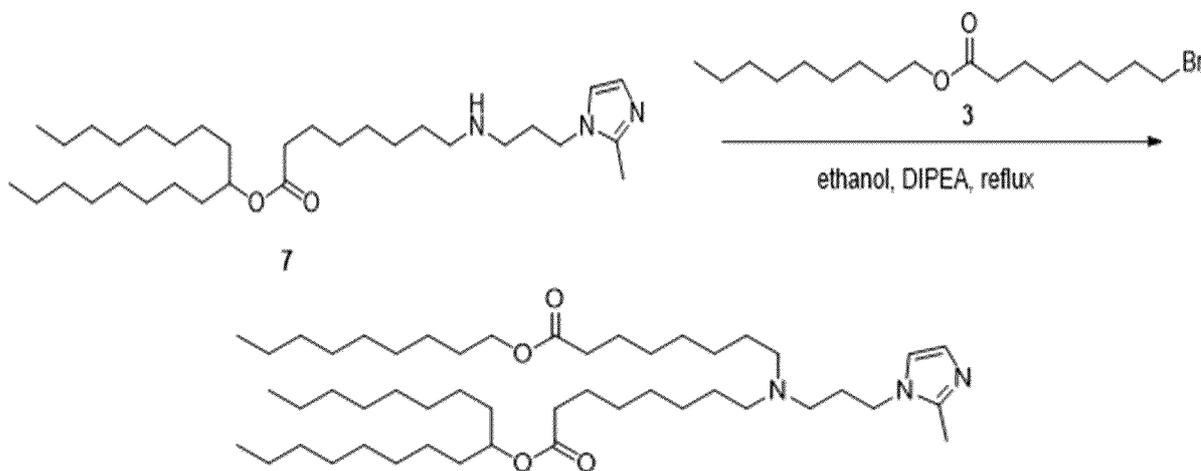
[0834] К смеси 8-бромоктановой кислоты (2) (10 г, 44,82 ммоль) и гептадекан-9-ола (4) (9,6 г, 37,35 ммоль) в CH₂Cl₂ (300 мл) добавляли DMAP (900 мг, 7,48 ммоль), DIPEA (26 мл, 149,7 ммоль) и EDC (10,7 г, 56,03 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После концентрирования реакционной смеси неочищенный остаток растворяли в этилацетате (300 мл), промывали 1 N HCl, насыщ. NaHCO₃, водой и рассолом. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄. Растворитель выпаривали, и неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO₂:гексан=от 100% до 30% EtOAc в гексане), и получали бесцветный масляный продукт 5 (5 г, 29%).

38.4.3 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)амино)октаноата (7)



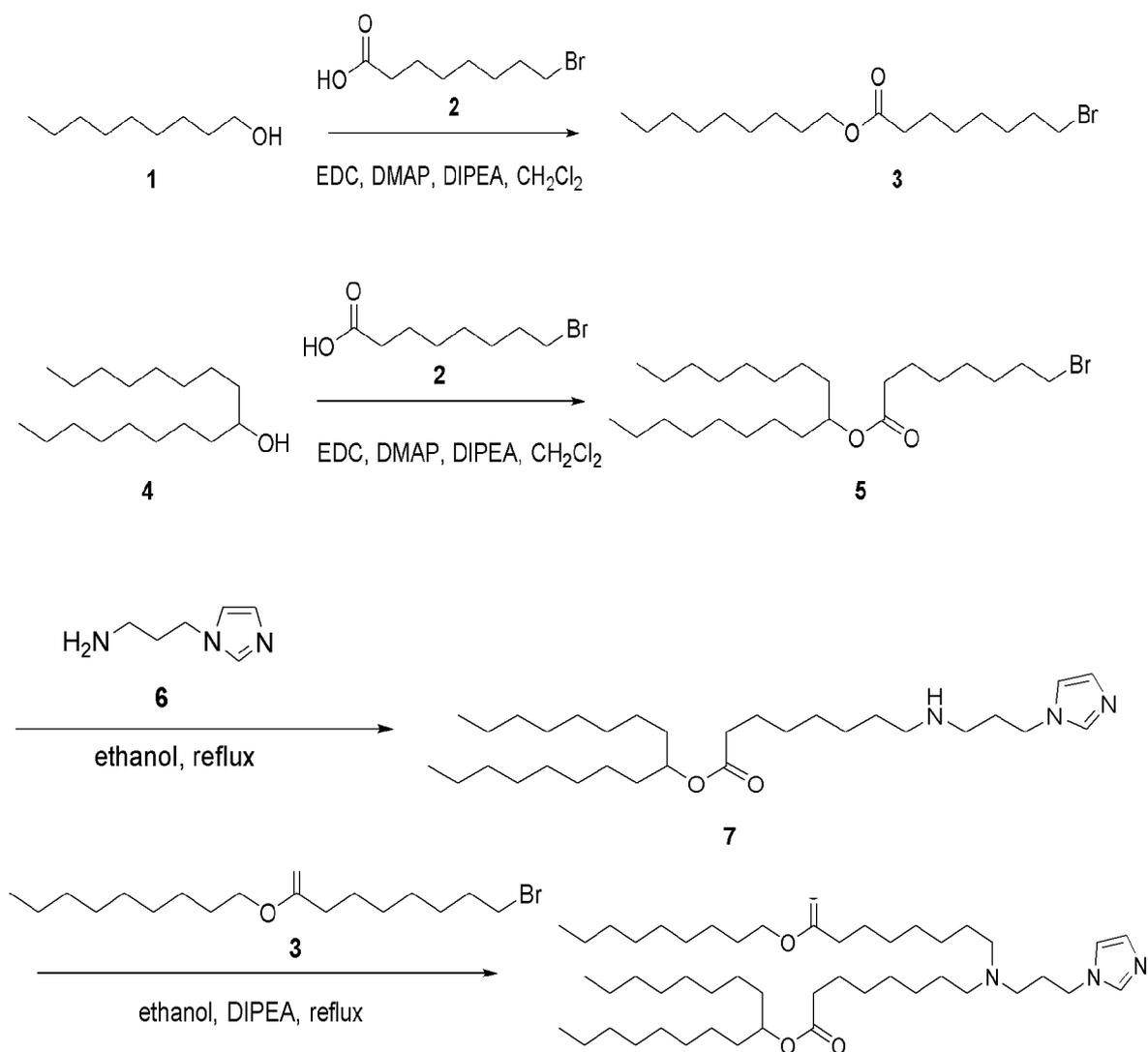
[0835] В круглодонную колбу на 100 мл, соединенную с холодильником, помещали гептадекан-9-ил 8-бромоктаноат (5) (860 мг, 1,868 ммоль) и 3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амин 1.3 г (9.339 ммоль) смешивали с 10 мл этанола. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. MS (APCI) показала ожидаемый продукт. Смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO₂:CH₂Cl₂=от 100% до 10% метанола+1%NH₄OH в CH₂Cl₂) и получали бесцветный масляный продукт 7 (665 мг, 69%).

38.4.4 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)амино)октаноата (липид 54, таблица 10a)



[0836] В круглодонную колбу на 100 мл, соединенную с холодильником, помещали гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)амино)октаноат (7) (665 мг, 1,279 ммоль) и нонил-8-бромоктаноат (3) (536 мг, 1,535 ммоль) смешивали с этанолом (10 мл), затем добавляли DIPEA (0,55 мл, 3,198 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. И MS (APCI), и TLC (10%MeOH+1%NH₄OH в CH₂Cl₂) показали продукт и некоторое количество непрореагировавшего исходного материала. Смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO₂:CH₂Cl₂=от 100% до 10% метанола+1%NH₄OH в CH₂Cl₂), и получали бесцветное масло (170 мг, 17%).

38.5 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (липид 53, таблица 10a)



[0837] Липид 53 из Таблицы 10a синтезируют в соответствии с приведенной выше схемой. Условия реакции идентичны липиду 54, за исключением 3-(1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амина в качестве имидазоламина.

ПРИМЕР 37

Готовая форма липидных наночастиц с кольцевой РНК

[0838] Липидные наночастицы (LNP) образовали с использованием прибора Precision Nanosystems Ignite со смесительной камерой NextGen. Этанольная фаза содержала ионизируемый липид 26 из таблицы 10a, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в молярном соотношении 16:1:4:1 или 62:4:33:1 с водной фазой, содержащей кольцевую РНК и 25 мМ буфера ацетата натрия при pH 5,2. Использовали соотношение смеси воды и этанола 3:1. Полученный LNP подвергали диализу в 1 л воды и заменяли 2 раза в течение 18 часов. Диализованные LNP фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм. Перед дозированием *in vivo* LNP разводили в PBS. Размеры LNP определяли методом

динамического светорассеяния. В кювете с 1 мл 20 мкг/мл LNP в PBS (pH 7,4) измеряли Z-среднее с помощью Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Регистрировали Z-среднее значение и индекс полидисперсности.

39.1 Состав липидов 26 и 27 из таблицы 10а

[0839] Липидные наночастицы (LNP) образовали с использованием прибора Precision Nanosystems Ignite со смесительной камерой NextGen. Этанольная фаза содержала ионизируемый липид 26 или липид 27 из таблицы 10а, DOPE, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в массовом соотношении 16:1:4:1 или 62:4:33:1 молярное соотношение объединяли с водной фазой, содержащей кольцевую РНК и 25 мМ буфера ацетата натрия при pH 5,2. Использовали соотношение смеси воды и этанола 3:1. Образованные LNP затем диализовали в 1 л воды и заменяли 2 раза в течение 18 часов. Диализованные LNP фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм. Перед дозированием *in vivo* LNP разводили в PBS. Размеры LNP определяли методом динамического светорассеяния. В кювете с 1 мл 20 мкг/мл LNP в PBS (pH 7,4) измеряли Z-среднее с помощью Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Регистрировали Z-среднее значение и индекс полидисперсности.

39.2 Состав липидов 53 и 54 из таблицы 10а

[0840] Липидные наночастицы (LNP) образовали с использованием прибора Precision Nanosystems Ignite со смесительной камерой NextGen. Этанольную фазу, содержащую ионизируемый липид 53 или 54 из таблицы 10а, DOPE, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) в молярном соотношении 50:10:38,5:1,5, объединяли с водной фазой, содержащей кольцевую РНК и 25 мМ буфера ацетата натрия при pH 5,2. Использовали соотношение смеси воды и этанола 3:1. Образованные LNP затем диализовали в 1 л 1x PBS и заменяли 2 раза в течение 18 часов. Диализованные LNP фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм. Перед дозированием *in vivo* LNP разводили в PBS. Размеры LNP определяли методом динамического светорассеяния. В кювете с 1 мл 20 мкг/мл LNP в PBS (pH 7,4) измеряли Z-среднее с помощью Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Регистрировали Z-среднее значение и индекс полидисперсности.

[0841] Дзета-потенциал LNP измеряли с использованием Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Смесь, содержащую 200 мкл раствора частиц в воде и 800 мкл дистиллированной воды без РНКазы с конечной концентрацией частиц 400 мкг/мл, загружали в капиллярную ячейку zetasizer для анализа.

[0842] Инкапсуляцию РНК определяли с использованием анализа Ribogreen. Растворы наночастиц разводили в буфере трис-этилендиаминтетрауксусной кислоты (TE) при теоретической концентрации оРНК 2 мкг/мл. Были приготовлены стандартные растворы оРНК, разведенные в TE-буфере, в пределах от 2 мкг/мл до 0,125 мкг/мл. Частицы и стандарты добавляли во все лунки и проводили вторую инкубацию (37°C при 350 об/мин в течение 3 минут). Флуоресценцию измеряли с помощью спектрофлуориметра для микропланшетов SPECTRAmax® GEMINI XS. Концентрацию кольцевой РНК в растворе каждой частицы рассчитывали, используя стандартную кривую. Эффективность

инкапсуляции рассчитывали по соотношению оРНК, обнаруженных между лизированными и нелизированными частицами.

Таблица 36а. Характеристика LNP

Ионизируемый Липид	размер (nm)	PDI	Эффективность инкапсуляции (%)	Дзета потенциал (мВ)
22-S14	88	0,09	96	3,968
93-S14	119	0,02	96	-6,071
Липид 26, Таблица 10а	86	0,08	92	-15,24

Таблица 36б. Характеристика LNP

Ионизируемый Липид	среднее значение Z (нм)	PDI	Захват РНК (%)
22-S14	64	0,05	97
93-S14	74	0,04	95
Липид 26, Таблица 10а	84	0,04	96

ПРИМЕР 38

Анализ *in vivo*

[0843] Самкам мышей CD-1 или самкам мышей c57BL/6J весом от 22 до 25 г внутривенно вводили 0,5 мг/кг РНК. Через шесть часов после инъекции мышам внутрибрюшинно вводили 200 мкл D-люциферина в концентрации 15 мг/мл. Через 5 минут после инъекции мышей анестезировали изофлураном и помещали внутрь системы визуализации IVIS Spectrum In Vivo (Perkin Elmer) дорсальной стороной вверх. Общий поток IVIS липидов 22-S14, 93-S14, липидов 26 всего тела (таблица 10а) представлен на фиг. 32А. После 10-минутной инъекции мышей сканировали на наличие люминесценции. Мышей подвергали эвтаназии и в течение 25 минут после инъекции люциферина, извлекали органы для сканирования на наличие люминесценции в печени, селезенке, почках, легких и сердце. Изображения (фиг. 33А-В, 34А-В, 35А-В) анализировали с использованием программного обеспечения Living Images (Perkin Elmer). Представляющие интерес области были нарисованы для получения потока и средней яркости и проанализированы на биораспределение экспрессии белка (фиг. 32А-В).

[0844] Фиг. 32А иллюстрирует повышенный общий поток во всем теле, наблюдаемый от орРНК люциферазы с LNP липида 26 (таблица 10а) по сравнению с LNP, полученными с липидами 22-S14 и 93-S14. На фиг. 32В показан анализ IVIS тканей *ex vivo*, дополнительно подчеркивающий повышенную общую экспрессию с помощью липида 26 (таблица 10а) при сохранении нужных соотношений селезенки и печени, наблюдаемых с липидами 22-S14 и 93-S14, несмотря на значительные структурные изменения, направленные на улучшение экспрессии. Эти данные подчеркивают улучшения, обеспечиваемые липидом 26 (таблица 10а), по сравнению с липидами, о которых

сообщалось ранее.

[0845] Анализ, аналогичный описанному выше, также проводили с оРНК, инкапсулированной в LNP, образованных липидом 15 из таблицы 10b или липидом 53 или 54 из таблицы 10a. На фиг. 36A-C показан анализ тканей IVIS *ex vivo*, соответственно выделяющий общую экспрессию с помощью липидов 15, 53 и 54 при сохранении нужного соотношения селезенки и печени, несмотря на значительные структурные изменения, направленные на улучшение экспрессии. На фиг. 36D показаны результаты контроля PBS. Эти данные демонстрируют улучшения, обеспечиваемые липидами 15, 53 и 54 из таблицы 10a, по сравнению с ранее описанными липидами, такими как 93-S14 и 22-S14.

ПРИМЕР 39

Доставка люциферазы

[0846] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) (Stemcell Technologies) трансфицировали липидными наночастицами (LNP), инкапсулирующими кольцевую РНК люциферазы светлячка (*f.luc*), и исследовали на экспрессию люциферазы. PBMC от двух разных доноров инкубировали *in vitro* с пятью различными композициями LNP, содержащими кольцевую РНК, кодирующую люциферазу светлячка (200 нг), при 37°C в RPMI, 2% человеческой сыворотки, IL-2 (10 нг/мл) и 50 мкМ BME. PBMC, инкубированные без LNP, использовали в качестве отрицательного контроля. Через 24 часа клетки лизировали и анализировали на экспрессию люциферазы светлячка на основе биолюминесценции (Promega BrightGlo).

[0847] На фиг. 37A и 37B представлены репрезентативные данные, демонстрирующие, что протестированные LNP способны доставлять кольцевую РНК в первичные иммунные клетки человека, что приводит к экспрессии белка.

ПРИМЕР 40

Доставка *in vitro* зеленого флуоресцентного белка (GFP) или химерного антигенного рецептора (CAR)

[0848] PBMC человека (Stemcell Technologies) трансфицировали LNP, инкапсулирующим GFP, и исследовали с помощью проточной цитометрии. PBMC от пяти разных доноров (PBMC A-E) инкубировали *in vitro* с одной композицией LNP, содержащей кольцевую РНК, кодирующую либо GFP, либо CD19-CAR (200 нг), при 37°C в RPMI, 2% сыворотки человека, IL-2 (10 нг/мл) и 50 мкМ BME. PBMC, инкубированные без LNP, использовали в качестве отрицательного контроля. Через 24, 48 или 72 часа после инкубации LNP клетки анализировали на наличие CD3, CD19, CD56, CD14, CD11b, CD45, фиксируемых живых и мертвых и полезной грузы (GFP или CD19-CAR).

[0849] Репрезентативные данные представлены на фиг. 38A и 38B, демонстрирующие, что тестируемый LNP способен доставлять кольцевую РНК в первичные иммунные клетки человека, что приводит к экспрессии белка.

ПРИМЕР 41

Множество вариантов IRES могут опосредовать экспрессию мышинового CD19 CAR *in vitro*.

[0850] Множество кольцевых РНК-конструкций, кодирующих CAR против мышинового CD19, содержат уникальные последовательности IRES, и их липотрансфицировали в клеточные линии 1C1C7. Перед липотрансфекцией клетки 1C1C7 размножают в течение нескольких дней в полной RPMI. После размножения клеток до соответствующего количества клетки 1C1C7 липотрансфицировали (Invitrogen RNAiMAX) четырьмя различными конструкциями кольцевой РНК. Через 24 часа клетки 1C1C7 инкубировали с His-меченым рекомбинантным мышинным белком CD19 (Sino Biological), затем окрашивали вторичным антителом против His. После этого клетки анализировали с помощью проточной цитометрии.

[0851] Репрезентативные данные представлены на фиг. 39, показывающие, что IRES, полученный из указанного вируса (apodemus agrarius picornavirus, kobuvirus козы, parabovirus и Salivirus), способен стимулировать экспрессию антимышиного CD19 CAR в мышинных Т-клетках.

ПРИМЕР 42

CAR против мышинового CD19 опосредует уничтожение опухолевых клеток *in vitro*

[0852] Циклическую РНК, кодирующую CAR против мышинового CD19, подвергали электропорации в Т-клетки мышей для оценки CAR-опосредованной цитотоксичности. Для электропорации Т-клетки подвергали электропорации кольцевой РНК, кодирующей CAR против мышинового CD19, с использованием системы Neon Transfection System ThermoFisher, а затем оставляли на ночь. Для анализа цитотоксичности электропорированные Т-клетки совместно культивировали с клетками-мишенями Fluc⁺ и клетками, не являющимися мишенями, в соотношении 1:1 в полной RPMI, содержащей 10% FBS, IL-2 (10 нг/мл) и 50 мкМ ВМЕ, и инкубировали в течение ночи. При 37°C. Цитотоксичность измеряли с помощью системы анализа люциферазы через 24 часа после совместного культивирования (Promega Brightglo Luciferase System) для обнаружения лизиса клеток-мишеней Fluc⁺ и клеток, не являющихся мишенями. Показанные значения рассчитаны относительно нетрансфицированного ложного сигнала.

[0853] Репрезентативные данные представлены на фиг. 40, показывающие, что CAR против мышинового CD19, экспрессируемый кольцевой РНК, является функциональным в мышинных Т-клетках *in vitro*.

ПРИМЕР 43

Функциональное истощение В-клеток инкапсулированной в липид кольцевой РНК, кодирующей CAR против мышинового CD19

[0854] Мышам C57BL/6J инъектировали LNP, образованный липидом 15 в таблице 10b, инкапсулирующий кольцевую РНК, кодирующую CAR против мышинового CD19. В качестве контроля липид 15 в таблице 10b, инкапсулирующий кольцевую РНК, кодирующую люциферазу светлячка (f.Luc), вводили другим группам мышей. Самкам C57BL.6J весом от 20 до 25 г внутривенно вводили 5 доз по 0,5 мг/кг LNP через день. Между инъекциями образцы крови анализировали с помощью проточной цитометрии на фиксируемые живые/мертвые, CD45, TCR ν b, B220, CD11b и антимышинный CAR. Через два

дня после последней инъекции селезенки собирали и обрабатывали для анализа методом проточной цитометрии. Спленоциты окрашивали на фиксируемые живые/мертвые, CD45, TCR $\nu\beta$, B220, CD11b, NK1.1, F4/80, CD11c и антимышиный CAR. Данные мышей, которым вводили LNP CAR против мышинового CD19, нормализовали по мышам, которым вводили f.Luc LNP.

[0855] Репрезентативные данные представлены на фиг. 41A, 41B и 41C, показывающие, что CAR против мышинового CD19, экспрессируемый кольцевой oPHK, доставляемой *in vivo* с LNP, является функциональным в мышинных Т-клетках *in vivo*.

ПРИМЕР 44

CD19 CAR, экспрессируемый из кольцевой PHK, имеет более высокий выход и больший цитотоксический эффект по сравнению с CD19 CAR, экспрессируемым из мPHK.

[0856] Кольцевая PHK, кодирующая химерный антигенный рецептор против CD19, который включает, от N-конца к C-концу, scFv, полученный из FMC63, трансмембранный домен CD8, костимуляторный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3 ζ , электропорировали в периферические Т-клетки человека для оценки поверхностной экспрессии и CAR-опосредованной цитотоксичности. Для сравнения, в этом эксперименте Т-клетки с электропорацией кольцевой PHK сравнивали с Т-клетками с электропорацией мPHK. Для электропорации CD3⁺ Т-клетки выделяли из PBMC человека с использованием коммерчески доступных наборов для выделения Т-клеток (Miltenyi Biotec) из донорских PBMC человека. После выделения Т-клетки стимулировали против CD3/против CD28 (Stemcell Technologies) и размножали в течение 5 дней при 37°C в полной RPMI, содержащей 10% FBS, IL-2 (10 нг/мл) и 50 мкМ BME. Через пять дней после стимуляции Т-клетки подвергали электропорации кольцевой PHK, кодирующей CAR против человеческого CD19, с использованием системы Neon Transfection System ThermoFisher, а затем оставляли на ночь. Для анализа цитотоксичности электропорированные Т-клетки совместно культивировали с клетками-мишенями Fluc⁺ и клетками, не являющимися мишенями, в соотношении 1:1 в полной RPMI, содержащей 10% FBS, IL-2 (10 нг/мл) и 50 мкМ BME, и инкубировали в течение ночи. При 37°C. Цитотоксичность измеряли с помощью системы анализа люциферазы через 24 часа после совместного культивирования (Promega Brightglo Luciferase System) для обнаружения лизиса клеток-мишеней Fluc⁺ и клеток, не являющихся мишенями. Кроме того, в день анализа брали аликвоту электропорированных Т-клеток и окрашивали их для окрашивания живых мертвых, CD3, CD45 и химерных антигенных рецепторов (FMC63).

[0857] Репрезентативные данные представлены на фиг. 42 и 43. На фиг. 42A и 42B показано, что CAR против CD19 человека, экспрессируемый из кольцевой PHK, экспрессируется на более высоких уровнях и дольше, чем CAR против CD19 человека, экспрессируемый из линейной мPHK. На фиг. 43A и 43B показано, что CAR против CD19 человека, экспрессируемый из кольцевой PHK, оказывает большее цитотоксическое действие по сравнению с CAR против CD19 человека, экспрессируемым из линейной мPHK.

ПРИМЕР 45

Функциональная экспрессия двух CAR из одной кольцевой РНК

[0858] Циклическую РНК, кодирующую химерные антигенные рецепторы, электропорировали в периферические Т-клетки человека для оценки поверхностной экспрессии и CAR-опосредованной цитотоксичности. Целью этого исследования является оценка того, может ли кольцевая РНК, кодирующая два CAR, быть стохастически экспрессирована с помощью последовательности 2A (P2A) или IRES. Для электропорации CD3⁺ Т-клетки были приобретены на рынке (Cellero), стимулированы против CD3/против CD28 (Stemcell Technologies) и размножены в течение 5 дней при 37°C в полной RPMI, содержащей 10% FBS, IL-2 (10 нг/мл) и 50 мкМ BME. Через четыре дня после стимуляции Т-клетки подвергали электропорации кольцевой РНК, кодирующей CAR против человеческого CD19, CAR против человеческого CD19-2A - CAR против человеческого BCMA и CAR против человеческого CD19-IRES-CAR против человеческий BCMA с использованием ThermoFisher's Neon. Систему трансфекции м потом оставляли на ночь. Для анализа цитотоксичности электропорированные Т-клетки культивировали совместно с клетками Fluc⁺ K562, экспрессирующими антигены CD19 или BCMA человека в соотношении 1:1, в полной RPMI, содержащей 10% FBS, IL-2 (10 нг/мл) и 50 мкМ BME и инкубировали в течение ночи при 37°C. Цитотоксичность измеряли с помощью системы анализа люциферазы через 24 часа после совместного культивирования (система люциферазы Promega BrightGlo) для обнаружения лизиса клеток-мишеней Fluc⁺.

[0859] Репрезентативные данные представлены на фиг. 44, демонстрирующие, что два CAR могут быть функционально экспрессированы из одной и той же конструкции кольцевой РНК и проявлять цитотоксическую эффекторную функцию.

ПРИМЕР 46

Кольцевая трансфекция РНК *in vivo* с использованием репортерных мышей Cre

[0860] Кольцевые РНК, кодирующие рекомбиназу Cre (Cre), инкапсулируют в липидные наночастицы, как описано ранее. Самкам мышей B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J (Ai9) в возрасте 6-8 недель вводили липидные наночастицы в дозе 0,5 мг/кг РНК внутривенно. Флуоресцентный белок tdTomato был транскрибирован и транслирован у мышей Ai9 при рекомбинации Cre, что означает, что кольцевые РНК были доставлены и транслированы в клетки tdTomato⁺. Через 48 часов мышей подвергали эвтаназии, и собирали селезенки, превращали в суспензию отдельных клеток и окрашивали различными антителами, конъюгированными с флуорофором, для иммунофенотипирования с помощью проточной цитометрии.

[0861] На фиг. 45A показаны репрезентативные графики FACS с частотами экспрессии tdTomato в различных субпопуляциях иммунных клеток селезенки (CD45⁺, живые), включая общие миелоиды (CD11b⁺), В-клетки (CD19⁺) и Т-клетки (TCR-B⁺) после обработки LNP, образованными липидом 27 или 26 из таблицы 10a или липидом 15 из таблицы 10b. Мыши Ai9, которым вводили PBS, давали фоновую флуоресценцию tdTomato. На фиг. 45B показана доля миелоидных клеток, В-клеток и Т-клеток, экспрессирующих

tdTomato (среднее значение+стандартное отклонение, n=3), что эквивалентно доле каждой клеточной популяции, которая была успешно трансфицирована кольцевой РНК Cre. LNP, полученные с использованием липидов 27 и 26 из таблицы 10а, демонстрируют значительно более высокую миелоидную и Т-клеточную трансфекцию по сравнению с липидом 93-S14, что подчеркивает улучшения, обеспечиваемые модификациями структуры липидов.

[0862] Фиг. 45С иллюстрирует долю дополнительных популяций иммунных клеток селезенки, экспрессирующих tdTomato с липидами 27 и 26 из таблицы 10а (среднее значение+стандартное отклонение, n=3), которые также включают NK-клетки (NKp46+, TCR-B-), классические моноциты (CD11b+, Ly-6G-, Ly-6C_hi), неклассические моноциты (CD11b+, Ly-6G-, Ly-6C_lo), нейтрофилы (CD11b+, Ly-6G+) и дендритные клетки (CD11c+, MHC-II+). Эти эксперименты демонстрируют, что LNP, полученные с липидами 27 и 26 из таблицы 10а и липидом 15 из таблицы 10b, эффективны при доставке кольцевых РНК во многие субпопуляции иммунных клеток селезенки у мышей и приводят к успешной экспрессии белка из кольцевой РНК в этих клетках.

ПРИМЕР 47

Пример 47А: Встроенные последовательности polyA и аффинная очистка для получения иммуномолчащей кольцевой РНК

[0863] Последовательности PolyA (20-30 нуклеотидов) вставляли в 5'- и 3'-концы конструкции РНК (предшественник РНК со встроенными последовательностями PolyA в интронах). Предшественник РНК и интроны альтернативно могут быть полиаденилированы посттранскрипционно с использованием, например, *E. coli* PolyA-полимеразы или дрожжевой polyA-полимеразы, которая требует использования дополнительного фермента.

[0864] Кольцевую РНК в этом примере циркуляризовали с помощью транскрипции *in vitro* (IVT) и аффинно очищали путем промывки коммерчески доступной смолой oligo-dT для селективного удаления polyA-меченых последовательностей (включая свободные интроны и предшественники РНК) из реакции сплайсинга. IVT выполняли с помощью коммерческого набора IVT (New England Biolabs) или заказной смеси IVT (Orna Therapeutics), содержащей гуанозинмонофосфат (GMP) и гуанозинтрифосфат (GTP) в различных соотношениях (GMP:GTP=8, 12,5 или 13,75).). В некоторых вариантах осуществления GMP с высоким соотношением GMP:GTP может быть предпочтительно включен в качестве первого нуклеотида, что дает большинство предшественников РНК с монофосфатным экпированием. Для сравнения, продукт кольцевой РНК альтернативно очищали обработкой Xrn1, РНКазой R и ДНКазой I (ферментная очистка).

[0865] Затем оценивали иммуногенность кольцевых РНК, полученных с использованием процессов аффинной очистки или ферментативной очистки. Вкратце, приготовленные кольцевые РНК трансфицировали в клетки A549. Через 24 часа клетки лизировали, и измеряли индукцию интерферона бета-1 по сравнению с ложными образцами с помощью количественной ПЦР. В качестве положительного контроля использовали 3p-

hpRNA, трифосфорилированную РНК.

[0866] Фиг. 46В и 46С показывают, что аффинная очистка с отрицательным отбором удаляет некольцевые продукты из реакций сплайсинга, когда последовательности polyA включены в элементы, которые удаляются во время сплайсинга и присутствуют в несплайсированных молекулах-предшественниках. На фиг. 46D показаны кольцевые РНК, полученные в проверенных условиях IVT, и все способы очистки являются иммуностабилизирующими. Эти результаты предполагают, что аффинная очистка с отрицательным отбором эквивалентна или превосходит ферментативную очистку для очистки кольцевой РНК и что индивидуальные условия синтеза кольцевой РНК (условия IVT) могут снизить зависимость от избытка GMP для достижения максимального иммунологического покоя.

Пример 47В: Специальный сайт связывания и аффинная очистка для продукции кольцевой РНК

[0867] Вместо polyA-меток можно включать специфически разработанные последовательности (DBS, выделенный сайт связывания).

[0868] Вместо polyA-метки можно использовать специальный сайт связывания (DBS), такой как специально разработанный комплементарный олигонуклеотид, который может связываться со смолой, для селективного истощения предшественника РНК и свободных интронов. В этом примере последовательности DBS (30 нуклеотидов) были вставлены в 5'- и 3'-концы предшественника РНК. РНК транскрибировали, и транскрибированный продукт промывали специальным комплементарным олигонуклеотидом, связанным со смолой.

[0869] Фиг. 47В и 47С демонстрирует, что включение разработанной последовательности DBS в элементы, которые удаляются во время сплайсинга, позволяет удалять несплайсированные предшественники РНК и свободные интронные компоненты в реакции сплайсинга посредством очистки с отрицательной аффинностью.

Пример 47С: Получение кольцевой РНК, кодирующей дистрофин

[0870] Кольцевую РНК размером 12000 нуклеотидов, кодирующую дистрофин, получали путем транскрипции предшественников РНК *in vitro* с последующей очисткой фермента с использованием смеси Xrn1, ДНКазы I и РНКазы R для деградации оставшихся линейных компонентов. На фиг. 48 показано, что кольцевая РНК, кодирующая дистрофин, была успешно получена.

ПРИМЕР 48

5'-спейсер между 3'-фрагментом интрона и IRES улучшает экспрессию кольцевой РНК

[0871] Сравнивали уровень экспрессии очищенных circRNA с различными 5'-спейсерами между 3'-интронным фрагментом и IRES в клетках Jurkat. Вкратце, люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации 60000 клеток с 250 нг каждой РНК.

[0872] Кроме того, сравнивали стабильность очищенных circRNA с различными 5'-

спейсерами между 3'-интронным фрагментом и IRES в клетках Jurkat. Вкратце, люминесценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* в супернатанте измеряли в течение 2 дней после электропорации 60000 клеток с 250 нг каждой РНК и нормализовали до экспрессии в 1 день.

[0873] Результаты показаны на фиг. 49А и 49В, что указывает на то, что добавление спейсера может усилить функцию IRES, а также на важность идентичности последовательности и длины добавленного спейсера. Потенциальное объяснение состоит в том, что спейсер добавляется прямо перед IRES и, вероятно, функционирует, позволяя IRES укладываться изолированно от других структурированных элементов, таких как фрагменты интрона.

ПРИМЕР 49

[0874] В этом примере описано делеционное сканирование с 5'- или 3'-конца IRES *kobuvirus* козы. Границы IRES, как правило, плохо охарактеризованы и требуют эмпирического анализа, и этот пример можно использовать для определения основных функциональных последовательностей, необходимых для управления трансляцией. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были получены с укороченными элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей люциферазу *gaussia*. У укороченных IRES-элементов нуклеотидные последовательности указанной длины были удалены с 5'- или 3'-конца. Люминесценцию секретируемой люциферазы *gaussia* в супернатанте измеряли через 24 и 48 часов после электропорации первичных Т-клеток человека с РНК. Стабильность экспрессии рассчитывали как отношение уровня экспрессии через 48 часов к уровню через 24 часа.

[0875] Как показано на фиг. 50, делеция более 40 нуклеотидов с 5'-конца IRES снижала экспрессию и нарушала функцию IRES. На стабильность экспрессии относительно не влияло усечение элемента IRES, но уровень экспрессии существенно снижался при делеции 141 нуклеотида с 3'-конца IRES, тогда как делеция 57 или 122 нуклеотидов с 3'-конца оказывала положительное влияние на уровень экспрессии.

[0876] Также было обнаружено, что делеция 6-нуклеотидной предстартовой последовательности снижает уровень экспрессии репортерной люциферазы. Замена 6-нуклеотидной последовательности классической последовательностью Козака (GCCACC) не оказала существенного влияния, но, по меньшей мере, сохранила экспрессию.

ПРИМЕР 50

[0877] В этом примере описаны модификации (например укорочения) выбранных последовательностей IRES, включая IRES *kobuvirus* козы (CKV), IRES *parabovirus*, IRES *Picornavirus Apodemus* (AP), IRES *kobuvirus* SZAL6, IRES *Crohivirusa B* (CrVB), IRES CVB3 и SAFV IRES. Последовательности элементов IRES представлены в SEQ ID NO: 348-389. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были получены с укороченными элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей люциферазу *gaussia*. Клетки HepG2 трансфицировали кольцевыми РНК. Люминесценцию в супернатанте оценивали через 24 и 48 часов после трансфекции. Стабильность экспрессии рассчитывали

как отношение уровня экспрессии через 48 часов к уровню через 24 часа.

[0878] Как показано на фиг. 51, усечения имели различные эффекты в зависимости от идентичности IRES, что может зависеть от механизма инициации и белковых факторов, используемых для трансляции, которые часто различаются между IRES. 5'- и 3'-делеции можно эффективно комбинировать, например, в контексте СКV IRES. Добавление канонической последовательности Козака в некоторых случаях значительно улучшало экспрессию (как в SAFV, Full vs Full+K) или уменьшало экспрессию (как в СКV, 5d40/3d122 vs 5d40/3d122+K).

ПРИМЕР 51

[0879] В этом примере описаны модификации последовательностей IRES СК-739, AP-748 и PV-743, включая мутации альтернативных сайтов инициации трансляции. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были получены с модифицированными элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей люциферазу *gaussia*. Люминесценцию секретируемой люциферазы *gaussia* в супернатанте измеряли через 24 и 48 часов после трансфекции клеток 1С1С7 РНК.

[0880] CUG был наиболее часто встречающимся альтернативным стартовым сайтом, но многие другие также были охарактеризованы. Эти триплеты могут присутствовать в тракте сканирования IRES перед стартовым кодоном и могут влиять на трансляцию правильных полипептидов. Были получены четыре альтернативные мутации сайта инициации с последовательностями IRES, представленными в SEQ ID NO: 378-380. Как показано на фиг. 52, мутации альтернативных сайтов инициации трансляции в IRES СК-739 влияли на трансляцию правильных полипептидов, положительно в некоторых случаях и отрицательно в других случаях. Мутация всех альтернативных сайтов инициации трансляции снижала уровень трансляции.

[0881] Альтернативные последовательности Козака, за 6 нуклеотидов до иницирующего кодона, также могут влиять на уровни экспрессии. 6-нуклеотидная последовательность перед стартовым кодоном представляла собой gTcacG, aaagtc, gTcacG, gtcattg, gcaaac и acaacc, соответственно, в СК-739 IRES и образцах № 1-5 в группе «6nt Pre-Start». Как показано на фиг. 52, замена определенных 6-нуклеотидных последовательностей перед стартовым кодоном влияла на трансляцию.

[0882] Также было замечено, что 5'- и 3'-концевые делеции в последовательностях IRES AP-748 и PV-743 снижали экспрессию. Однако в СК-739 IRES, который имел длинный тракт сканирования, делеции в тракте сканирования относительно не влияли на трансляцию.

ПРИМЕР 52

[0883] В этом примере описаны модификации выбранных последовательностей IRES путем вставки 5'- и/или 3'-нетранслируемых областей (UTR) и получения гибридов IRES. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были получены с модифицированными элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей люциферазу *gaussia*. Люминесценцию секретируемой люциферазы *gaussia* в супернатанте

измеряли через 24 и 48 часов после трансфекции клеток HepG2 РНК.

[0884] Последовательности IRES со вставленными UTR представлены в SEQ ID NO: 390-401. Как показано на фиг. 53, вставка 5'-UTR сразу после 3'-конца IRES и перед стартовым кодоном слегка увеличивала трансляцию IRES kobuvirus коз (СК), но в некоторых случаях отменяла трансляцию IRES Salivirus SZ1. Вставка 3' UTR сразу после стоп-кассеты не влияла на обе последовательности IRES.

[0885] Гибридные последовательности IRES СК представлены в SEQ ID NO: 390-401. СК IRES использовали в качестве основы, а определенные участки СК IRES заменяли на аналогичные структуры из других последовательностей IRES, например, SZ1 и AV (Aichivirus). Как показано на фиг. 53, некоторые гибридные синтетические последовательности IRES были функциональными, что указывает на то, что гибридные IRES могут быть сконструированы с использованием частей различных последовательностей IRES, которые демонстрируют сходные предсказанные структуры, в то время как удаление этих структур полностью отменяет функцию IRES.

ПРИМЕР 53

[0886] В этом примере описаны модификации кольцевых РНК путем введения вариантов стоп-кодона или кассеты. Вкратце, конструкции кольцевой РНК- были получены с элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей люциферазу *gaussia*, за которыми следовали кассеты переменных стоп-кодонов, которые включали стоп-кодон в каждой рамке и два стоп-кодона в рамке считывания кодирующей последовательности люциферазы *gaussia*. Клетки 1C1C7 трансфицировали кольцевыми РНК. Люминесценцию в супернатанте оценивали через 24 и 48 часов после трансфекции.

[0887] Последовательности кассет стоп-кодонов представлены в SEQ ID NO: 406-412. Как показано на фиг. 54, определенные кассеты стоп-кодонов улучшали уровни экспрессии, хотя они мало влияли на стабильность экспрессии. В частности, стоп-кассета с двумя стоп-кодонами кадра 1 (рамка считывания кодирующей последовательности люциферазы *gaussia*), первым из которых является ТАА, за которым следуют стоп-кодон кадра 2 и стоп-кодон кадра 3, эффективна для стимулирования функциональной трансляции.

ПРИМЕР 54

[0888] В этом примере описаны модификации кольцевых РНК путем вставки вариантов 5'-UTR. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были получены с элементами IRES с вариантами 5'-UTR, вставленными между 3'-концом IRES и стартовым кодоном, причем IRES функционально связан с последовательностью, кодирующей люциферазу *gaussia*. Клетки 1C1C7 трансфицировали кольцевыми РНК. Люминесценцию в супернатанте оценивали через 24 и 48 часов после трансфекции.

[0889] Последовательности вариантов 5'-UTR представлены в SEQ ID NO: 402-405. Как показано на фиг. 55, СК IRES с канонической последовательностью Козака (UTR4) был более эффективным, когда была добавлена 36-нуклеотидная неструктурированная спейсерная последовательность/с низким содержанием GC (UTR2), что свидетельствует о

том, что богатые GC последовательности Козака могут мешать складыванию ядра IRES. Использование спейсера с более высоким содержанием GC/структурированного спейсера с последовательностью Козака не показало такой же пользы (UTR3), возможно, из-за вмешательства самого спейсера в укладку IRES. Мутация последовательности Козака в gTcacG (UTR1) усилила трансляцию до того же уровня, что и альтернатива последовательность Козака+спейсер, без необходимости использования спейсера.

ПРИМЕР 55

[0890] В этом примере описано влияние сайтов-мишеней miРНК в кольцевых РНК на уровне экспрессии. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были получены с элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей человеческий эритропоэтин (hЕРО), где в конструкцию были вставлены 2 tandemных сайта-мишени miR-122. Клетки Huh7, экспрессирующие miR-122, трансфицировали кольцевыми РНК. Экспрессию hЕРО в супернатанте оценивали через 24 и 48 часов после трансфекции с помощью сэндвич-ELISA.

[0891] Как показано на фиг. 56, уровень экспрессии hЕРО снижался, когда сайты-мишени miR-122 были вставлены в кольцевую РНК. Этот результат демонстрирует, что экспрессия кольцевой РНК может регулироваться miРНК. Таким образом, специфичная для типа клеток или ткани экспрессия может быть достигнута за счет включения сайтов-мишеней miРНК, экспрессируемых в типах клеток, в которых экспрессия рекомбинантного белка нежелательна.

ПРИМЕР 56

Пример 56А: Экспрессия двух белков из одной circRNA, содержащей сайт 2А и функциональную стабильность РНК.

[0892] Циркулизовали конструкции, содержащие области интрона/экзона anabaena, различные IRES, первую последовательность экспрессии, кодирующую люциферазу Gaussia, саморасщепляющийся пептид 2А и вторую последовательность экспрессии, кодирующую GFP или EGFP. 20000-40000 клеток 293 трансфицировали 40 нг circRNA. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряют каждые 24 часа после трансфекции с полной заменой среды в каждый момент времени. Флуоресценцию экспрессированного GFP или EGFP измеряют через 24 часа после трансфекции.

Пример 56В: Экспрессия двух белков из одной кольцевой РНК, содержащей 2 последовательности IRES, и стабильность функциональной РНК.

[0893] Циркулизовали конструкции, содержащие интронные/экзонные области anabaena, первый IRES, первую последовательность экспрессии, кодирующую люциферазу Gaussia, необязательно спейсер, второй IRES и вторую последовательность экспрессии, кодирующую GFP или EGFP, причем первый и/или второй IRES варьируют по конструкции. Клетки 293 подвергают электропорации с 1 мкг продукта каждой реакции циркуляризации. Люминесценцию/флуоресценцию секретируемой люциферазы Gaussia и GFP или EGFP в супернатанте измеряют через 24 часа после электропорации.

Функциональную стабильность конструкций IRES в каждом раунде электропорации клеток 293 измеряют в течение 3 дней. Люминесценцию/флуоресценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* и GFP или EGFP в супернатанте измеряют каждые 24 часа после электропорации клеток 1 мкг продукта каждой реакции циркуляризации с последующей полной заменой среды.

ПРИМЕР 57

Экспрессия и функциональная стабильность кольцевых и линейных РНК, содержащих 2 последовательности экспрессии, разделенные сайтом расщепления.

[0894] Циркулизовали конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, первую последовательность экспрессии, кодирующую люциферазу *Gaussia*, саморасщепляющийся пептид 2A, последовательность экспрессии, кодирующую GFP или EGFP. Получают мРНК, кодирующую первую последовательность экспрессии, кодирующую люциферазу *Gaussia*, саморасщепляющийся пептид 2A, вторую последовательность экспрессии, кодирующую EGFP, хвост polyA ~150 нуклеотидов, и модифицированную с заменой 100% уридина на 1-метилпсевдоуридин. Экспрессию кольцевой и модифицированной мРНК измеряют в клетках 293. Люминесценцию/флуоресценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* и GFP или EGFP в супернатанте измеряют через 24 часа после электропорации клеток 1 мкг каждого вида РНК. Люминесценция/флуоресценция секретируемой люциферазы *Gaussia* и GFP или EGFP в супернатанте измеряют каждые 24 часа после электропорации в течение 3 дней, чтобы сравнить функциональную стабильность конструкции.

ПРИМЕР 58

Пример 58А: Сравнение экспрессии и функциональной стабильности конструкций с двойной экспрессией и конструкций с одинарной экспрессией.

[0895] Циркулизовали конструкции, содержащие область интрона/экзона *anabaena*, IRES, последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia*, саморасщепляющийся пептид 2A и последовательность экспрессии GFP или EGFP. Также циркулизовали конструкции, содержащие одну последовательность экспрессии (кодирующую люциферазу *Gaussia*, или GFP, или EGFP). Также получали линейные конструкции, содержащие одну последовательность экспрессии (кодирующую люциферазу *Gaussia* или GFP или EGFP). Клетки 293 подвергают электропорации с 1 мкг продукта каждой реакции циркуляризации или эквивалентным количеством линейной РНК. Флуоресценция секретируемой люциферазы *Gaussia* и положительность GFP или EGFP в супернатанте измеряют через 24 часа после электропорации.

[0896] Функциональную стабильность конструкций в каждом раунде электропорации клеток 293 измеряют в течение 3 дней. Люминесценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* в супернатанте измеряют каждые 24 часа после электропорации клеток 1 мкг продукта каждой реакции циркуляризации или эквивалентной мРНК с последующей полной заменой среды.

Пример 58В: Сравнение экспрессии и функциональной стабильности конструкций с

двойной экспрессией и конструкций с одинарной экспрессией.

[0897] Циркулировали конструкции, содержащие область интрона/экзона *anabaena*, первую IRES, последовательность экспрессии люциферазы *Gaussia*, вторую IRES и последовательность экспрессии GFP или EGFP. Также циркулировали конструкции, содержащие одну последовательность экспрессии (кодирующую люциферазу *Gaussia*, или GFP, или EGFP). Также получали линейные конструкции, содержащие одну последовательность экспрессии (кодирующую люциферазу *Gaussia* или GFP или EGFP). Клетки 293 подвергают электропорации с 1 мкг продукта каждой реакции циркуляризации или эквивалентным количеством линейной РНК. Флуоресценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* и положительность GFP или EGFP в супернатанте измеряют через 24 часа после электропорации.

[0898] Функциональную стабильность конструкций в каждом раунде электропорации клеток 293 измеряют в течение 3 дней. Люминесценцию секретируемой люциферазы *Gaussia* в супернатанте измеряют каждые 24 часа после электропорации клеток 1 мкг продукта каждой реакции циркуляризации или эквивалентной мРНК с последующей полной заменой среды.

ПРИМЕР 59

Пример 59А: Функциональное взаимодействие между полезными нагрузками TCR, выраженными с использованием IRES и сайта расщепления.

[0899] Циркулировали конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, IRES, последовательность экспрессии альфа-цепи TCR, саморасщепляющийся пептид 2А и последовательность экспрессии бета-цепи TCR.

[0900] Первичные CD3⁺ Т-клетки человека электропорировали с *circRNA* и совместно культивируют в течение 24 часов с клетками, стабильно экспрессирующими TCR-мишень, GFP и люциферазу светлячка. Первичные CD3⁺ Т-клетки человека имитируют электропорацию и совместно культивируют в качестве контроля. Количественную оценку специфического лизиса клеток-мишеней определяют путем обнаружения свечения светлячков. % специфического лизиса, определяемого как 1-[люминесценция в условиях TCR]/[люминесценция в псевдоусловиях].

Пример 59В: Функциональное взаимодействие между полезными нагрузками TCR, выраженное с использованием 2 IRES.

[0901] Циркулировали конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, первую IRES, последовательность экспрессии альфа-цепи TCR, необязательно спейсер, вторую IRES и последовательность экспрессии бета-цепи TCR.

[0902] Первичные CD3⁺ Т-клетки человека электропорировали с *circRNA* и совместно культивируют в течение 24 часов с клетками, стабильно экспрессирующими TCR-мишень, GFP и люциферазу светлячка. Первичные CD3⁺ Т-клетки человека имитируют электропорацию и совместно культивируют в качестве контроля. Количественную оценку специфического лизиса клеток-мишеней определяют путем обнаружения свечения светлячков. % специфического лизиса, определяемого как 1-[люминесценция в условиях

TCR]/[люминесценция в псевдоусловиях].

ПРИМЕР 60

Пример 60А: полезные грузы CAR, выраженные с использованием IRES и сайта расщепления.

[0903] Циркулировали конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, IRES, последовательность экспрессии CAR против CD19, саморасщепляющийся пептид 2А и последовательность экспрессии против С20 CAR.

[0904] Первичные CD3⁺ Т-клетки человека подвергают электропорации с *circRNA* и совместно культивируют в течение 24 часов с клетками, стабильно экспрессирующими обе мишени CAR, GFP и люциферазу светлячка. Первичные CD3⁺ Т-клетки человека имитируют электропорацию и совместно культивируют в качестве контроля. Количественную оценку специфического лизиса клеток-мишеней определяют путем обнаружения свечения светлячка. % специфического лизиса, определяемого как 1-[люминесценция в условиях TCR]/[люминесценция в псевдоусловиях].

Пример 60В: полезная нагрузка TCR, выраженная с использованием 2 IRES.

[0905] Циркулировали конструкции, содержащие области интрона/экзона *anabaena*, первый IRES, последовательность экспрессии CAR против CD19, необязательно спейсер, второй IRES и последовательность экспрессии против CD20 CAR.

[0906] Первичные CD3⁺ Т-клетки человека электропоруют с *circRNA* и совместно культивируют в течение 24 часов с клетками, стабильно экспрессирующими обе мишени CAR, GFP и люциферазу светлячка. Первичные CD3⁺ Т-клетки человека имитируют электропорацию и совместно культивируют в качестве контроля. Количественную оценку специфического лизиса клеток-мишеней определяют путем обнаружения свечения светлячка. % специфического лизиса, определяемого как 1-[люминесценция в условиях TCR]/[люминесценция в псевдоусловиях].

ПРИМЕР 61

Конструкция LNP и кольцевой РНК, содержащая CAR против CD19, снижает количество В-клеток в крови и селезенке *in vivo*.

[0907] Конструкции кольцевой РНК, кодирующие экспрессию CAR против CD19, инкапсулировали в липидные наночастицы, как описано выше. Для сравнения, кольцевые РНК, кодирующие экспрессию люциферазы, инкапсулировали в отдельные липидные наночастицы.

[0908] Мышам C57BL/6 в возрасте от 6 до 8 недель вводили любой раствор LNP через день, всего 4 инъекции LNP каждой мышце. Через 24 часа после последней инъекции LNP селезенки и кровь мышцей собирали, окрашивали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 57А и фиг. 57В, мыши, содержащие конструкции LNP-кольцевая РНК, кодирующие CAR против CD19, приводили к статистически значимому снижению CD19⁺ В-клеток в периферической крови и селезенке по сравнению с мышцами, получавшими LNP-кольцевую РНК, кодирующую люциферазу.

ПРИМЕР 62

Последовательности IRES, содержащиеся в кольцевой РНК, кодирующей CAR, улучшают экспрессию CAR и цитотоксичность Т-клеток.

[0909] Активированные мышью Т-клетки подвергали электропорации с 200 нг конструкций кольцевой РНК, содержащих уникальный IRES и последовательность экспрессии CAR против мышинового CD19 1D3ζ. IRES, содержащиеся в этих конструкциях, были получены полностью или частично из kobuvirus коз, Picornavirus коз, parabovirus или Salivirusa. IRES, полученный из kobuvirus коз, дополнительно оптимизировали по кодонам. В качестве контроля для сравнения использовали кольцевую РНК, содержащую CAR дзета-мышы дикого типа без IRES. Т-клетки окрашивали на CD-19 CAR через 24 часа после электропорации для оценки поверхностной экспрессии, а затем совместно культивировали с клетками-мишенями A20 Fluc. Затем проводили анализ на цитотоксическое уничтожение клеток Fluc+ A20 через 24 часа после совместного культивирования Т-клеток с клетками-мишенями.

[0910] Как видно на фиг. 58A, 58B, 58C и 59, уникальные IRES были способны повышать частоту, с которой Т-клетки экспрессировали белок CAR, и уровень экспрессии CAR на поверхности клеток. Увеличение частоты экспрессии белка CAR и уровня экспрессии CAR на поверхности клеток приводит к усилению противоопухолевого ответа.

ПРИМЕР 63

Цитозольные и поверхностные белки, экспрессированные кольцевой конструкцией РНК в первичных Т-клетках человека.

[0911] Конструкция кольцевой РНК содержала либо последовательность, кодирующую флуоресцентный цитозольный репортер, либо репортер поверхностного антигена. Флуоресцентные репортеры включали зеленый флуоресцентный белок, mCitrine, mWasabi, Tsapphire. Поверхностные репортеры включали CD52 и Thy1.1bio. Первичные Т-клетки человека активировали антителами против CD3/против CD28 и подвергали электропорации через 6 дней после активации кольцевой РНК, содержащей репортерную последовательность. Т-клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии через 24 часа после электропорации. Поверхностные антигены окрашивали коммерчески доступными антителами (например Biolegend, Miltenyi и BD).

[0912] Как видно на фиг. 60A и фиг. 60B, цитозольные и поверхностные белки могут экспрессироваться из кольцевой РНК, кодирующей белки в первичных Т-клетках человека.

ПРИМЕР 64

Циклические РНК, содержащие уникальные последовательности IRES, обладают улучшенной трансляционной экспрессией по сравнению с линейными мРНК.

[0913] Конструкции кольцевой РНК содержали уникальный IRES вместе с последовательностью экспрессии люциферазы светлячка (FLuc).

[0914] Т-клетки человека от 2 доноров обогащали и стимулировали антителами против CD3/против CD28. После нескольких дней пролиферации активированные Т-клетки собирали и подвергали электропорации с равным молярным содержанием либо мРНК, либо кольцевой РНК, экспрессирующих полезные грузы FLuc. Различные последовательности

IRES, в том числе полученные из kobuvirus коз, Picornavirus Apodemus и parabovirus, были изучены для оценки уровня экспрессии и продолжительности экспрессии полезных грузов в течение 7 дней. В течение 7 дней Т-клетки лизировали с помощью Promega Brightglo для оценки биолюминесценции.

[0915] Как показано на фиг. 61C, 61D, 61E, 61F и 61G, присутствие IRES в кольцевой РНК может увеличить трансляцию и экспрессию цитозольного белка на порядки и может улучшить экспрессию по сравнению с линейной мРНК. Это было обнаружено у нескольких доноров человеческих Т-клеток.

ПРИМЕР 65

Пример 65А: LNP-кольцевая РНК, кодирующая против CD19, опосредует уничтожение Т-клетками человека клеток K562.

[0916] Конструкции кольцевой РНК содержали последовательность, кодирующую против CD19-антитела. Затем кольцевые конструкции РНК инкапсулировали в липидные наночастицы (LNP).

[0917] Т-клетки человека стимулировали антителами против CD3/против CD28 и оставляли для пролиферации до 6 дней. На 6 день LNP-кольцевую РНК и АроЕ3 (1 мкг/мл) совместно культивировали с Т-клетками для опосредования трансфекции. Через 24 часа клетки Fluc+ K562 подвергали электропорации с 200 нг кольцевой РНК, кодирующей антитела против CD19, и затем совместно культивировали на 7 день. Через 48 часов после совместного культивирования проводили анализ на экспрессию CAR и цитотоксическое уничтожение клеток K562 посредством экспрессии Fluc.

[0918] Как показано на фиг. 62А и фиг. 62В, имеется Т-клеточная экспрессия CAR против CD19 в результате LNP-опосредованной доставки CAR *in vitro* в Т-клетки и его способность лизировать опухолевые клетки специфическим, антиген-зависимым образом в сконструированных клетках K562.

Пример 65В: LNP-кольцевая РНК, кодирующая антитело против ВСМА, опосредует уничтожение Т-клетками человека клеток K562.

[0919] Конструкции кольцевой РНК содержали последовательность, кодирующую антитела против ВСМА. Затем кольцевые конструкции РНК инкапсулировали в липидные наночастицы (LNP).

[0920] Т-клетки человека стимулировали против CD3/против CD28 и оставляли для пролиферации до 6 дней. На 6 день LNP-кольцевую РНК и АроЕ3 (1 мкг/мл) совместно культивировали с Т-клетками для опосредования трансфекции. Через 24 часа клетки Fluc+ K562 подвергали электропорации с 200 нг кольцевой РНК, кодирующей антитела против ВСМА, и затем совместно культивировали на 7 день. Через 48 часов после совместного культивирования проводили анализ на экспрессию CAR и цитотоксическое уничтожение клеток K562 посредством экспрессии Fluc.

[0921] Как показано на фиг. 62В, существует Т-клеточная экспрессия ВСМА CAR в результате LNP-опосредованной доставки CAR *in vitro* в Т-клетки и его способность лизировать опухолевые клетки специфическим, антиген-зависимым образом в

сконструированные клетки K562.

ПРИМЕР 66

CAR против CD19 Т-клетки проявляют противоопухолевую активность *in vitro*.

[0922] Человеческие Т-клетки активировали антителами против CD3/против CD28 и подвергали однократной электропорации с 200 нг CAR против CD19-экспрессирующей кольцевой РНК. Электропорированные Т-клетки культивировали совместно с клетками-мишенями FLuc+ Nalm6 и не являющимися мишенями клетками FLuc+K562 для оценки CAR-опосредованного уничтожения. Через 24 часа после совместного культивирования Т-клетки лизировали и исследовали на остаточную экспрессию FLuc клетками-мишенями и клетками, не являющимися мишенями, для оценки экспрессии и стабильности экспрессии в течение всего 8 дней.

[0923] Как показано на фиг. 63А и 63В, Т-клетки экспрессируют кольцевые конструкции РНК CAR специфическим антиген-зависимым образом. Результаты также показывают улучшенную цитотоксичность кольцевых РНК, кодирующих CAR, по сравнению с линейной мРНК, кодирующей CAR, и доставку функционального поверхностного рецептора.

ПРИМЕР 67

Эффективная трансфекция LNP кольцевой РНК, опосредованная AroE3

[0924] Т-клетки человека стимулировали антителами против CD3/против CD28 и оставляли для пролиферации до 6 дней. На 6 день вместе с Т-клетками культивировали липидные наночастицы (LNP) и кольцевую РНК, экспрессирующую раствор белка с зеленой флуоресценцией, с AroE3 или без него (1 мкг/мл). Через 24 часа Т-клетки окрашивали на живые/мертвые Т-клетки, и анализировали живые Т-клетки на экспрессию GFP на проточном цитометре.

[0925] Как показано на фиг. 64А, 64В, 61С, 61D и 64Е, эффективная трансфекция LNP может быть опосредована AroE3 на активированных Т-клетках с последующей значительной экспрессией полезных грузов. Эти результаты были продемонстрированы у нескольких доноров.

Включение посредством ссылки

[0926] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы включение каждой отдельной публикации, патента или заявки на патент было конкретно и отдельно указано посредством ссылки в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке 3'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, вторую последовательность экспрессии и 5'-фрагмент интрона группы I после сплайсинга.
2. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 1, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления между первой последовательностью экспрессии и второй последовательностью экспрессии.
3. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 2, в котором сайт расщепления представляет собой саморасщепляющийся спейсер.
4. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 3, в котором саморасщепляющийся спейсер представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A.
5. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 1, содержащий второй IRES между первой последовательностью экспрессии и второй последовательностью экспрессии.
6. Кольцевая РНК по п. 5, в которой первый IRES состоит или содержит последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 1-72.
7. Кольцевая РНК по п. 5 или 6, в которой второй IRES состоит или содержит последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 1-72.
8. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, причем первая последовательность экспрессии кодирует первый терапевтический белок, а вторая последовательность экспрессии кодирует второй терапевтический белок.
9. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, причем первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует антитело.
10. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, причем первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор.
11. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, причем первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции.
12. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, причем первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин.
13. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, причем первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует иммунную ингибирующую молекулу.
14. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, причем первая последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует агонист костимулирующей молекулы.
15. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, причем первая

последовательность экспрессии или вторая последовательность экспрессии кодирует ингибитор молекулы иммунной контрольной точки.

16. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует альфа-цепь Т-клеточного рецептора (TCR), а вторая последовательность экспрессии кодирует бета-цепь Т-клеточного рецептора (TCR).

17. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует бета-цепь Т-клеточного рецептора (TCR), а вторая последовательность экспрессии кодирует альфа-цепь Т-клеточного рецептора (TCR).

18. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует гамма-цепь Т-клеточного рецептора (TCR), а вторая последовательность экспрессии кодирует дельта-цепь Т-клеточного рецептора (TCR).

19. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует дельта-цепь Т-клеточного рецептора (TCR), а вторая последовательность экспрессии кодирует гамма-цепь Т-клеточного рецептора (TCR).

20. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR), а вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин.

21. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR).

22. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 20-21, причем цитокин выбирают из IL-2, IL-7, IL-12 и IL-15.

23. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR), а вторая последовательность экспрессии кодирует хемокин.

24. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует хемокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR).

25. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR), а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции.

26. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR).

27. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 25-26, причем фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B, HELIOS, Tbet, GATA3, RORgt и cd25.

28. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая

последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), а вторая последовательность экспрессии кодирует антагонист PD1 или PDL1.

29. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует антагонист PD1 или PDL1, а вторая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

30. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), а вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин.

31. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

32. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 30-31, причем цитокин выбирают из IL-2, IL-7, IL-12 и IL-15.

33. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), а вторая последовательность экспрессии кодирует хемокин.

34. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует хемокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

35. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин.

36. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции.

37. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 35-36, причем фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B, HELIOS, Tbet, GATA3, RORgt и cd25.

38. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 35-37, причем цитокин выбирают из IL-10, IL-12 и TGF β .

39. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует хемокин.

40. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует хемокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции.

41. Кольцевая РНК по любому из пп. 39-40, причем фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B и HELIOS.

42. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 39-41, причем хемокин представляет собой СС хемокин, СХС хемокин, С хемокин или СХЗС хемокин.

43. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 39-42, причем хемокин

выбирают из CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL 1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2 и CX3CL1.

44. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует опухолевый антиген, а вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин.

45. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует опухолевый антиген.

46. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 44-45, причем антиген представляет собой неоантиген.

47. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 44-46, причем цитокин представляет собой IFN γ .

48. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует CAR, а вторая последовательность экспрессии кодирует CAR.

49. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует цитокин, а вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин.

50. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 49, причем первая или вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин, выбранный из IL-10, TGF β и IL-35.

51. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 49-50, причем первая или вторая последовательность экспрессии кодирует цитокин, выбранный из IFN γ , IL-2, IL-7, IL-15 и IL-18.

52. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR), и вторая последовательность экспрессии кодирует Т-клеточный рецептор (TCR).

53. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует хемокин, и вторая последовательность экспрессии кодирует хемокин.

54. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая или вторая последовательность экспрессии кодирует иммуносупрессивный фермент.

55. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует ограничивающий скорость фермент, а вторая последовательность экспрессии кодирует ограничивающий поток фермент.

56. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует ограничивающий поток фермент, а вторая последовательность экспрессии кодирует ограничивающий скорость фермент.

57. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор выживания.

58. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует фактор выживания, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции.

59. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 57-58, причем фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B, HELIOS, Tbet, GATA3, RORgt и cd25.

60. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 57-59, причем фактор выживания выбирают из BCL-XL.

61. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая или вторая последовательность экспрессии кодирует белок теплового шока или комплекс.

62. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии кодирует белок теплового шока или комплекс.

63. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует белок теплового шока или комплекс, а вторая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции.

64. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 61-63, причем белок теплового шока или комплекс выбирают из Skp, Spy, FkpA, SurA, Hsp60, Hsp70, GroEL, GroES, Hsp90, HtpG, Hsp100, ClpA, ClpX, ClpP и Hsp104.

65. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 61-64, причем фактор транскрипции выбирают из FOXP3, STAT5B, HELIOS, Tbet, GATA3, RORgt и cd25.

66. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем одна либо и то, и другое последовательности экспрессии кодируют сигнальный белок.

67. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует фермент, а вторая последовательность экспрессии кодирует отрицательный регуляторный ингибитор первой последовательности экспрессии.

68. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует белок-отрицательный регуляторный ингибитор фермента, закодированного во второй последовательности экспрессии.

69. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 67-68, причем отрицательный регуляторный ингибитор выбирают из p57kip2, ингибитора VAX и TIPE2.

70. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует доминантно-негативный белок, а вторая последовательность экспрессии кодирует иммунный белок.

71. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует иммунный белок, а вторая последовательность экспрессии кодирует доминантно-негативный белок.

72. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая или вторая последовательность экспрессии кодирует противовоспалительный белок.

73. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии кодирует фактор транскрипции, а вторая последовательность экспрессии, способна преобразовывать 5-фторцитозин (5-FC) в 5-фторурацил (5-FU).

74. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, причем первая последовательность экспрессии, способна преобразовывать 5-фторцитозин (5-FC) в 5-фторурацил (5-FU), а вторая последовательность экспрессии представляет собой фактор транскрипции.

75. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 73-74, причем последовательность экспрессии, способная преобразовывать 5-фторцитозин (5-FC) в 5-фторурацил (5-FU), представляет собой цитозиндезаминазу.

76. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому предыдущему пункту, содержащий первый спейсер между 5'-образующей дуплекс областью и 3'-фрагментом интрона группы I после сплайсинга и второй спейсер между 5'-фрагментом интрона группы I после сплайсинга и 3'-образующей дуплекс областью.

77. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 76, причем первый и второй спейсеры каждый имеет длину от приблизительно 10 до приблизительно 60 нуклеотидов.

78. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, причем первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину от приблизительно 9 до приблизительно 19 нуклеотидов.

79. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 77-78, причем первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов.

80. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, причем IRES имеет последовательность IRES из вируса синдрома Таура, вируса Triatoma, вируса энцефаломиелита Тейлера, вируса обезьян 40, вируса Solenopsis invicta 1, вируса Rhopalosiphum padi, вируса ретикулоэндотелиоза, полиовируса человека 1, кишечного вируса Plautia stali, вируса Kashmir bee, rhinovirus человека 2, вируса Nomalodisca coagulata 1, вируса иммунодефицита человека 1 типа, вируса Nomalodisca coagulata 1, вируса Himetobi P, вируса гепатита С, вируса гепатита А, вируса гепатита GB, вируса ящура, Enterovirus человека 71, вируса ринита лошадей, вируса наподобие Picornavirus Ectroprepresents Obliqua, вируса Encephalomyocarditis, вируса дрозифилы С, вируса коксаки человека В3, tobamovirus крестоцветных, вируса паралича сверчков, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 1, вируса черной маточницы, вируса летального паралича тли, вируса птичьего энцефаломиелита, вируса острого паралича пчел, вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, вируса классической чумы свиней, FGF2 человека, SFTPA1 человека, AML1/RUNX1 человека, Drosophila antennapedia, AQP4 человека, AT1R человека, BAG-1 человека, BCL2 человека, BiP человека, c-IAP1 человека, c-тус человека, eIF4G человека, NDST4L мыши, LEF1 человека, HIF1 альфа мыши, p.тус

человека, Gtx мыши, p27kipl человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, *Drosophila reaper*, *Canine Scamper*, *Ubx* дрозофилы, *UNR* человека, *UtrA* мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, *Drosophila hairless*, *S. cerevisiae* TFIID, *S. cerevisiae* YAP1, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, Picobirnavirusa, HCV QC64, Cosavirus E/D человека, Cosavirus F человека, Cosavirus JMY человека, rhinovirus NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, salivirus A SH1, salivirus FHB, salivirusNG-J1, Parechovirus человека 1, Crohivirus B, Yc-3, Rosavirus M-7, Shanbavirus A, Pasivirus A, Pasivirus A 2, Echovirus E14, Parechovirus человека 5, вируса Aichi, вируса гепатита A HA16, Phopivirus, CVA10, Enterovirus C, Enterovirus D, Enterovirus J, Pegivirus человека 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, Pegivirus A 1220, Pasivirus A 3, Sapelovirus, Rosavirus B, вируса Bakunsa, Tremovirus A, Swine Pasivirus 1, PLV-CHN, Pasivirus A, Sicinivirus, Hepacivirus K, Hepacivirus A, BVDV1, вируса пограничной болезни, BVDV2, CSFV-PK15C, SF573 Dicitrovirus, вируса наподобие Picorna Hubei, CRPV, salivirus A BN5, salivirus A BN2, salivirus A 02394, salivirus A GUT, salivirus A CH, salivirus A SZ1, salivirus FHB, CVB3, CVB1, Echovirus 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 или аптамера eIF4G.

81. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, состоящий из природных нуклеотидов.

82. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, причем последовательность экспрессии оптимизирована по кодонам.

83. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, оптимизированный, чтобы в нем отсутствует по меньшей мере один участок связывания миРНК, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде.

84. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, оптимизированный, чтобы в нем отсутствует по меньшей мере один чувствительный к эндонуклеазе участок, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде.

85. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, оптимизированный, чтобы в нем отсутствует по меньшей мере один чувствительный к редактированию РНК участку, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде.

86. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, причем полинуклеотид кольцевой РНК имеет длину от приблизительно 100 нуклеотидов до приблизительно 15 тысяч пар нуклеотидов.

87. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* которого у людей составляет по меньшей мере приблизительно 20 часов.

88. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, функциональное время полужизни которого составляет по меньшей мере приблизительно

20 часов.

89. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, продолжительность терапевтического эффекта которого в клетке человека больше или равна продолжительности эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего такую же последовательность экспрессии.

90. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, функциональное время полужизни которого в клетке человека больше или равно времени эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего такую же последовательность экспрессии.

91. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, продолжительность терапевтического эффекта *in vivo* которого у людей больше продолжительности эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, имеющего такую же последовательность экспрессии.

92. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, функциональное время полужизни которого *in vivo* у людей больше времени эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, имеющего такую же последовательность экспрессии.

93. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК по любому из предыдущих пунктов, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

94. Фармацевтическая композиция по п. 93, причем наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка, биоразлагаемую наночастицу, биоразлагаемую липидную наночастицу, полимерную наночастицу или биоразлагаемую полимерную наночастицу.

95. Фармацевтическая композиция по п. 93 или 94, содержащая нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует эндоцитоз, опосредованный рецептором, или прямое слияние с выбранными клетками выбранной популяции клеток или ткани в отсутствие выделения или очистки клеток.

96. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 93-95, содержащая нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

97. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 93-96, причем нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, полинуклеотидный аптамер, переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи или их фрагмент.

98. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 93-97, причем менее 1% по массе полинуклеотидов в композиции представляют собой двухцепочечную РНК, шунты ДНК или трифосфорилированную РНК.

99. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 93-98, причем менее 1% по массе полинуклеотидов и белков в фармацевтической композиции представляют собой двухцепочечную РНК, шунты ДНК, трифосфорилированную РНК, протеинфосфатазы,

протеинлигазы и кэпирующие ферменты.

100. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-92, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

101. Способ по п. 100, причем нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи или их фрагмент.

102. Способ по любому из пп. 100-101, причем наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка или биоразлагаемую наночастицу.

103. Способ по любому из пп. 100-102, причем наночастица содержит один или несколько катионных липидов, ионизируемых липидов или сложных поли β -аминоэфиров.

104. Способ по любому из пп. 100-103, причем наночастица содержит один или несколько некатионных липидов.

105. Способ по любому из пп. 100-104, причем наночастица содержит один или несколько PEG-модифицированных липидов, липидов полиглутаминовой кислоты или липидов гиалуроновой кислоты.

106. Способ по любому из пп. 100-105, причем наночастица содержит холестерин.

107. Способ по любому из пп. 100-106, причем наночастица содержит арахидоновую кислоту или олеиновую кислоту.

108. Способ по любому из пп. 100-107, причем композиция содержит нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует эндоцитоз, опосредованный рецептором, избирательно в клетки выбранной популяции клеток в отсутствие выделения или очистки клеток.

109. Способ по любому из пп. 100-108, причем наночастица содержит более одного полинуклеотида кольцевой РНК.

110. Способ по любому из пп. 100-109, причем у субъекта имеется рак, выбранный из группы, состоящей из острого лимфоцитарного лейкоза; острого миелоидного лейкоза (AML); альвеолярной рабдомиосаркомы; В-клеточных злокачественных новообразований; рака мочевого пузыря (например карциномы мочевого пузыря); рака кости; рака головного мозга (например медуллобластомы); рака молочной железы; рака ануса, анального канала или аноректума; рака глаза; рака внутривенных желчных протоков; рака суставов; рака шеи; рака желчного пузыря; рака плевры; рака носа, полости носа или среднего уха; рака ротовой полости; рака вульвы; хронического лимфоцитарного лейкоза; хронического миелоидного рака; рака толстой кишки; рака пищевода, рака шейки матки; фибросаркомы; карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта; рака головы и шеи (например плоскоклеточной карциномы головы и шеи); лимфомы Ходжкина; рака гортаноглотки; рака почки; рака гортани; лейкемии; жидких опухолей; рака печени; рака легкого (например немелкоклеточной карциномы легкого и аденокарциномы легкого); лимфомы; мезотелиомы; мастоцитомы; меланомы; множественной миеломы; рака носоглотки;

неходжкинской лимфомы; В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза; волосатоклеточного лейкоза; острого лимфоцитарного лейкоза (ALL); лимфомы Беркитта; рака яичников; рака поджелудочной железы; рака брюшины; рака сальника; рака брыжейки; рака глотки; рака простаты; рака прямой кишки; рака почки; рака кожи; рака тонкой кишки; рака мягких тканей; солидных опухолей; синовиальной саркомы; рака желудка; рака яичек; рака щитовидной железы; и рака мочеочника.

111. Способ по любому из пп. 100-109, причем у субъекта имеется аутоиммунное заболевание, выбранное из склеродермии, болезни Грейвса, болезни Крона, болезни Сьергена, рассеянного склероза, болезни Хашимото, псориаза, миастении гравис, синдромов аутоиммунной полиэндокринопатии, сахарного диабета I типа (T1DM), аутоиммунного гастрита, аутоиммунного увеоретинита, полимиозита, колита, тиреоидита и генерализованных аутоиммунных заболеваний, типичным примером которых является волчанка.

112. Вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащего в следующем порядке 5'-образующую дуплекс область, 3'-фрагмент интрона группы I, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), первую последовательность экспрессии, вторую последовательность экспрессии, 5'-фрагмент интрона группы I и 3'-образующую дуплекс область.

113. Вектор по п. 112, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления между первой последовательностью экспрессии и второй последовательностью экспрессии.

114. Вектор по п. 112 или 113, причем сайт расщепления представляет собой саморасщепляющийся спейсер.

115. Вектор по любому из пп. 112-114, причем саморасщепляющийся спейсер представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A.

116. Вектор по любому из пп. 112-115, содержащий первый спейсер между 5'-образующей дуплекс областью и 3'-фрагментом интрона группы I и второй спейсер между 5'-фрагментом интрона группы I и 3'-образующей дуплекс областью.

117. Вектор по любому из пп. 112-116, причем первый и второй спейсеры каждый имеет длину от приблизительно 5 до приблизительно 60 нуклеотидов.

118. Вектор по любому из пп. 112-117, причем первый и второй спейсеры каждый содержит неструктурированную область длиной по меньшей мере 5 нуклеотидов.

119. Вектор по любому из пп. 112-118, причем первый и второй спейсеры каждый содержит структурированную область длиной по меньшей мере 7 нуклеотидов.

120. Вектор по любому из пп. 112-119, причем первая и вторая образующие дуплексы области каждая имеет длину от приблизительно 9 до 50 нуклеотидов.

121. Вектор по любому из пп. 112-120, причем вектор оптимизирован по кодонам.

122. Вектор по любому из пп. 112-121, в котором отсутствует по меньшей мере один участок связывания миРНК, присутствующий в эквивалентном полинуклеотиде до оптимизации.

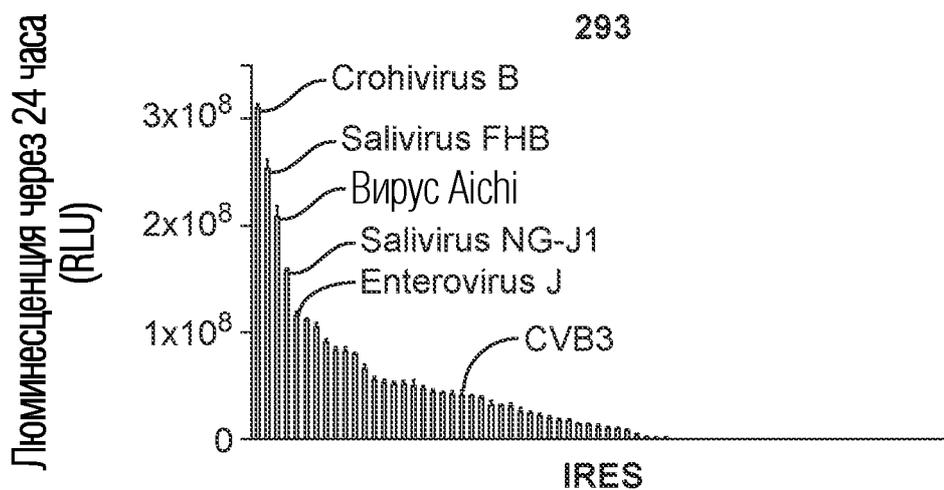
123. Эукариотическая клетка, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-92.

124. Эукариотическая клетка по п. 123, причем эукариотическая клетка представляет собой человеческую клетку.

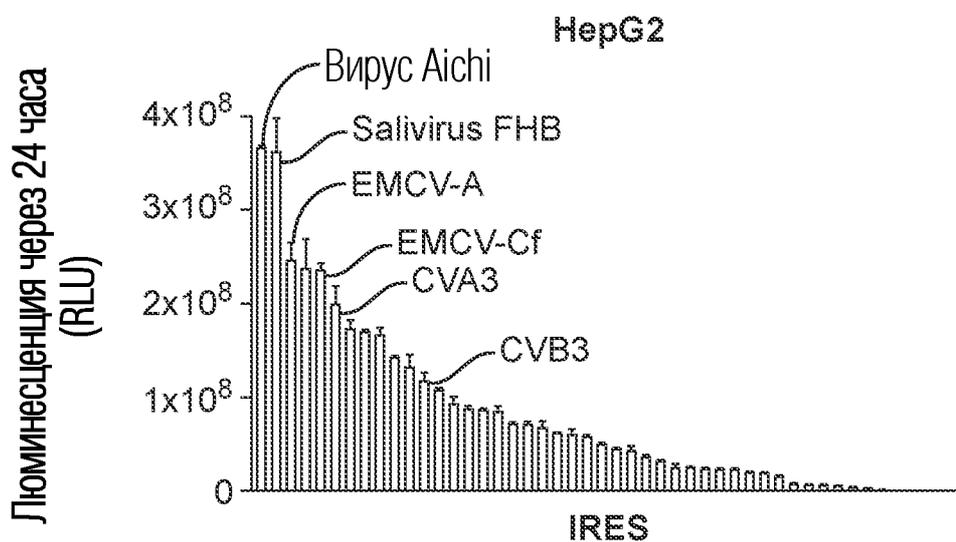
125. Эукариотическая клетка по п. 124, причем эукариотическая клетка представляет собой иммунную клетку.

126. Эукариотическая клетка по п. 125, причем эукариотическая клетка представляет собой Т-клетку.

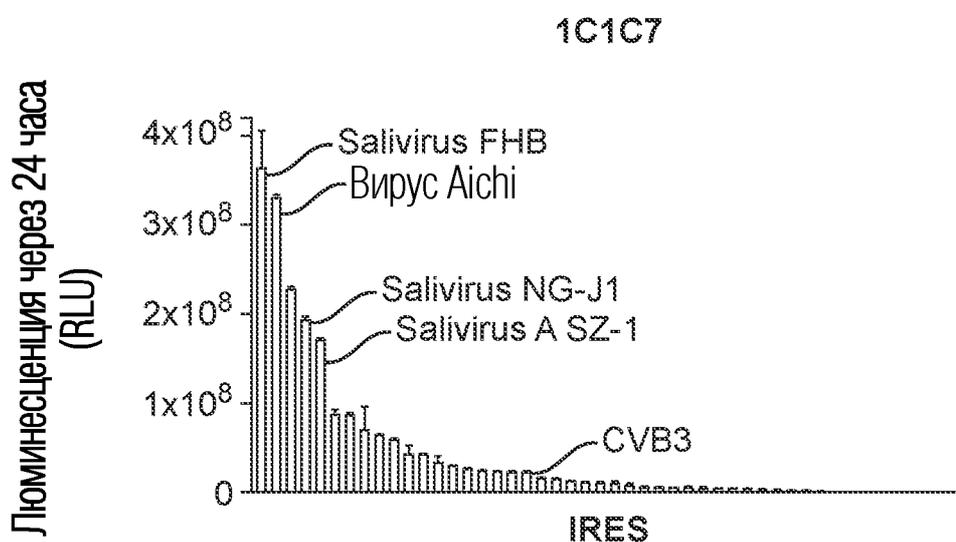
1/88



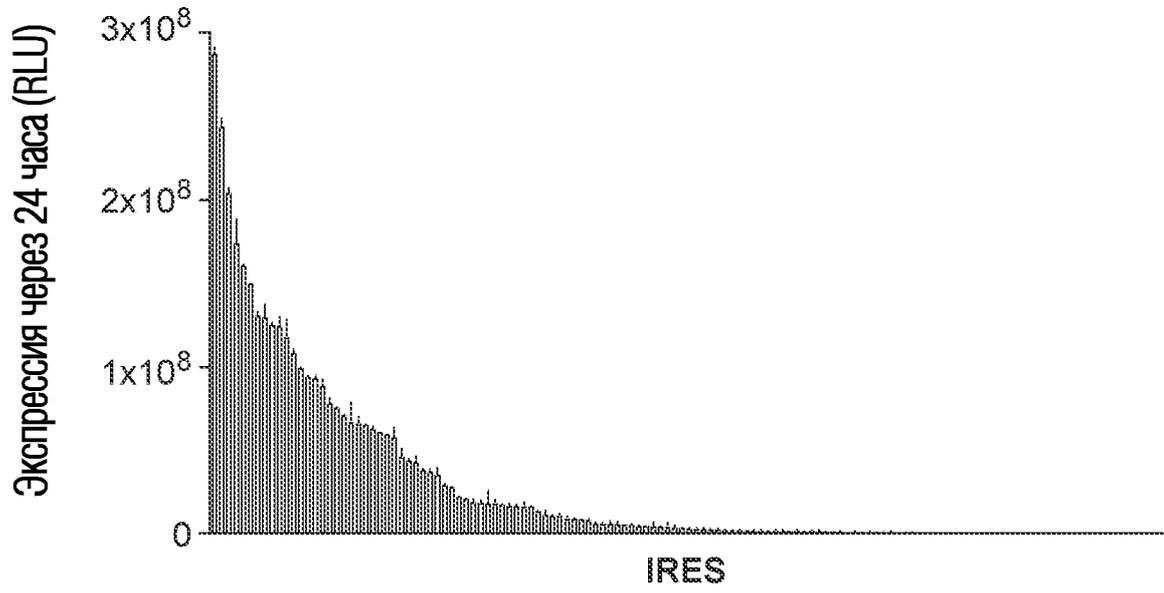
ФИГ. 1А



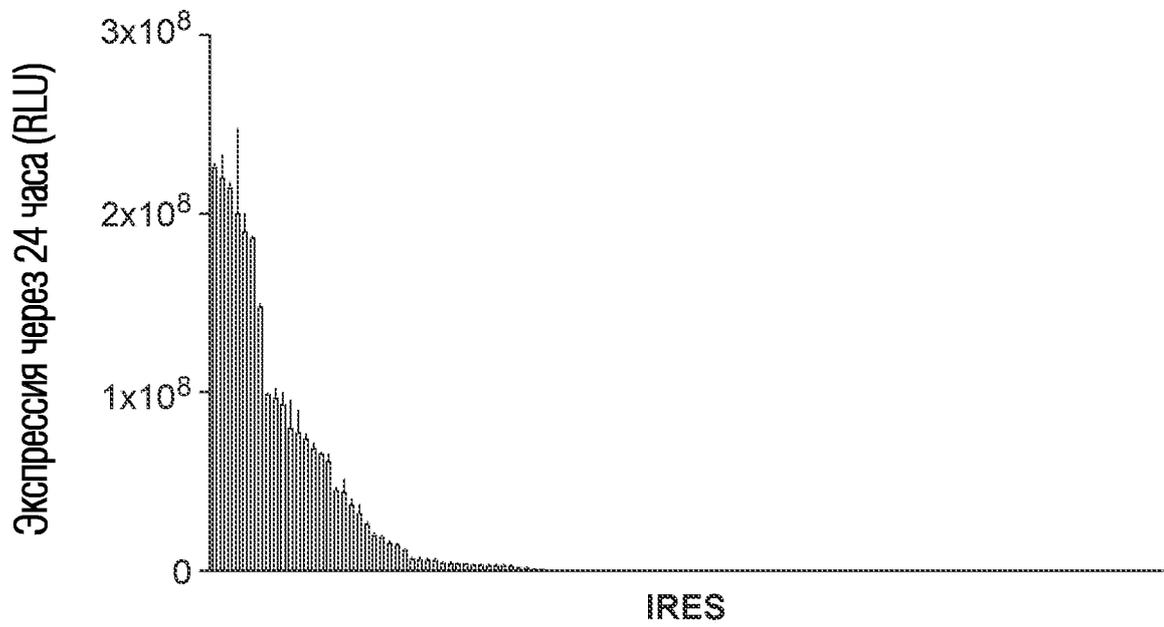
ФИГ. 1В



ФИГ. 1С

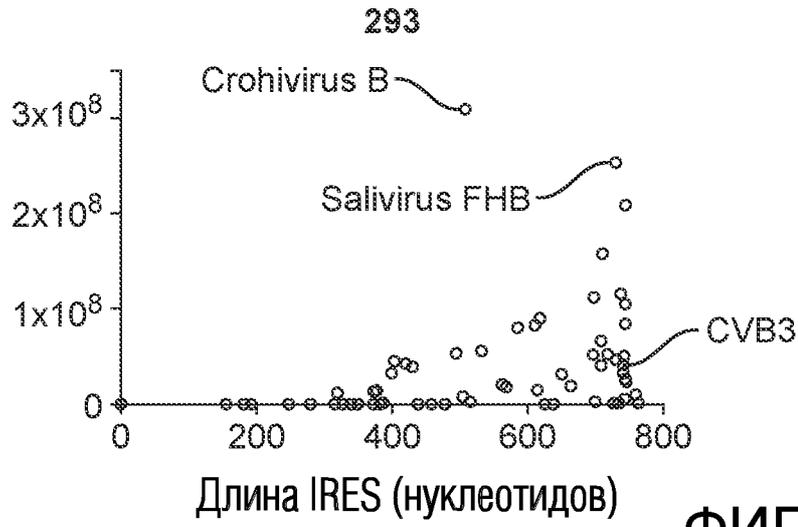


ФИГ. 1D



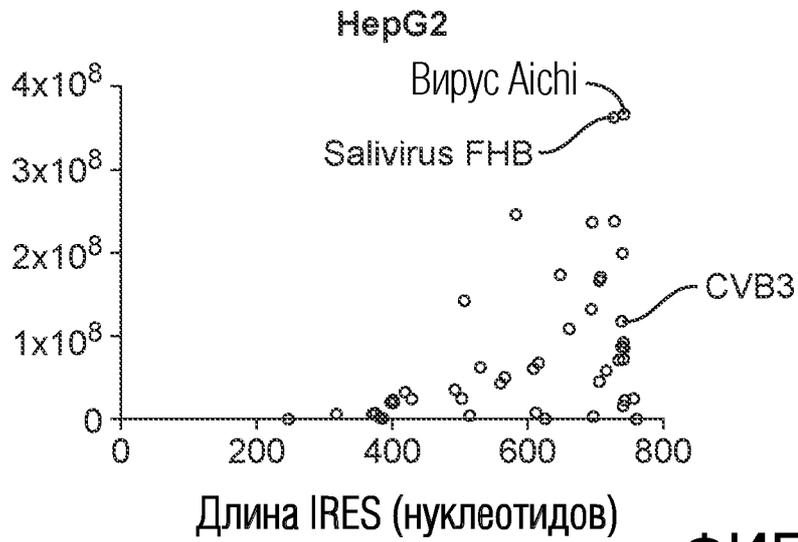
ФИГ. 1E

Люминесценция через 24 часа (RLU)



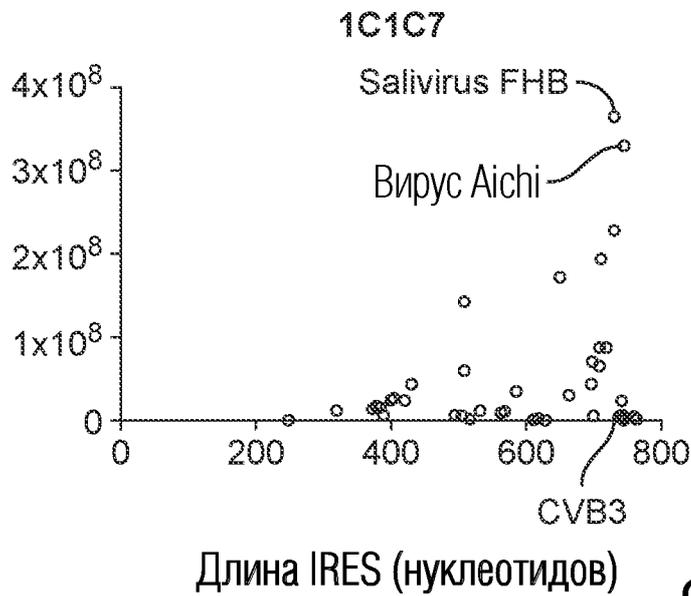
ФИГ. 2А

Люминесценция через 24 часа (RLU)

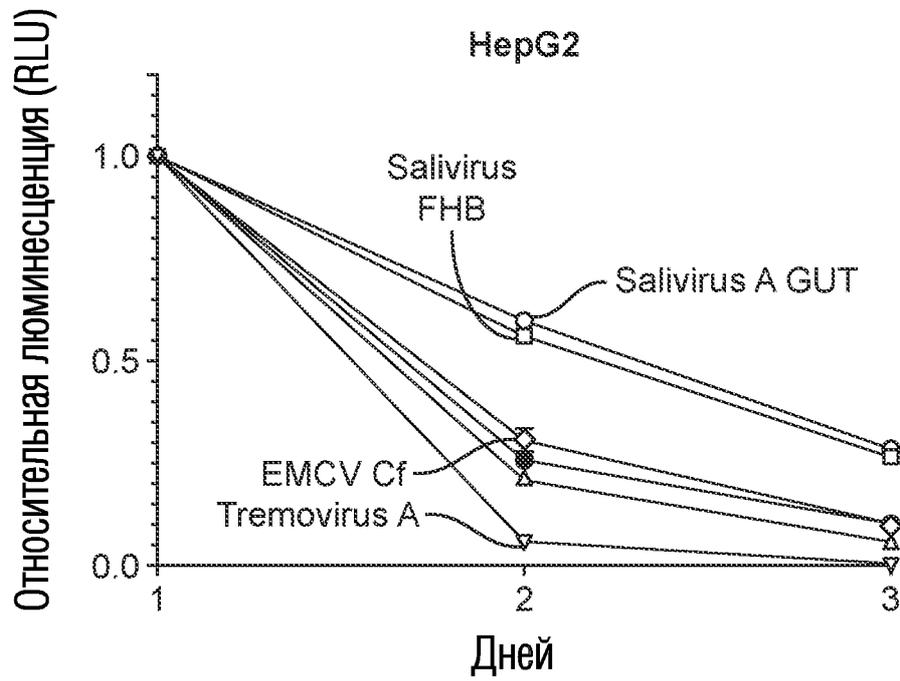


ФИГ. 2В

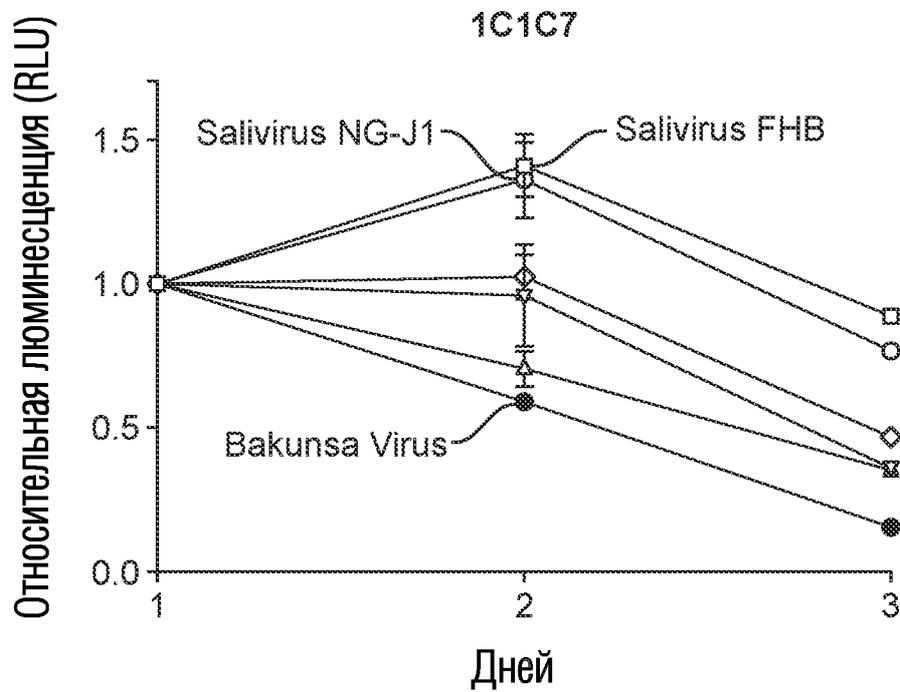
Люминесценция через 24 часа (RLU)



ФИГ. 2С

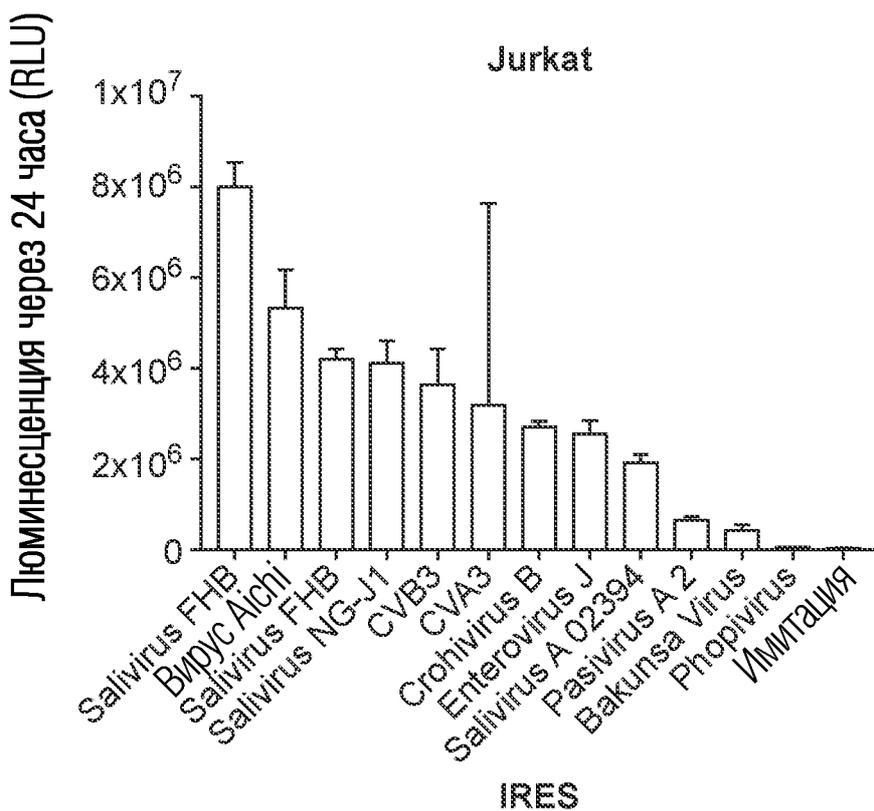


ФИГ. 3А

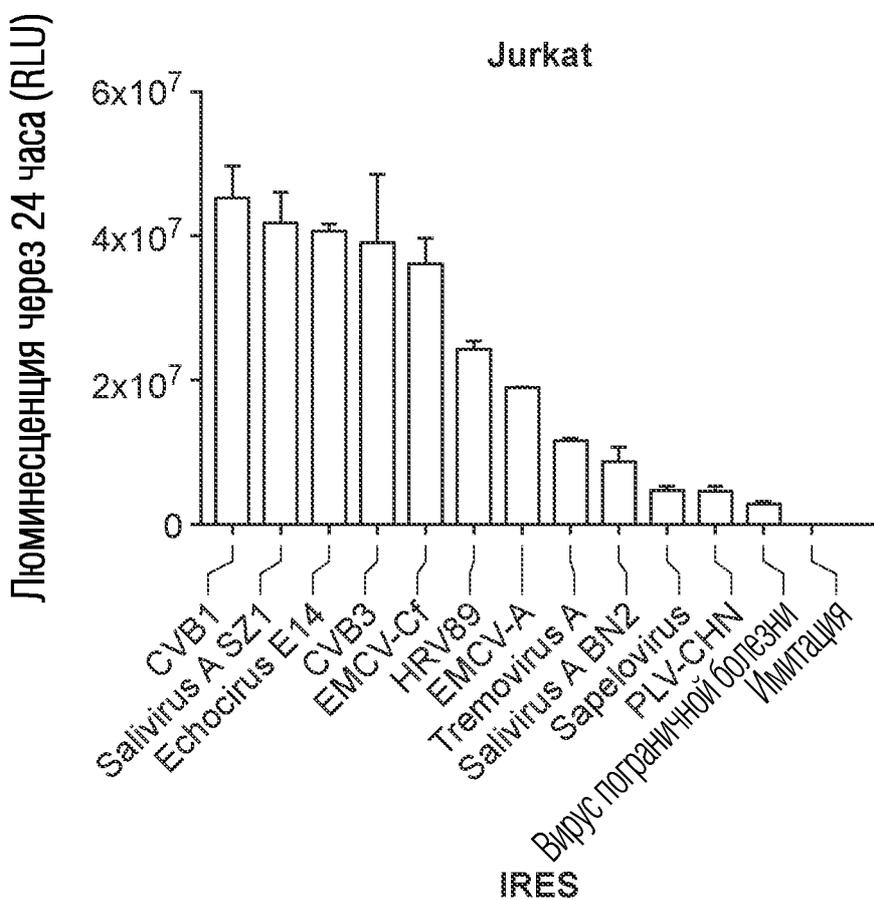


ФИГ. 3В

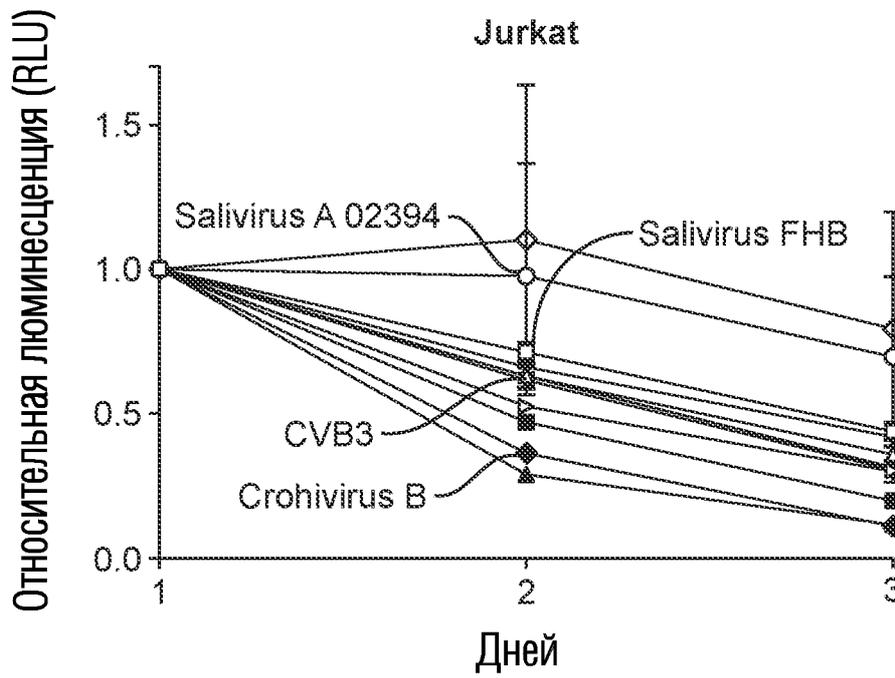
5/88



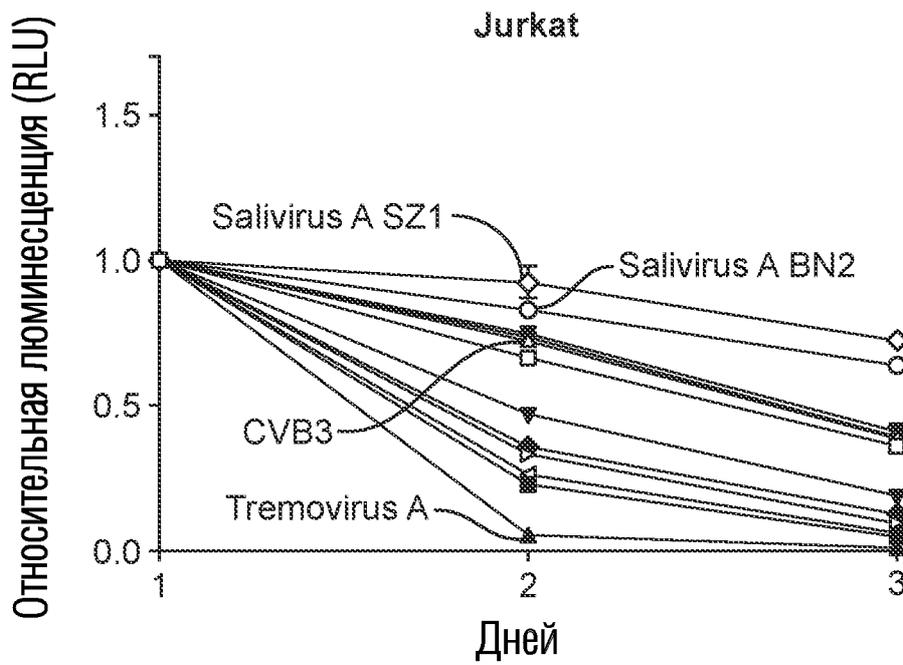
ФИГ. 4А



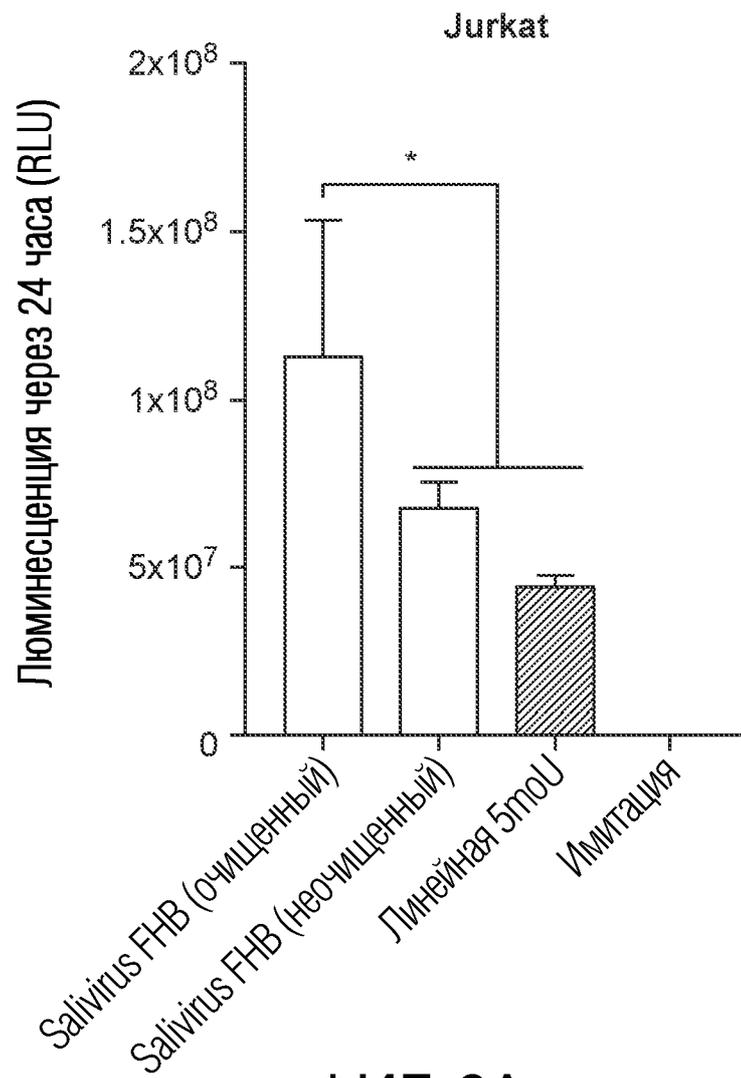
ФИГ. 4В

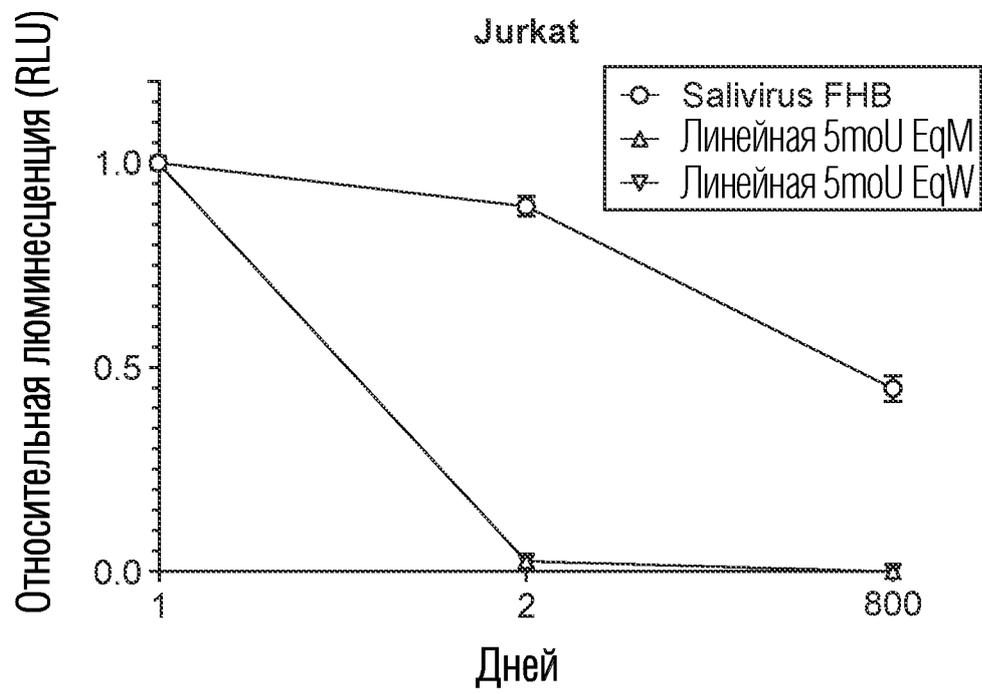


ФИГ. 5А

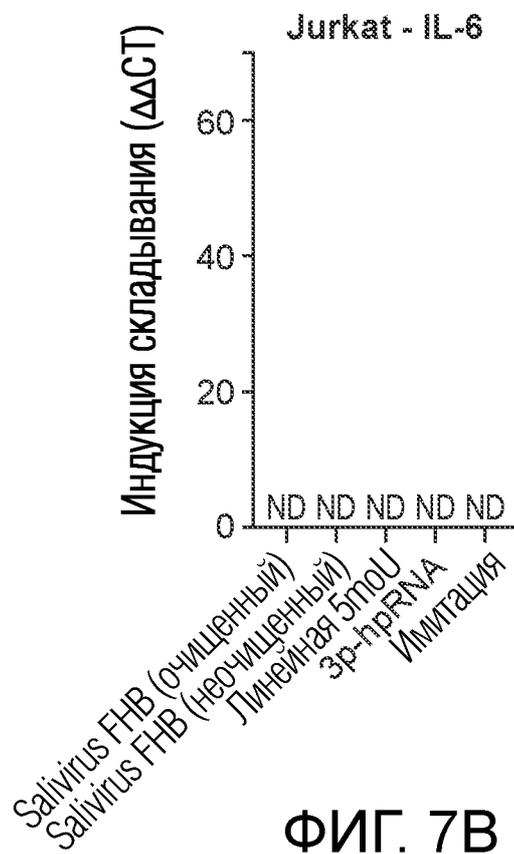
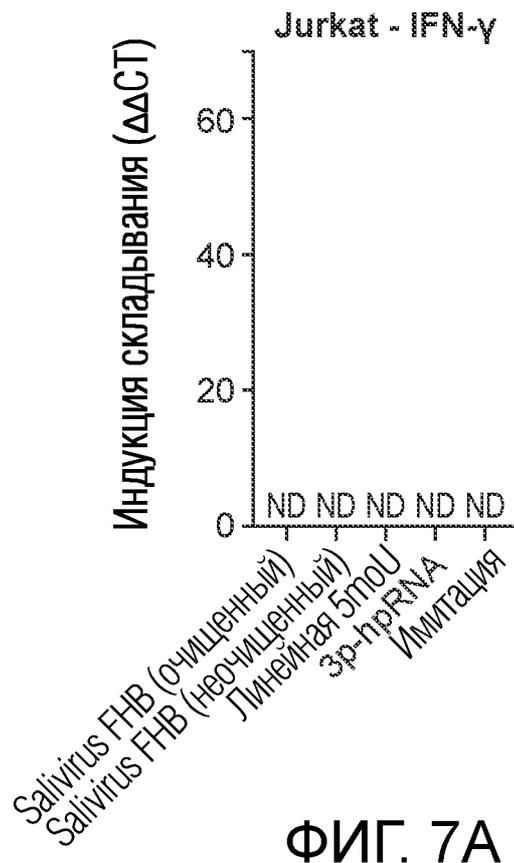


ФИГ. 5В

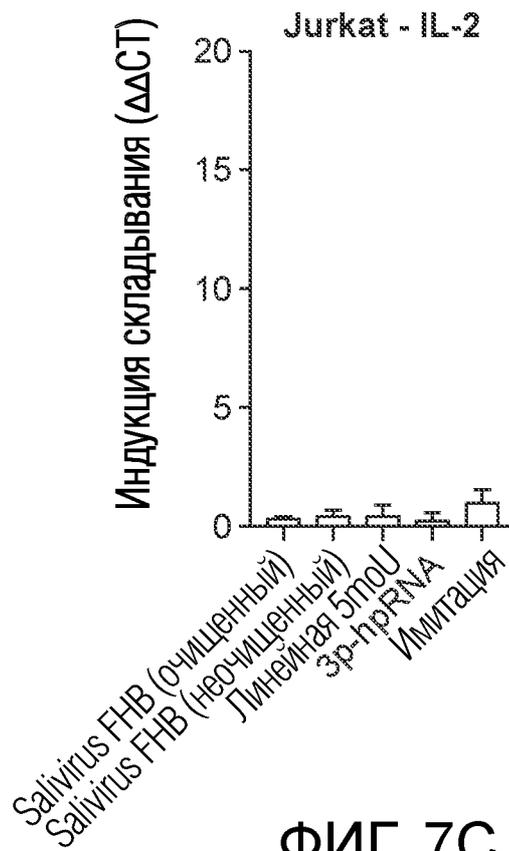




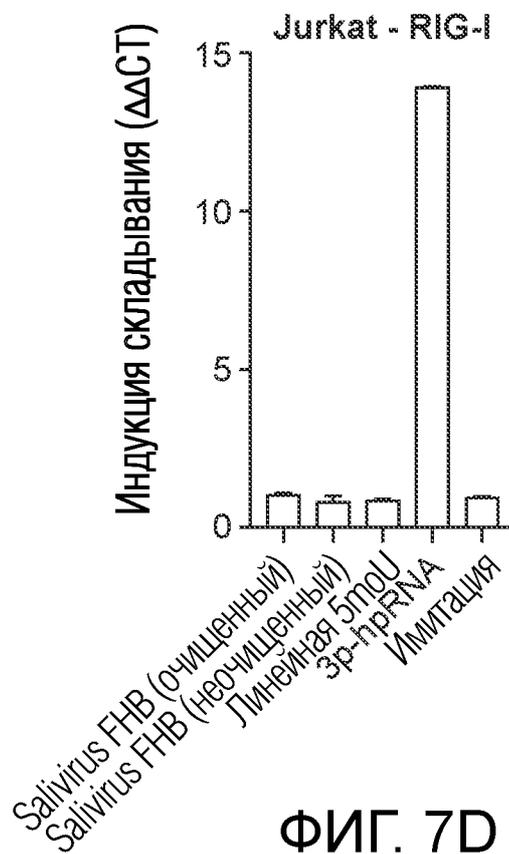
ФИГ. 6В



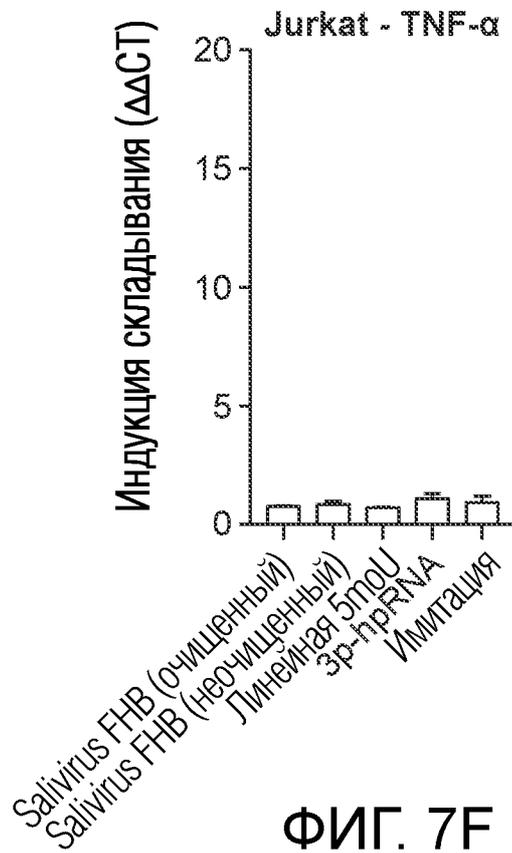
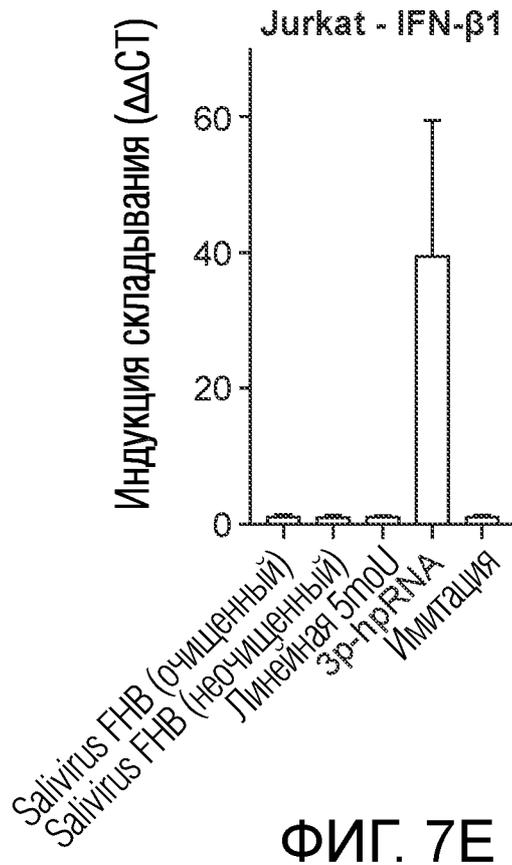
10/88



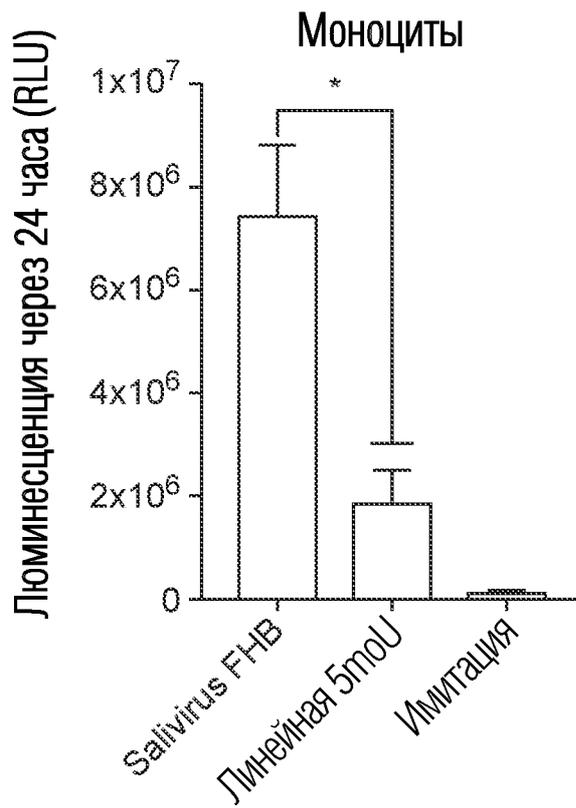
ФИГ. 7С



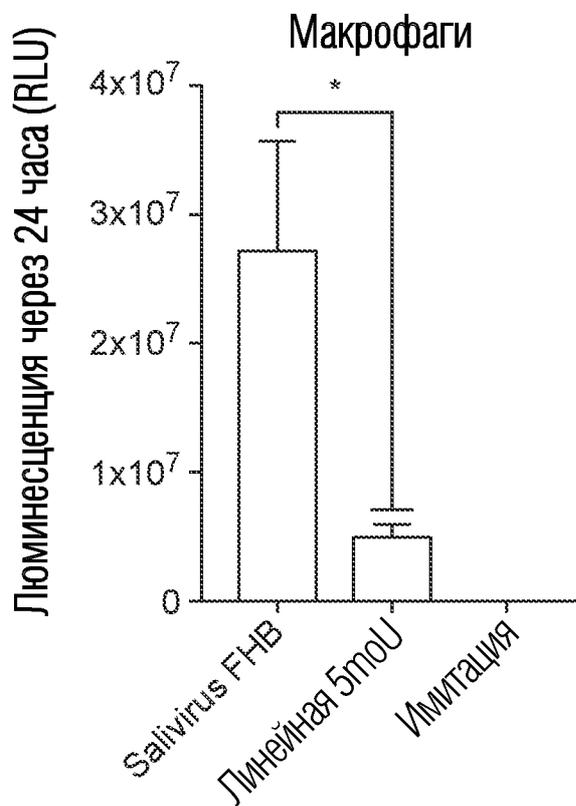
ФИГ. 7D



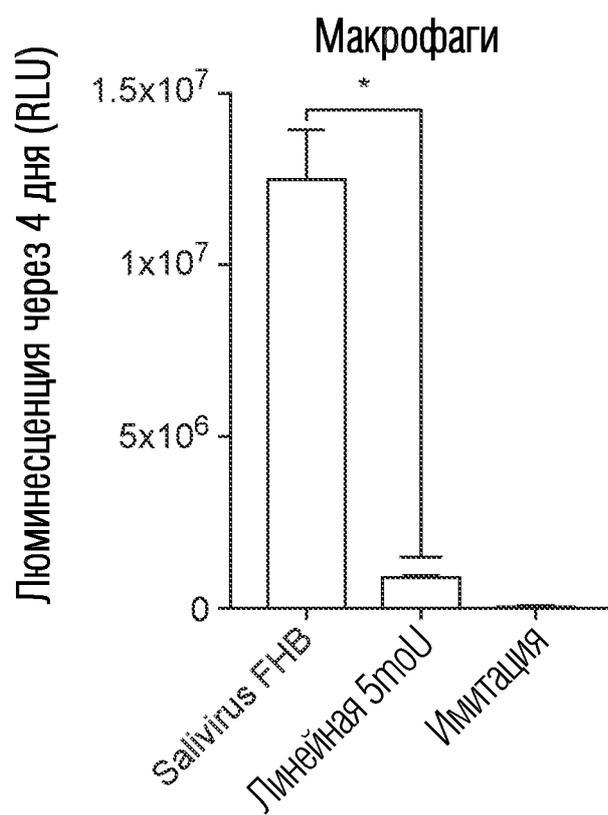
12/88



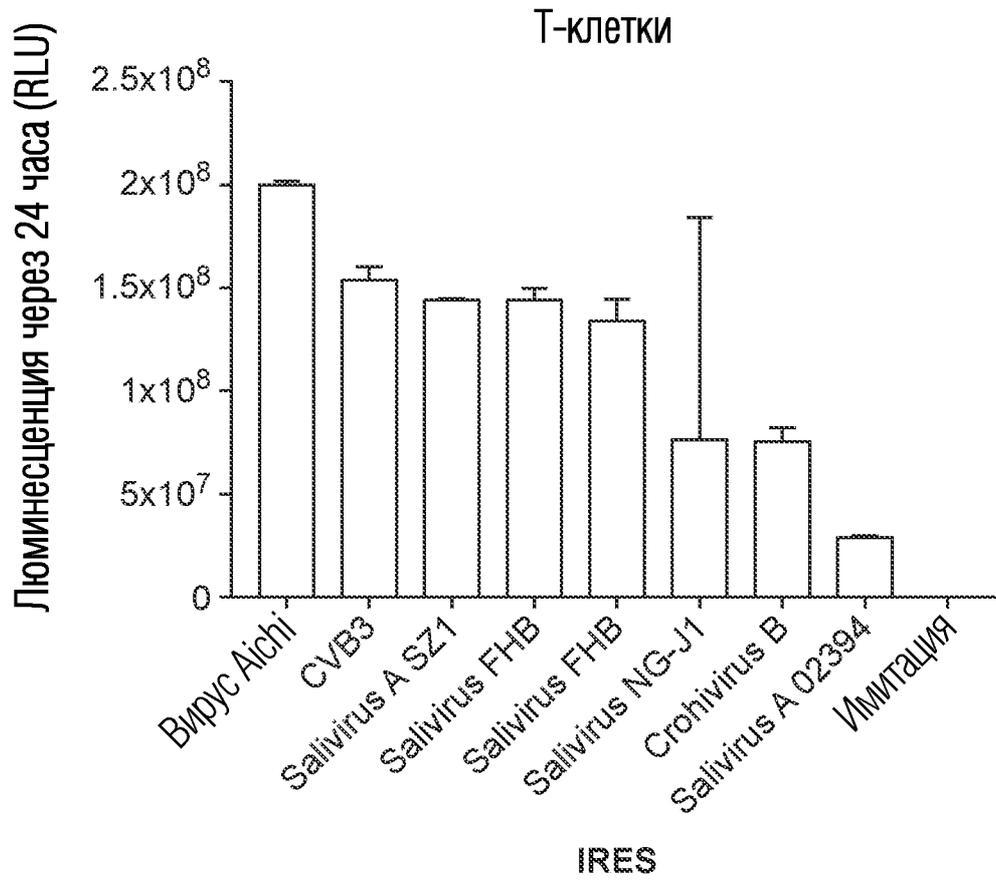
ФИГ. 8А



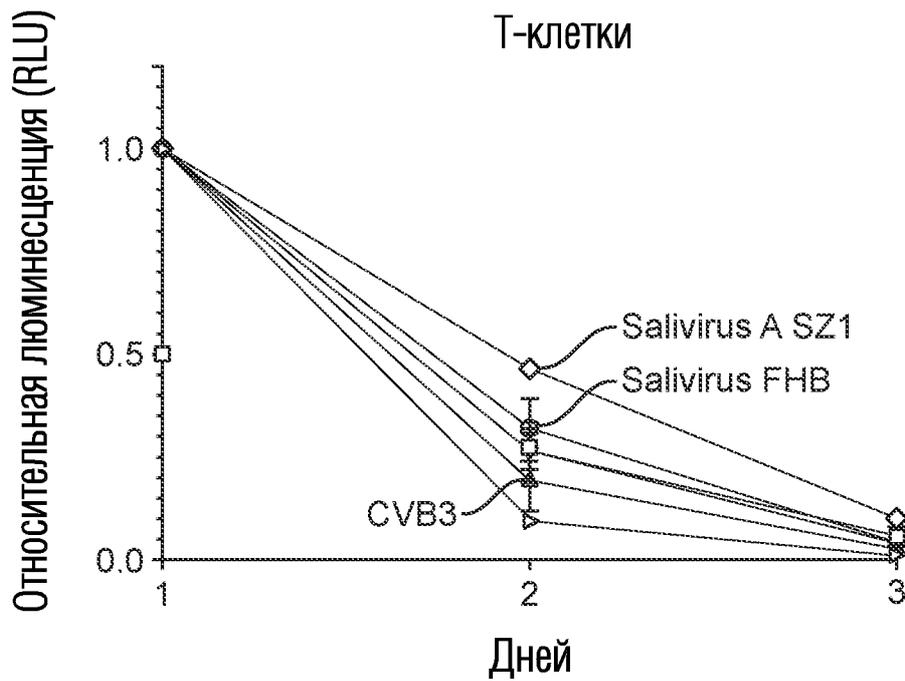
ФИГ. 8В



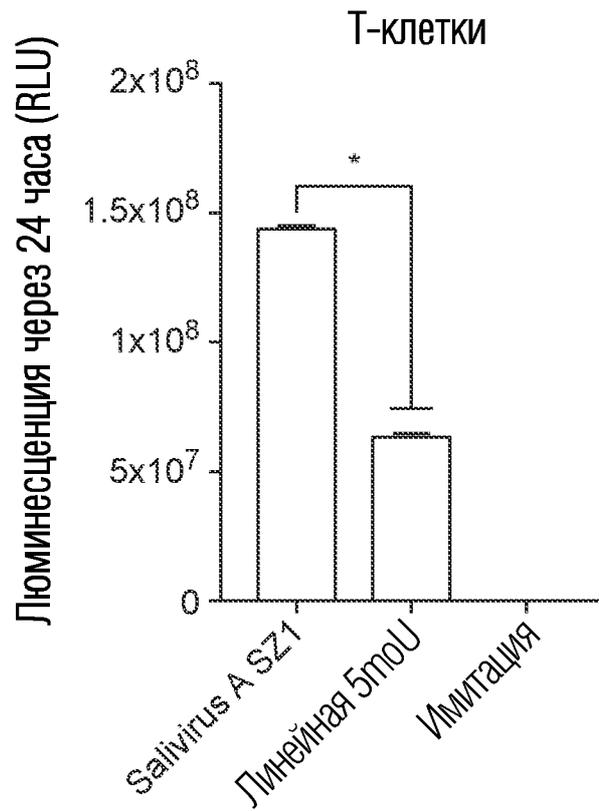
ФИГ. 8С



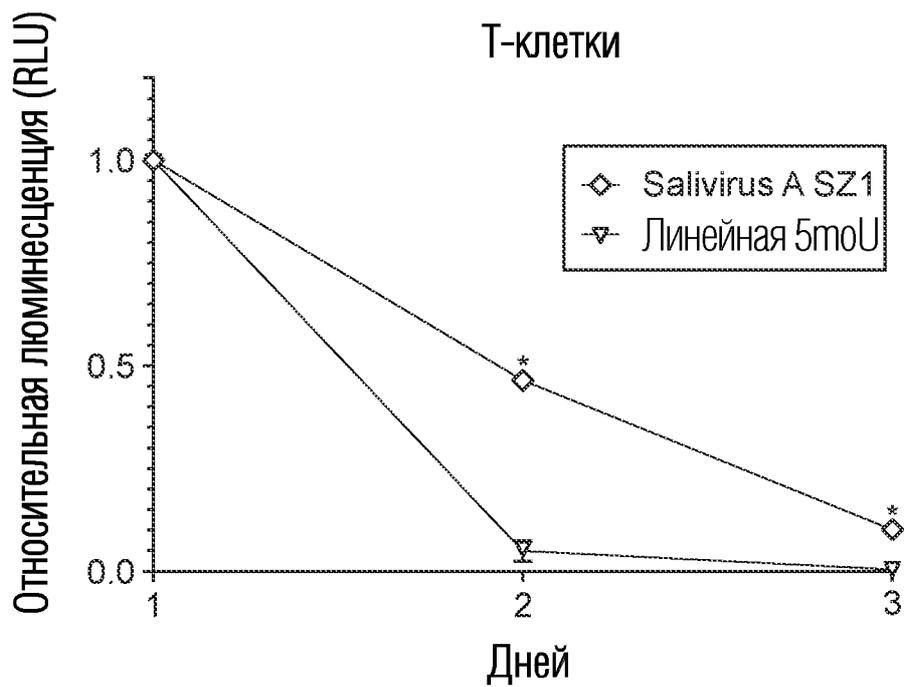
ФИГ. 9А



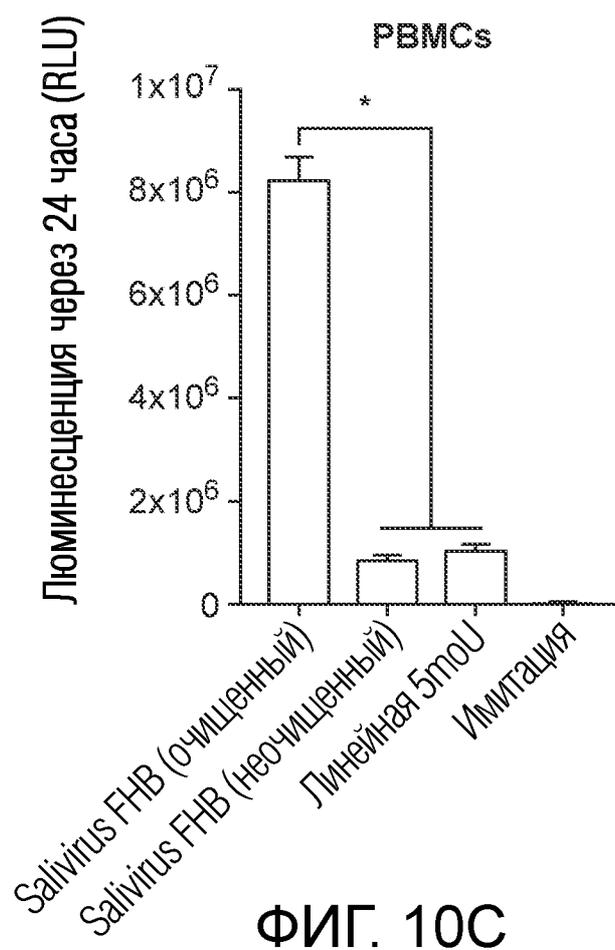
ФИГ. 9В

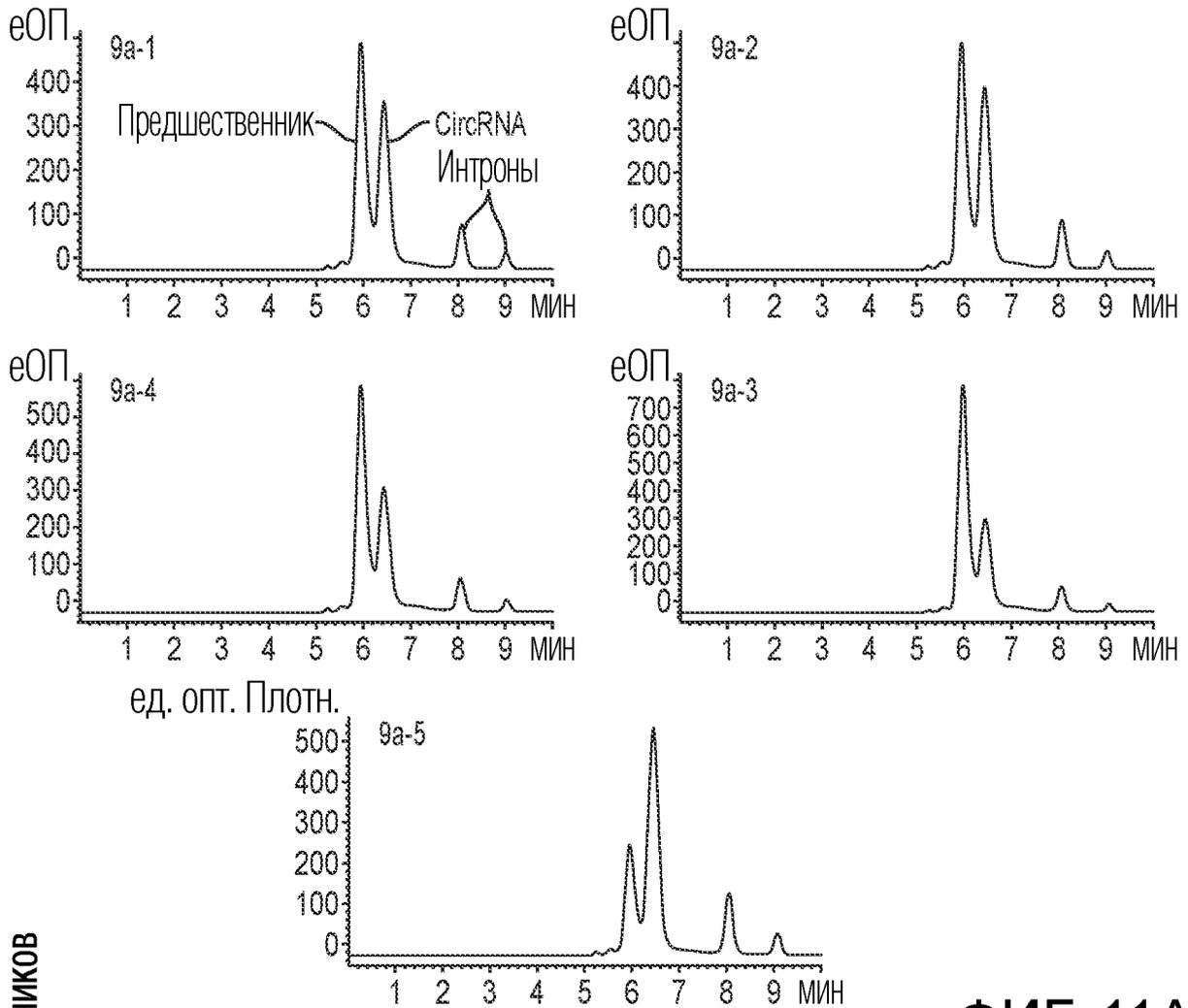


ФИГ. 10А

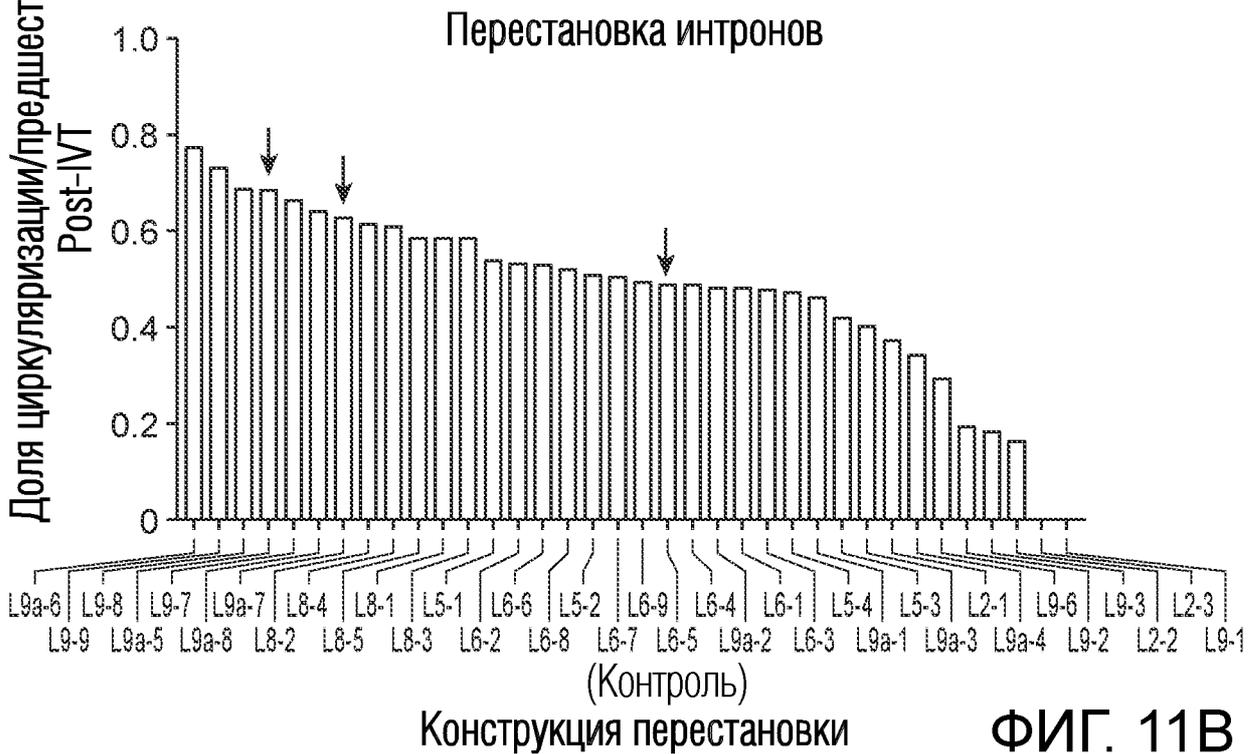


ФИГ. 10В

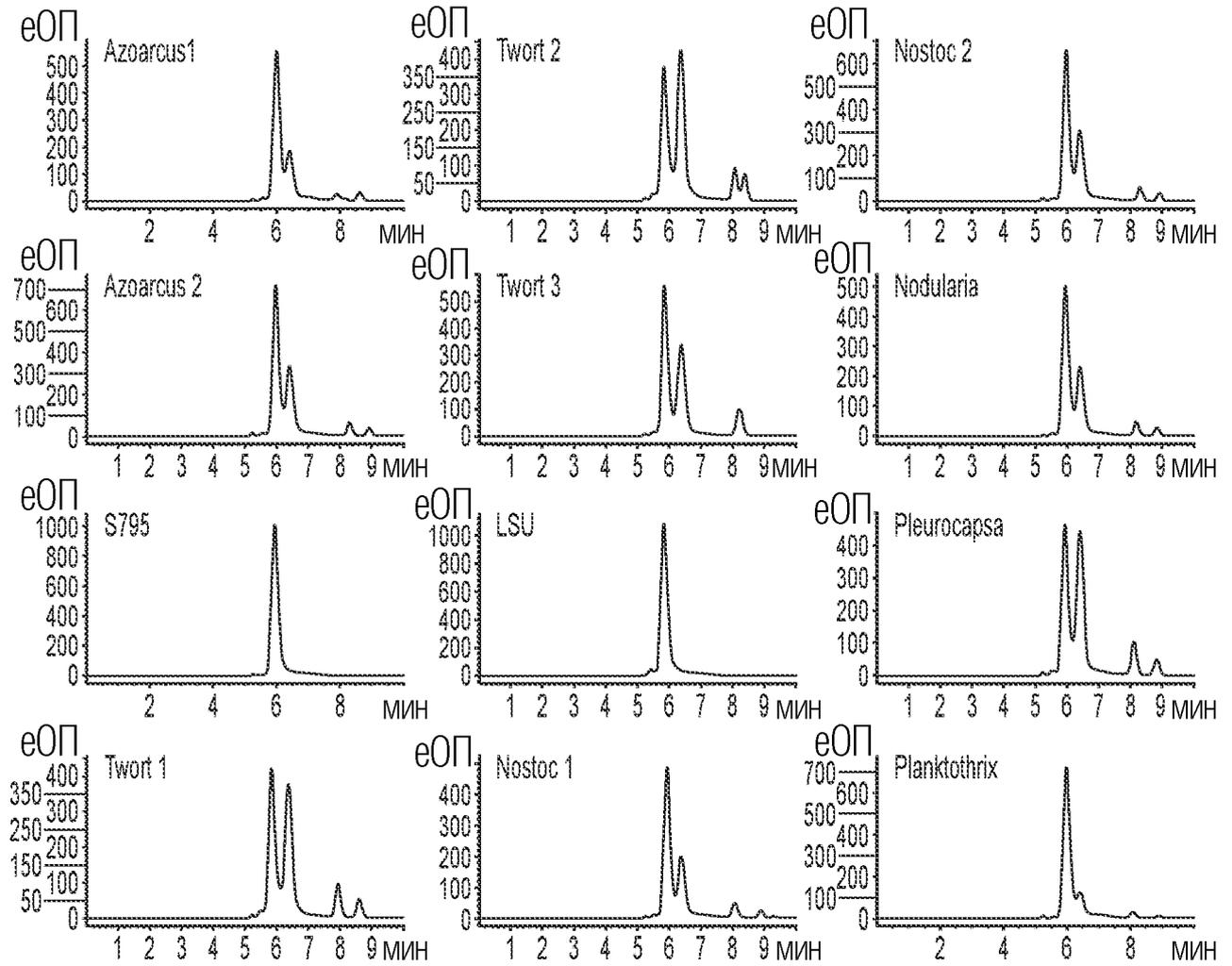




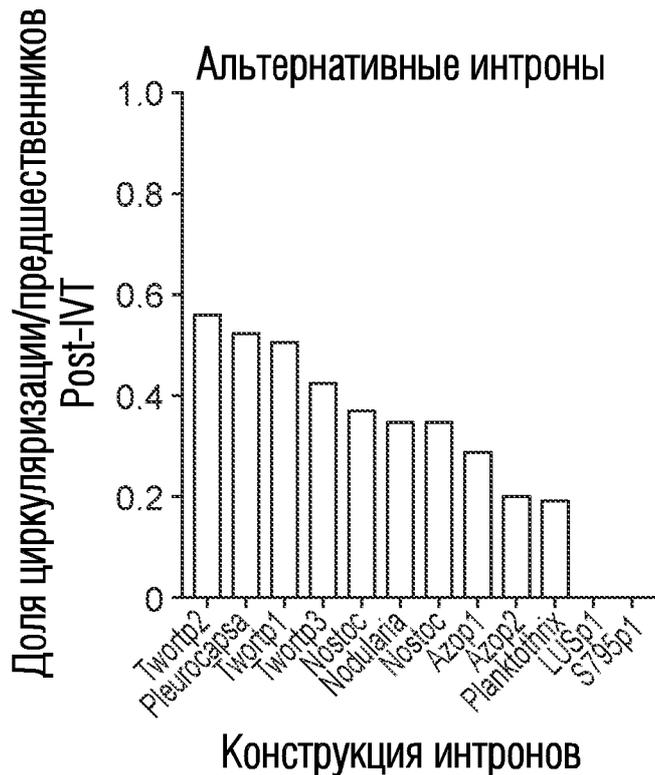
ФИГ. 11А



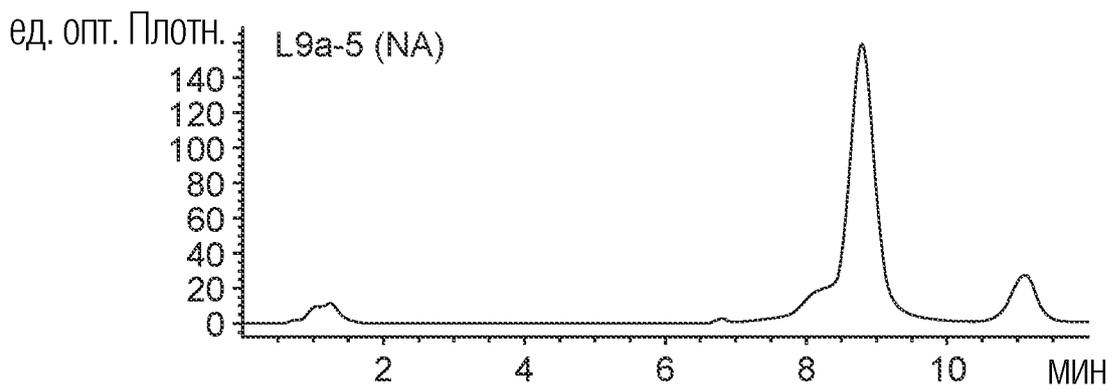
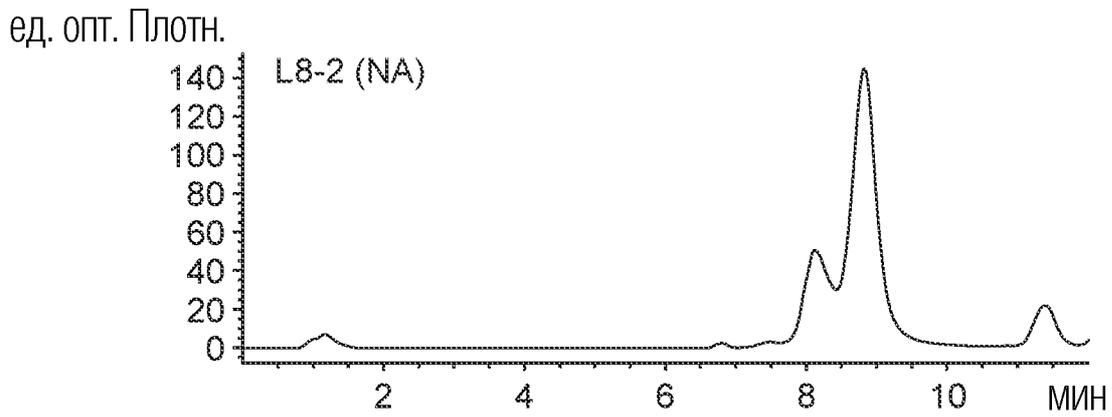
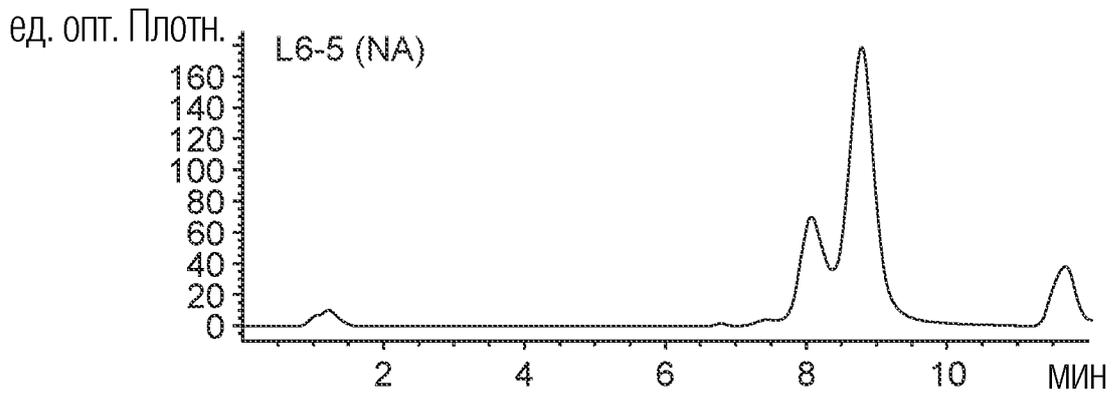
18/88



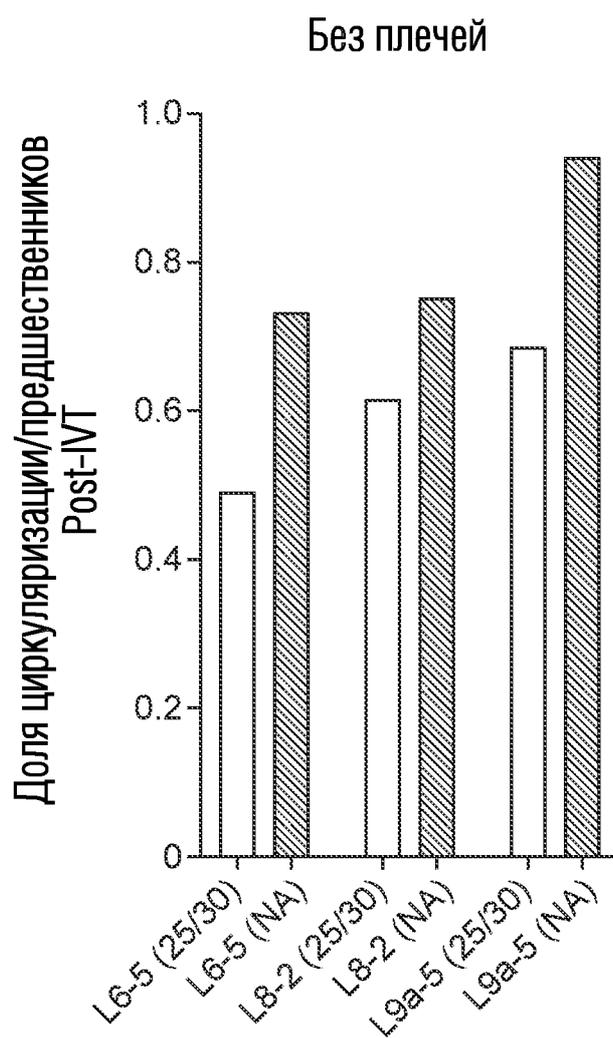
ФИГ. 12А



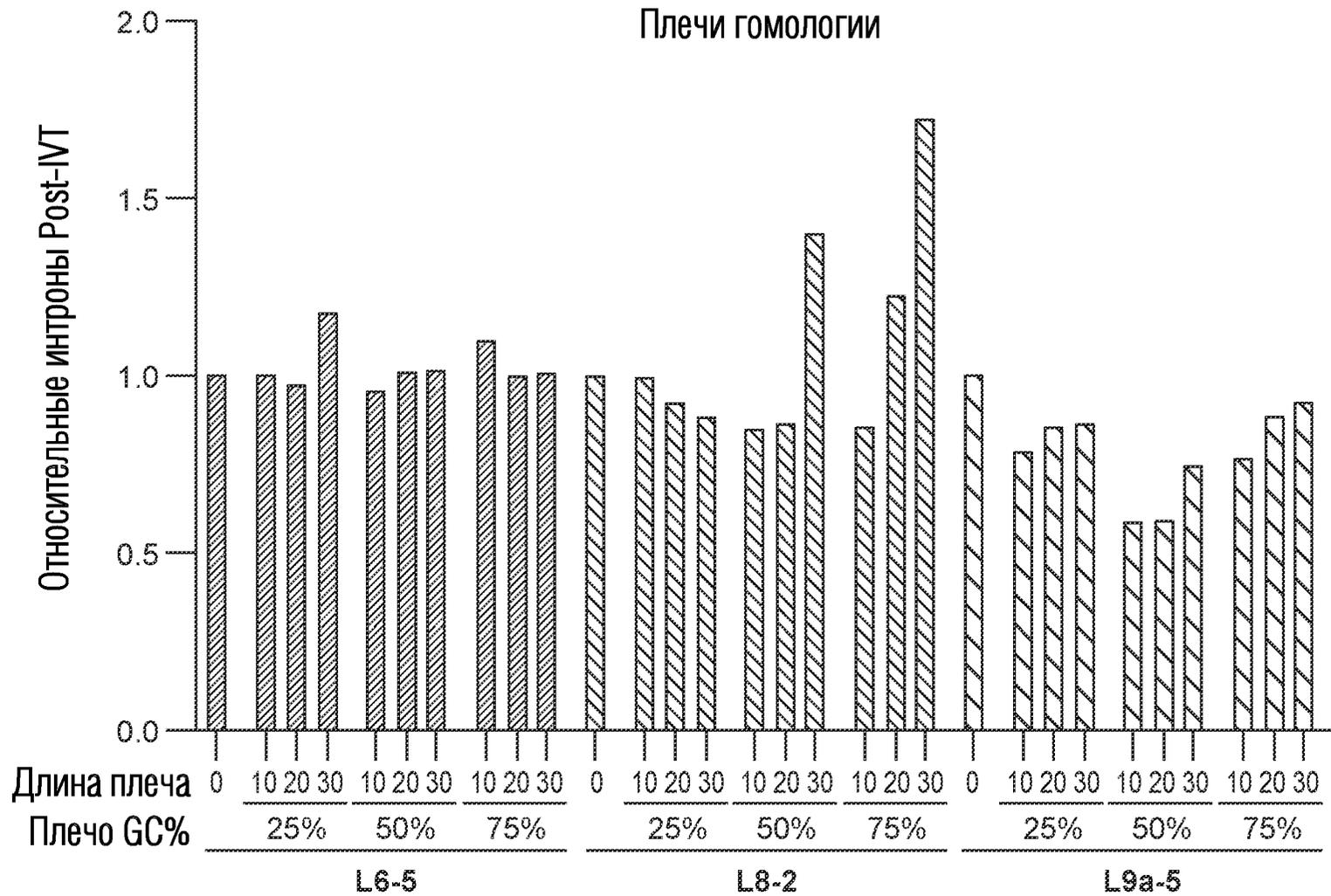
ФИГ. 12В



ФИГ. 13А

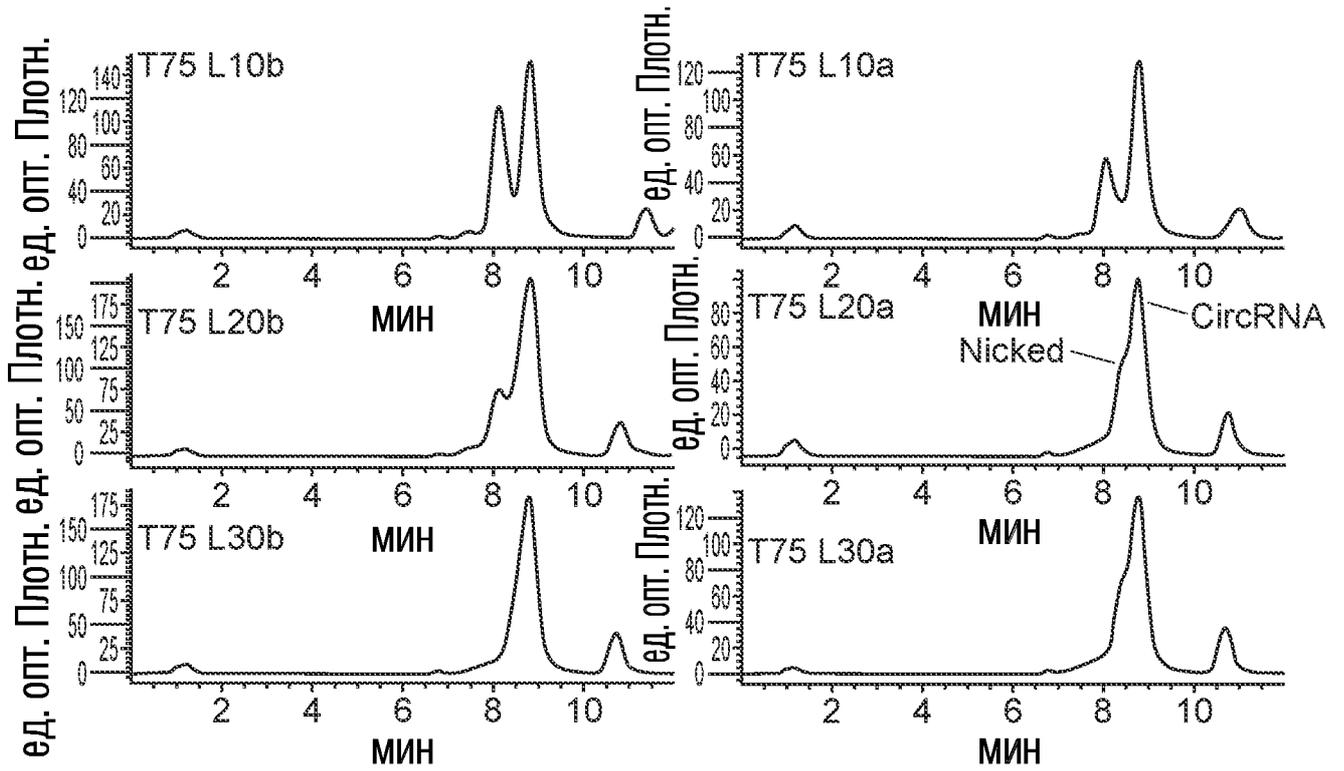


ФИГ. 13В

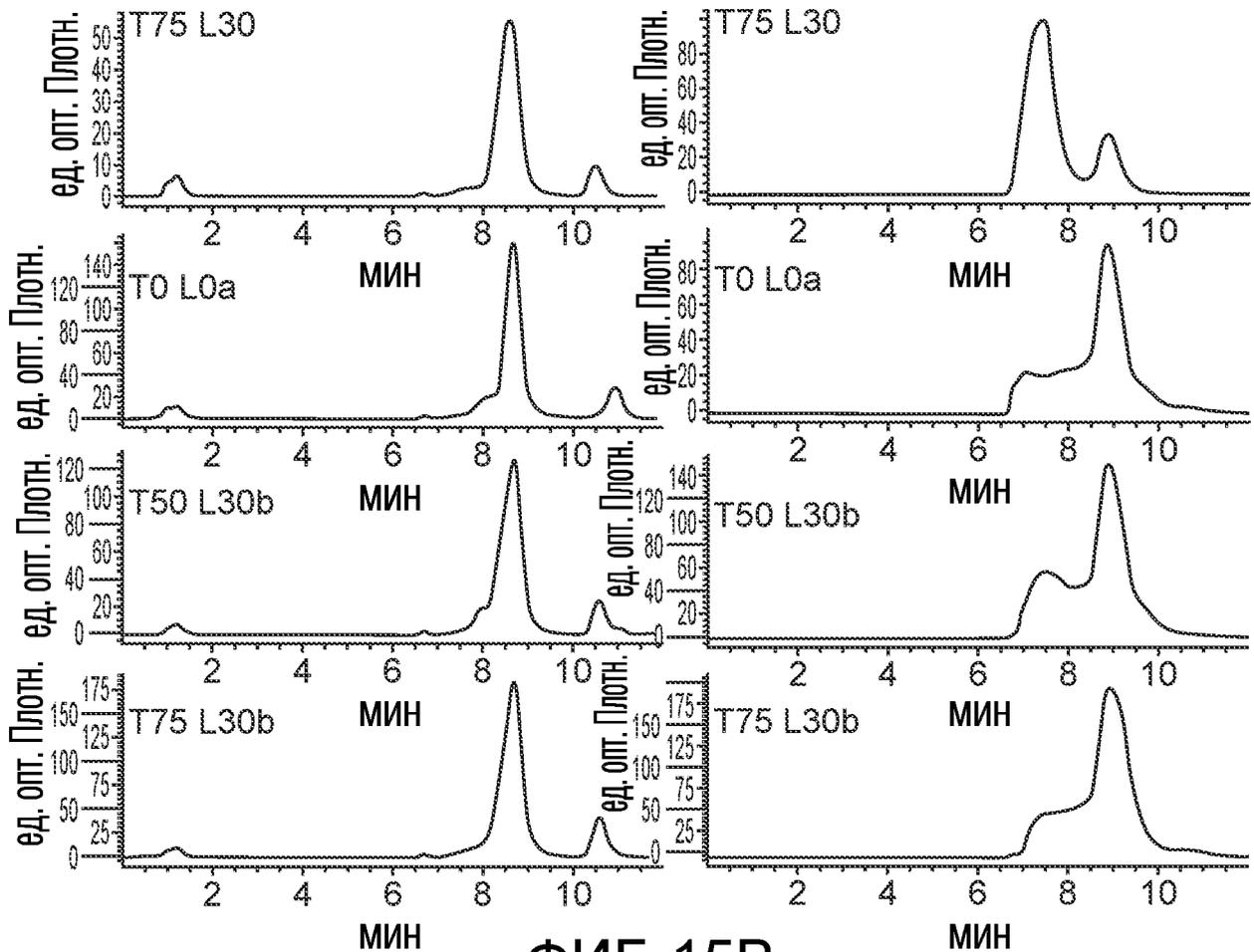


Перестановка

ФИГ. 14



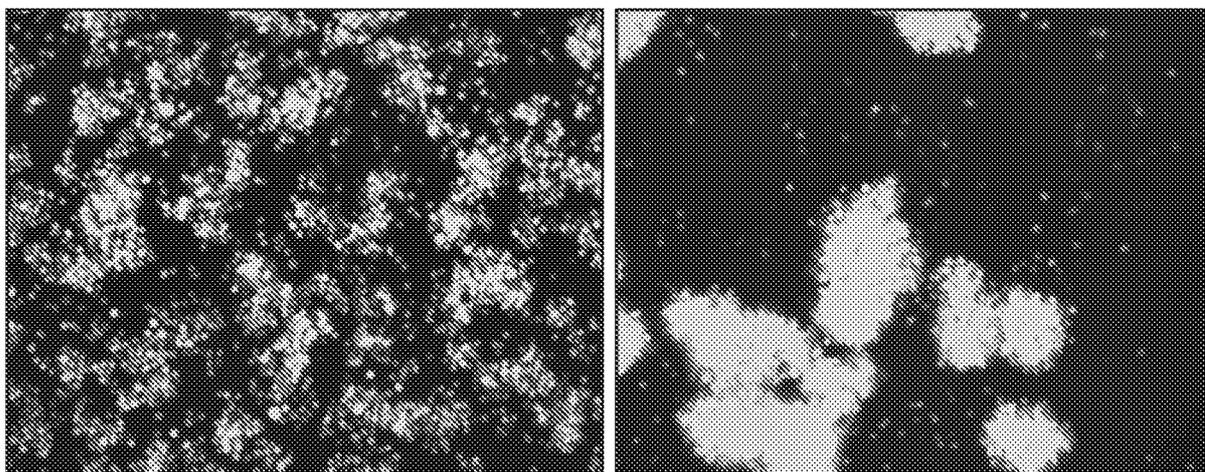
ФИГ. 15А



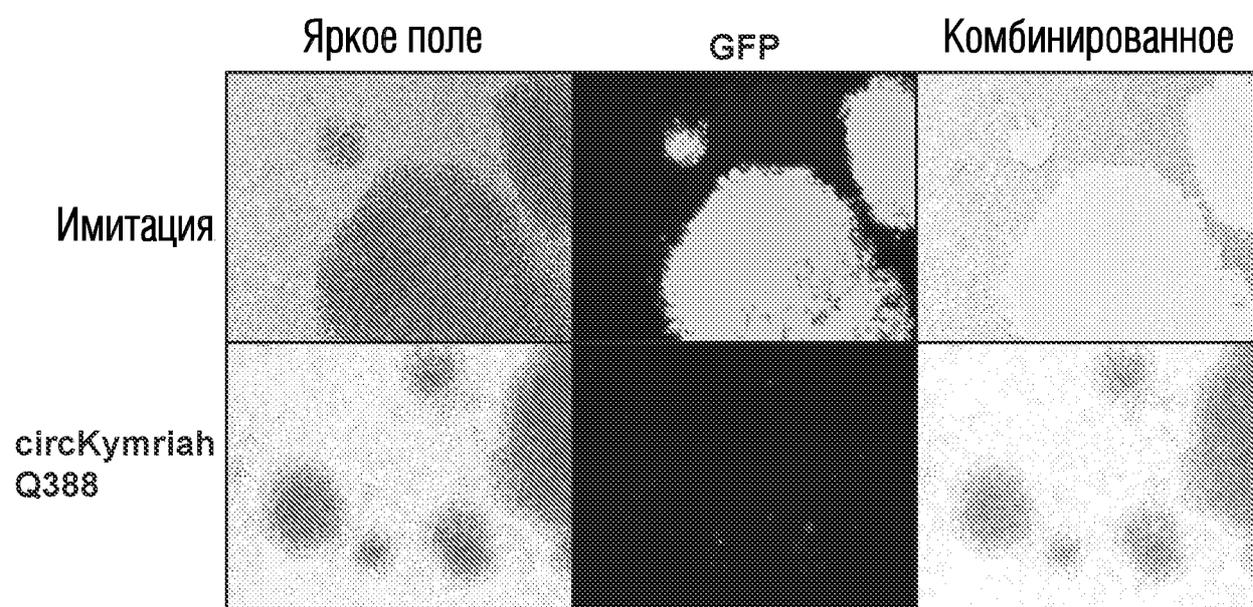
ФИГ. 15В

ИМИТАЦИЯ

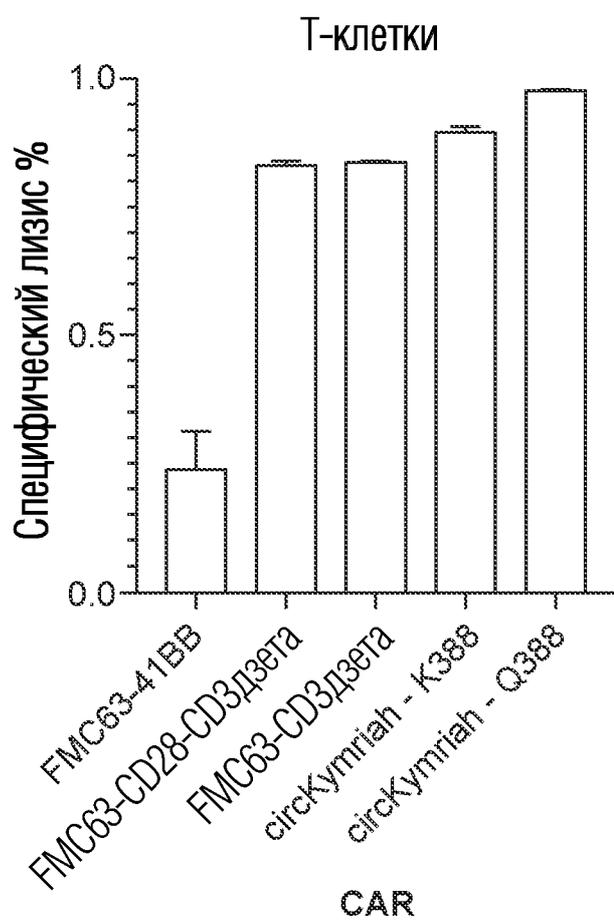
circKymriah - Q388



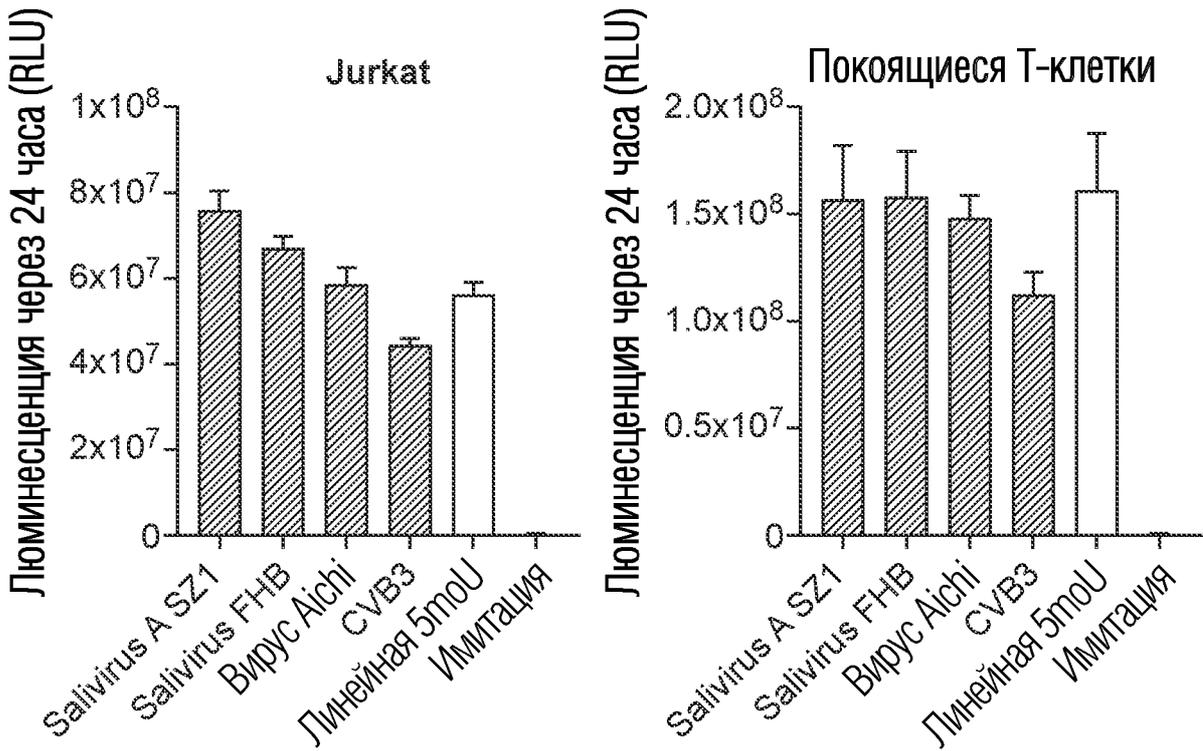
ФИГ. 16



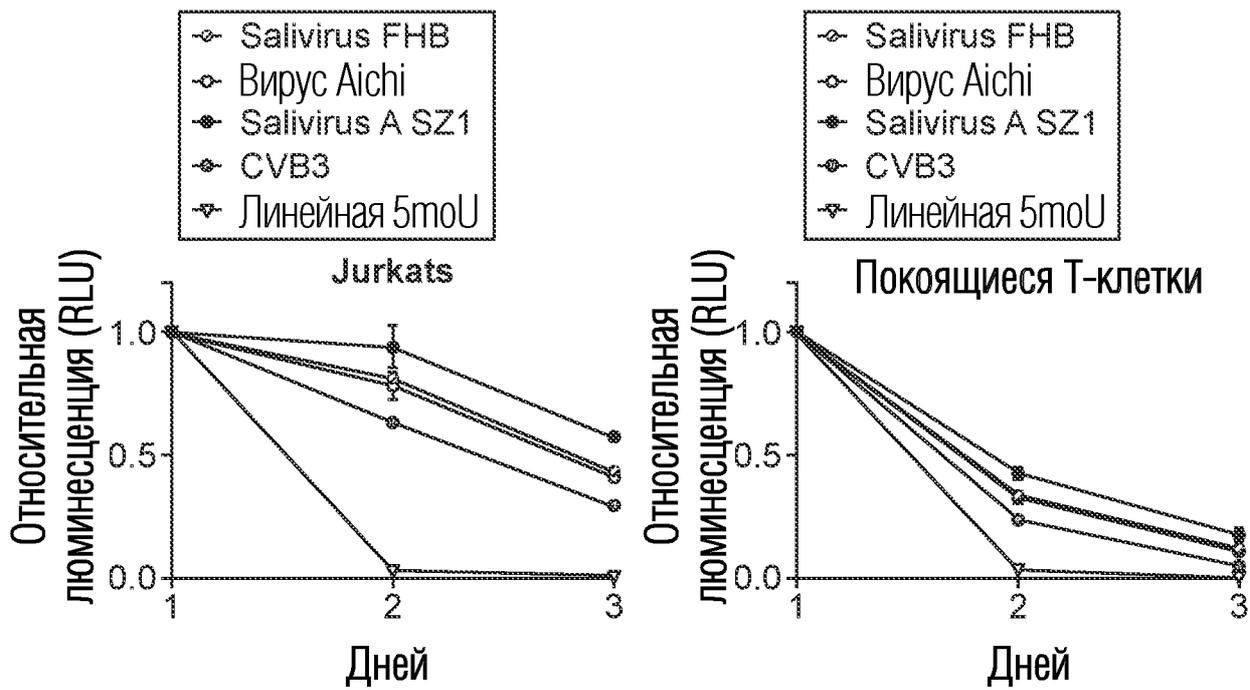
ФИГ. 17



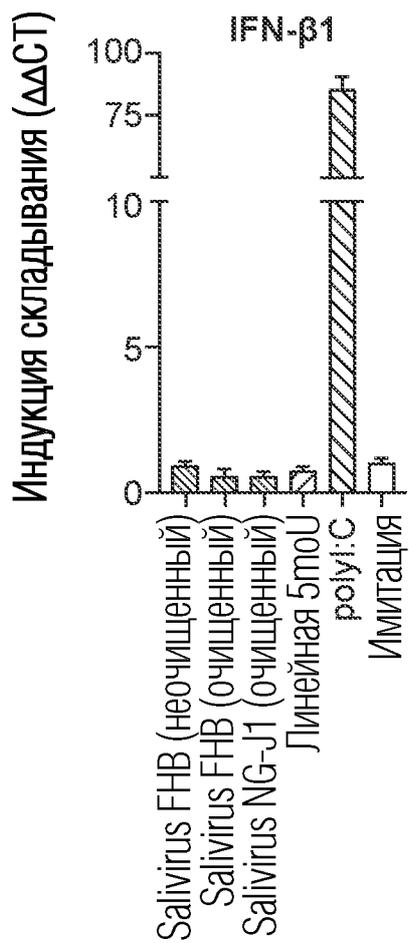
ФИГ. 18



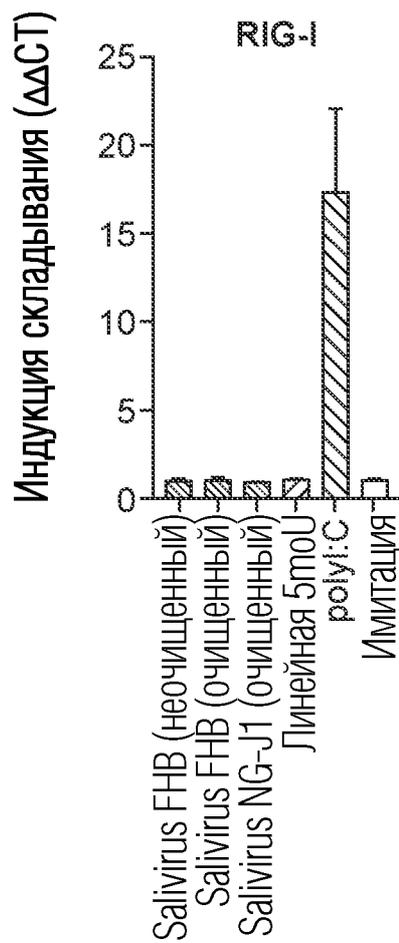
ФИГ. 19А



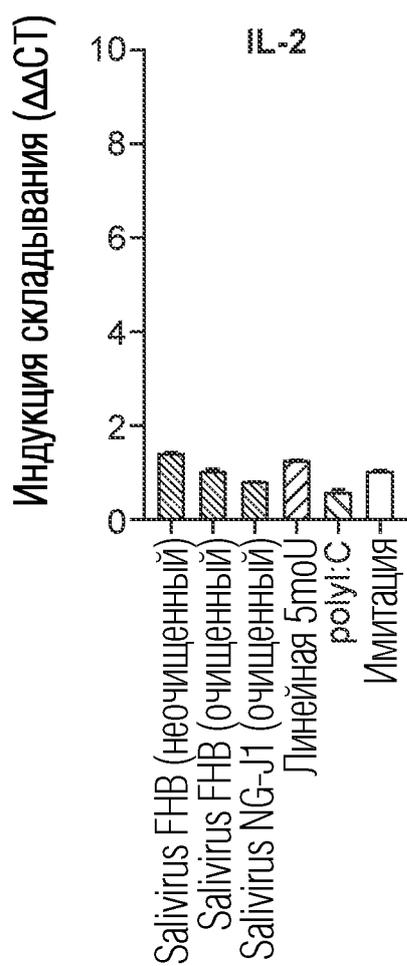
ФИГ. 19В



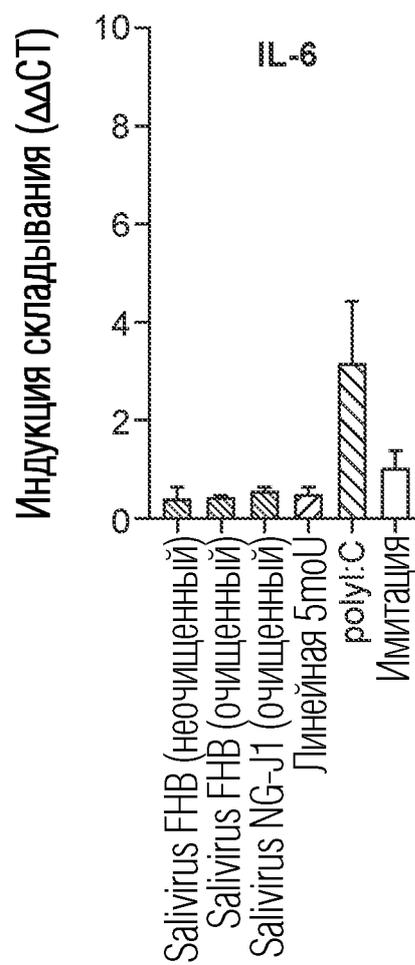
ФИГ. 20А



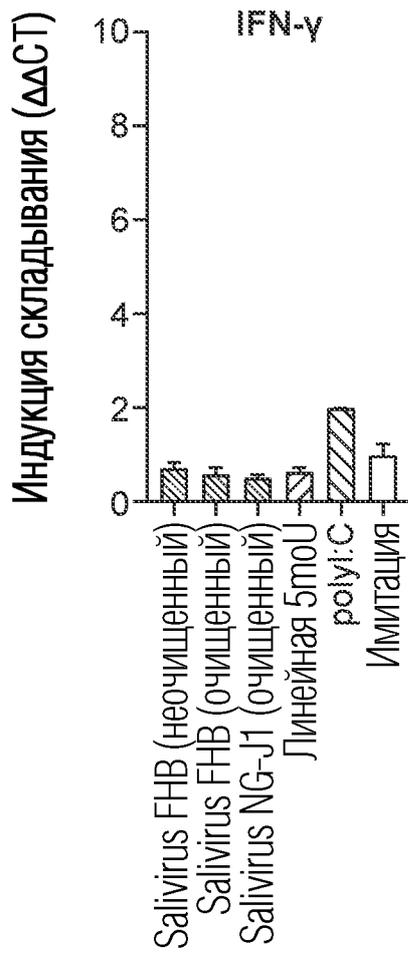
ФИГ. 20В



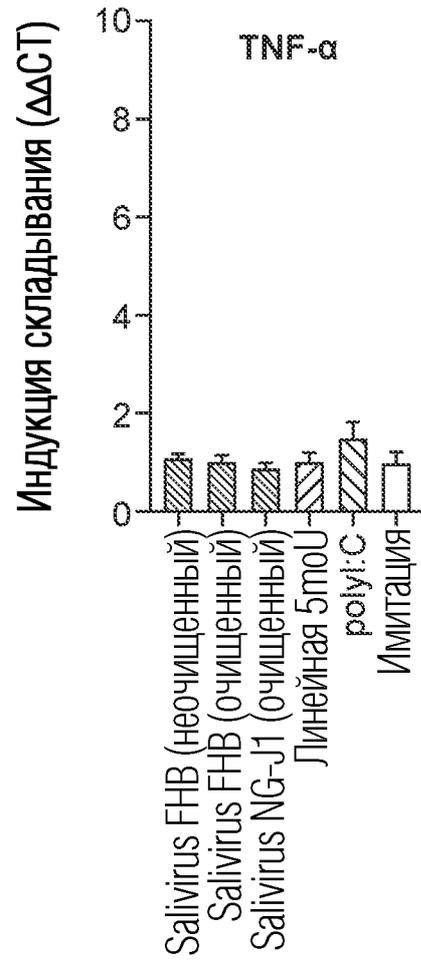
ФИГ. 20С



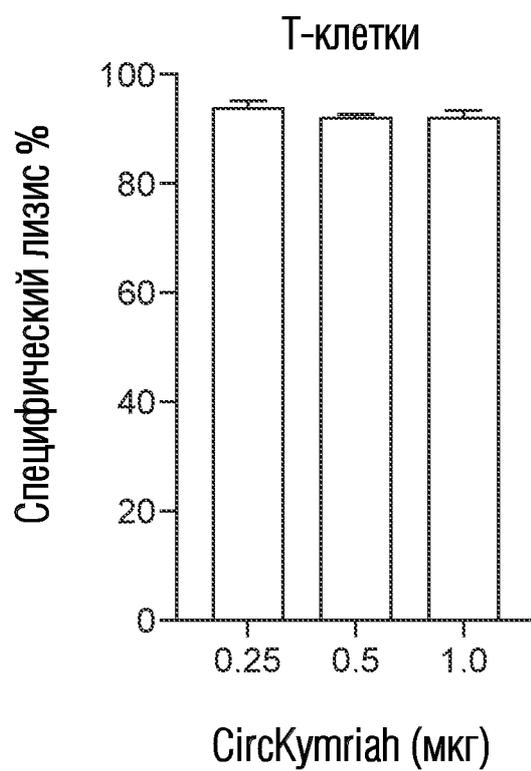
ФИГ. 20D



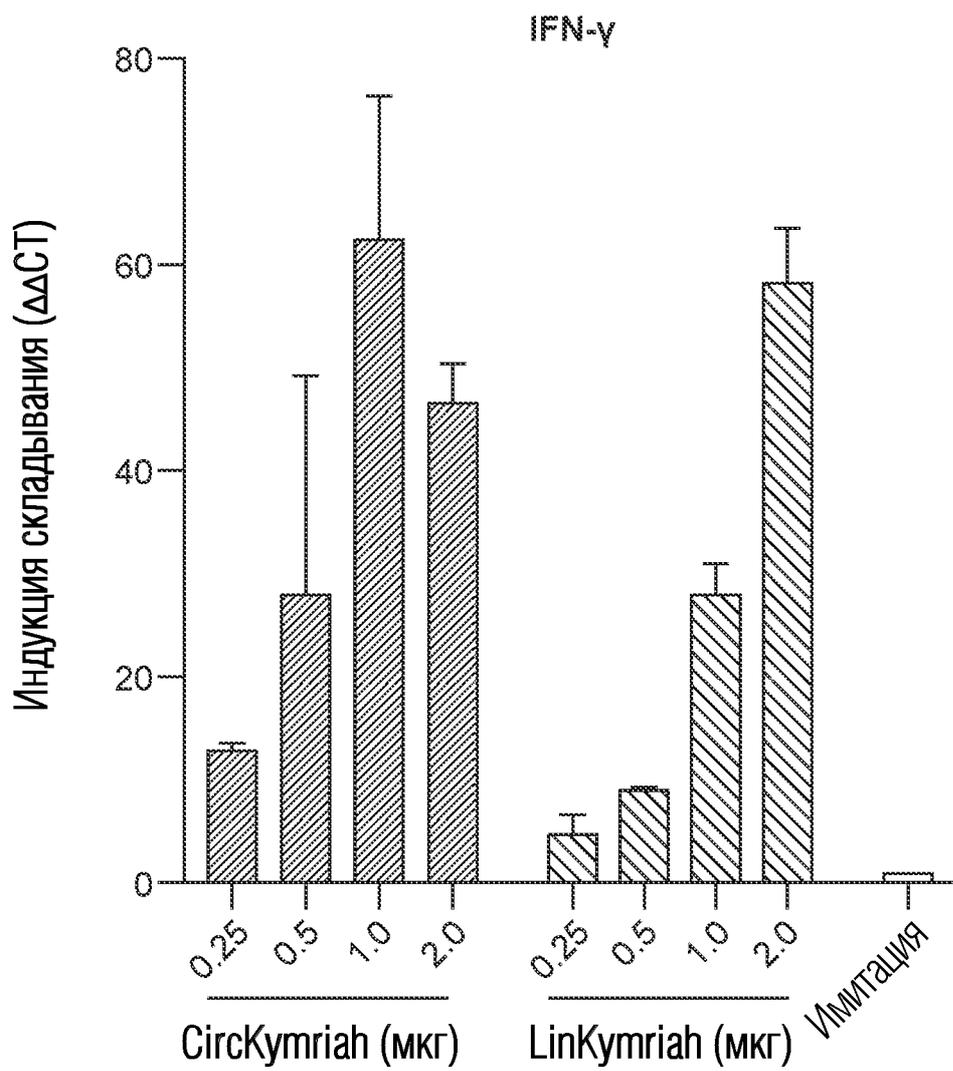
ФИГ. 20Е



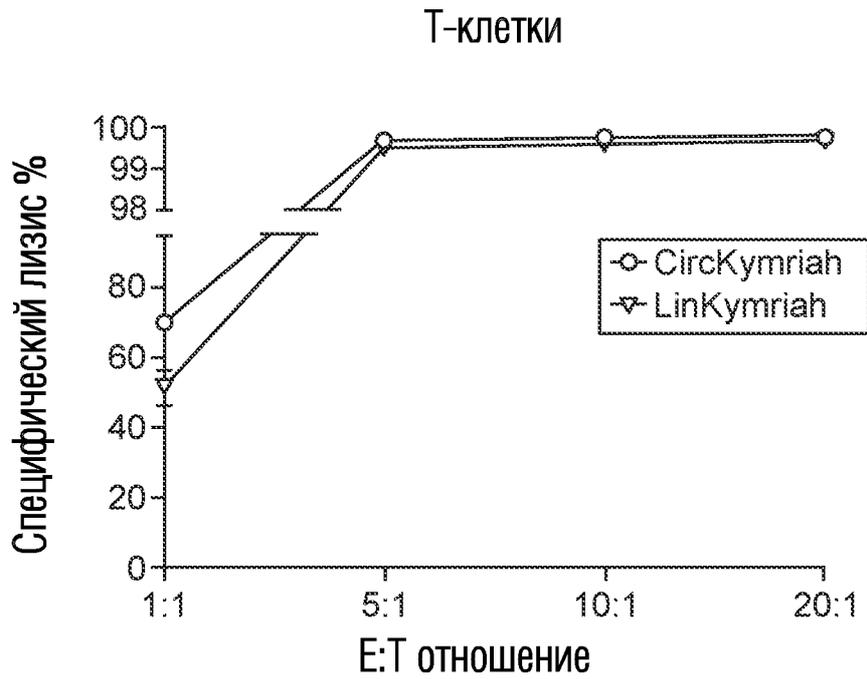
ФИГ. 20F



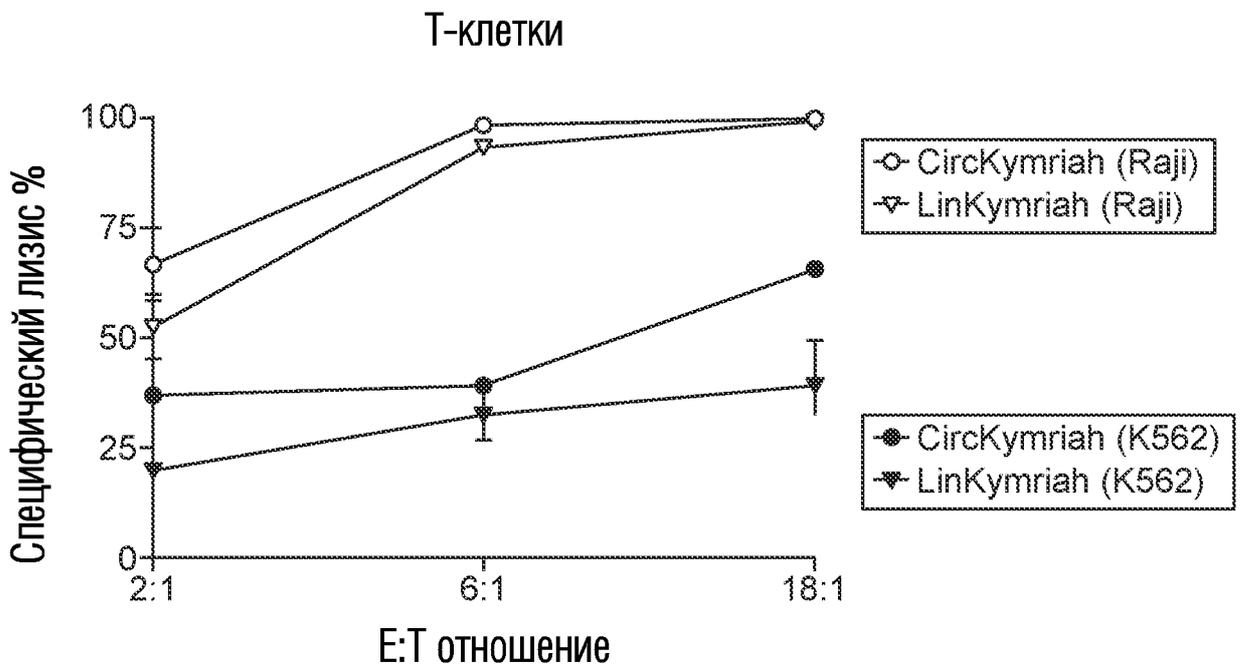
ФИГ. 21А



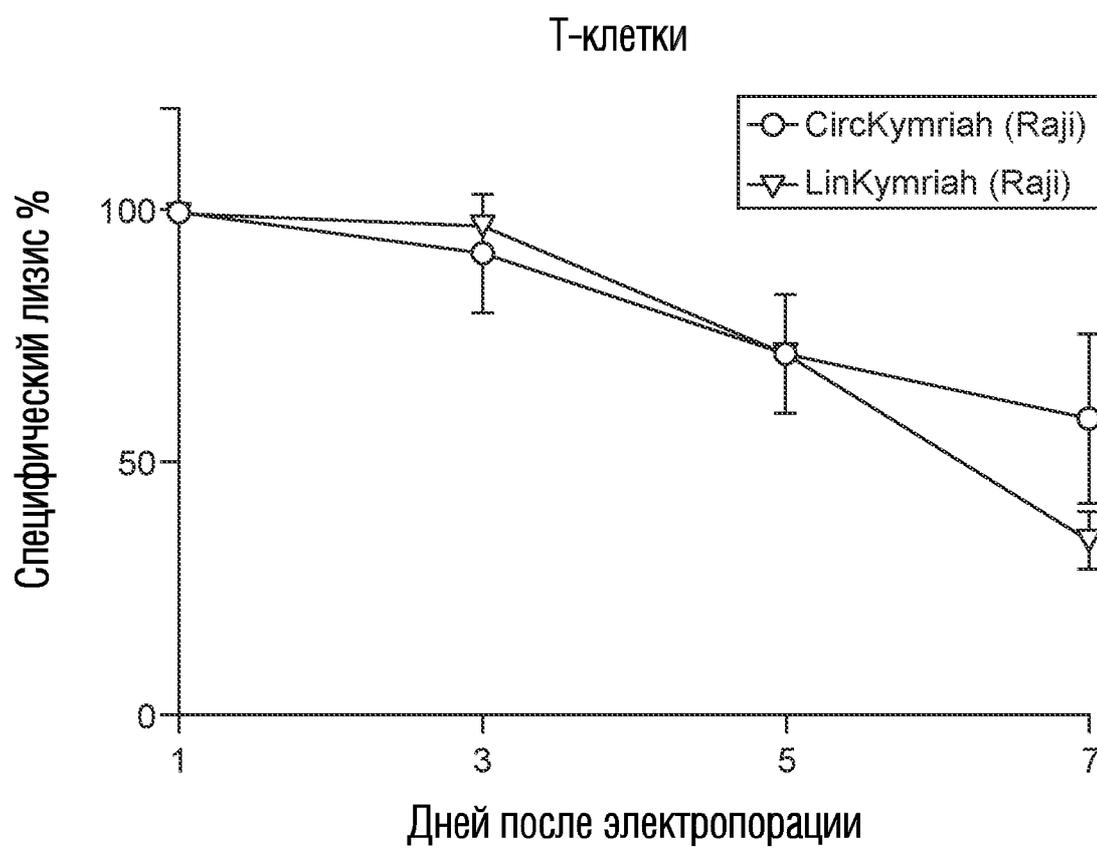
ФИГ. 21В



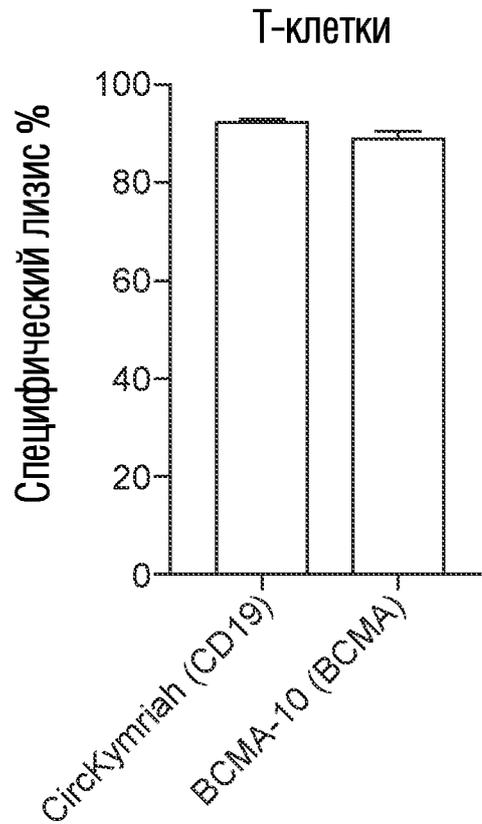
ФИГ. 22А



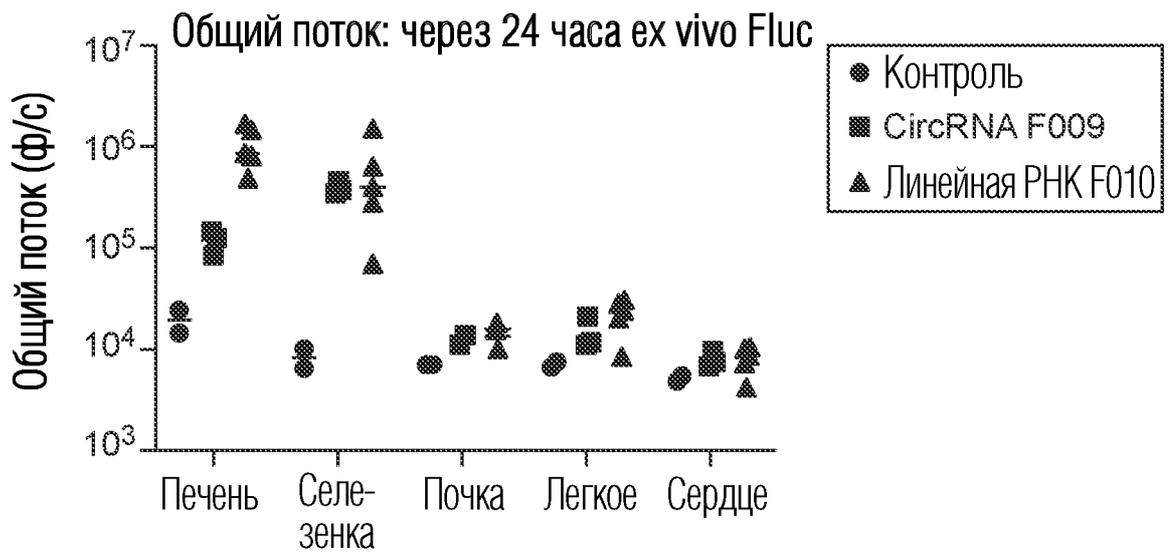
ФИГ. 22В



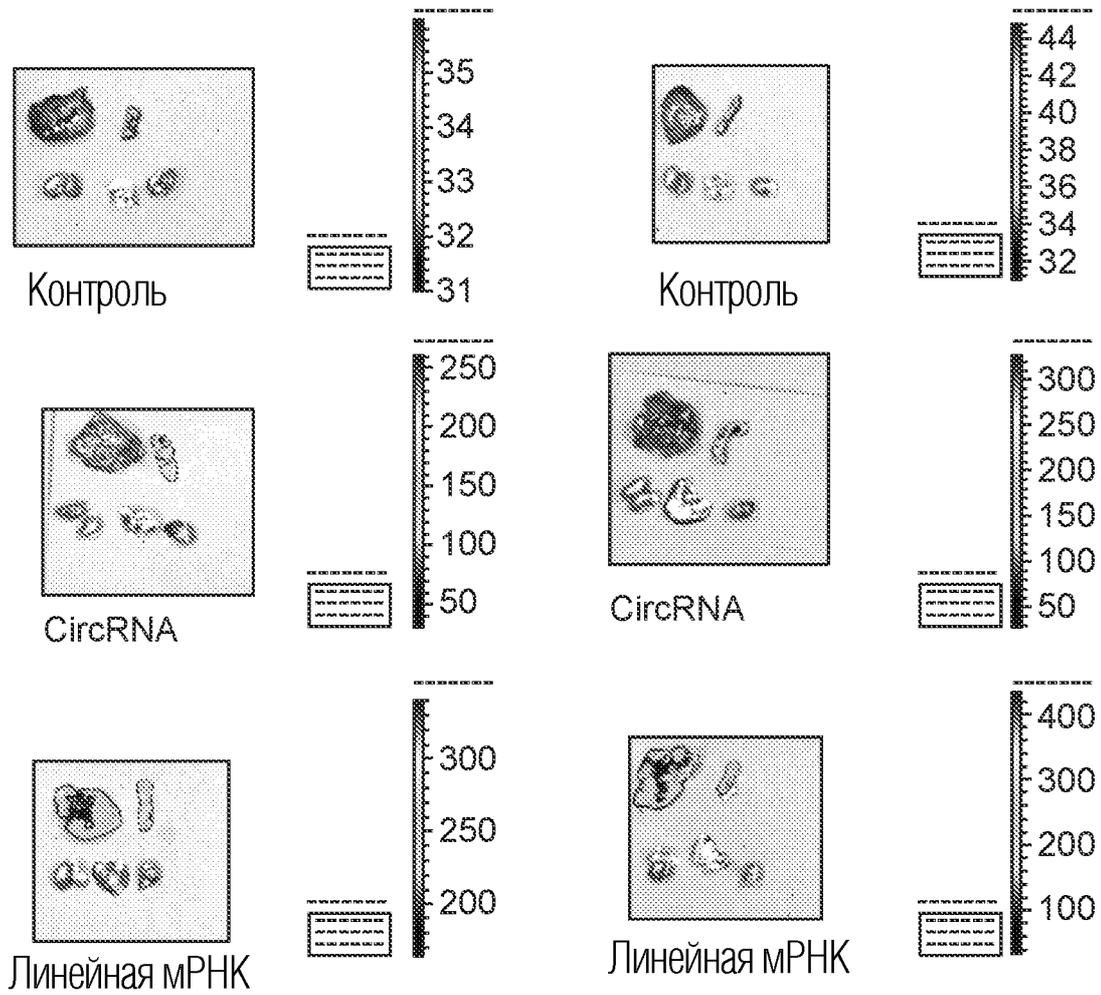
ФИГ. 23



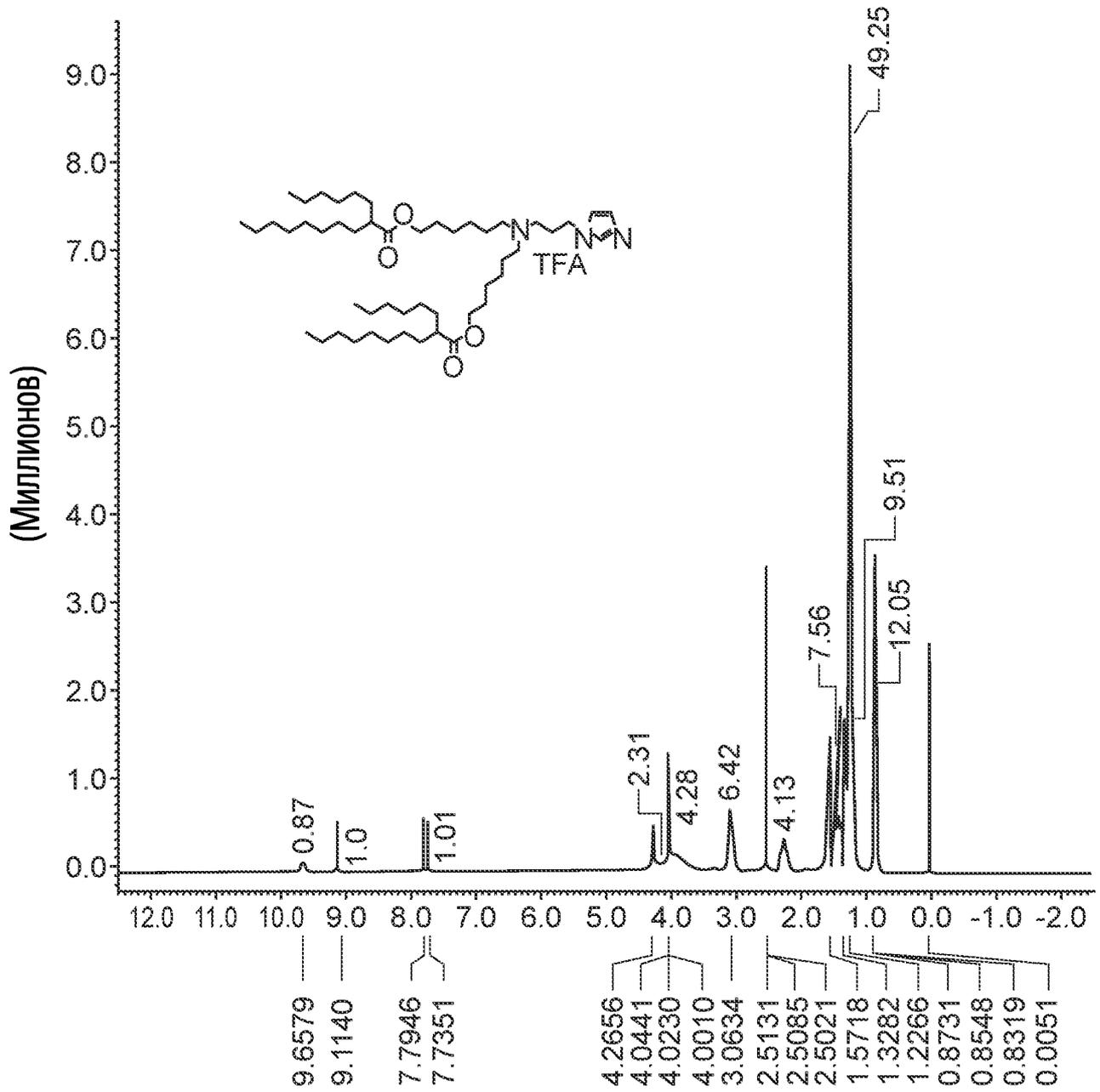
ФИГ. 24



ФИГ. 25

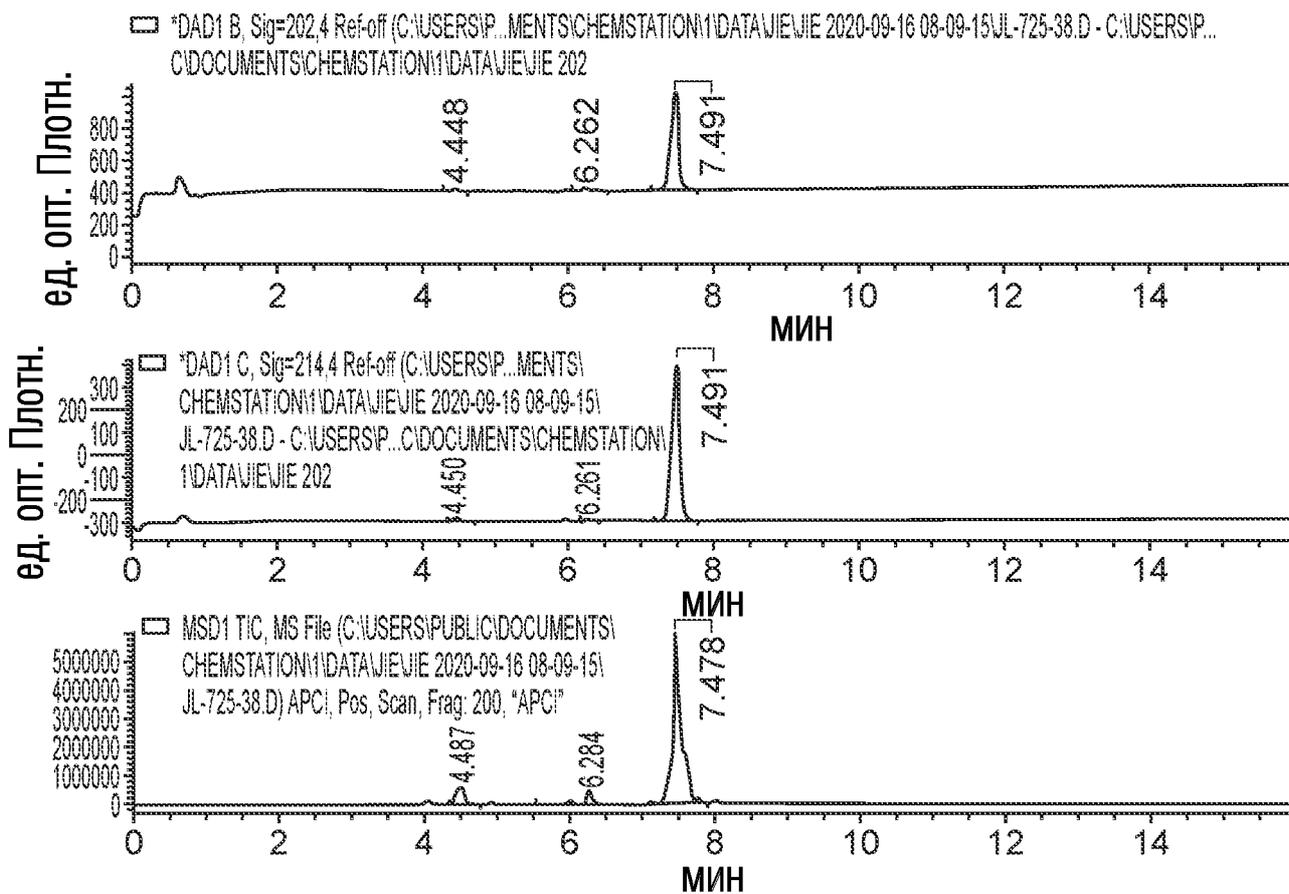


ФИГ. 26

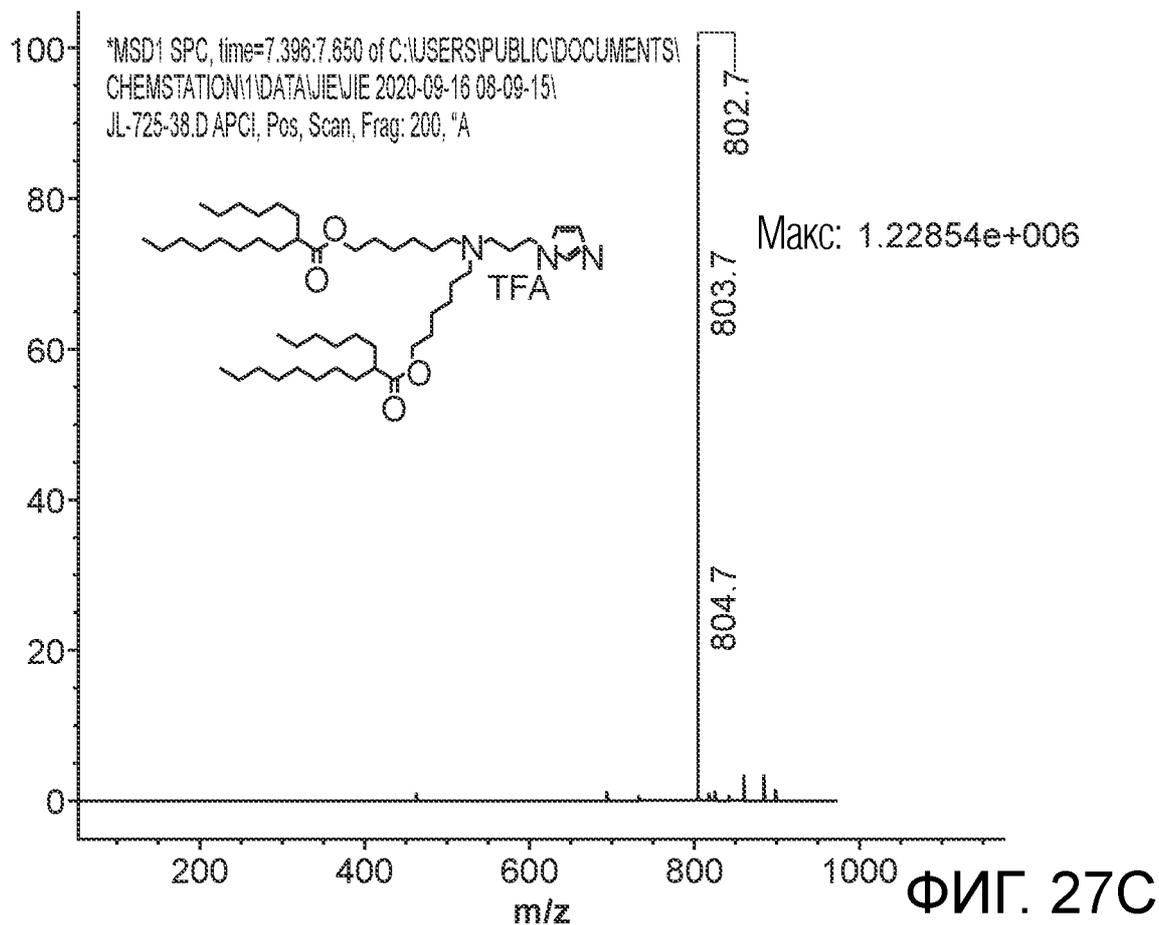


ФИГ. 27А

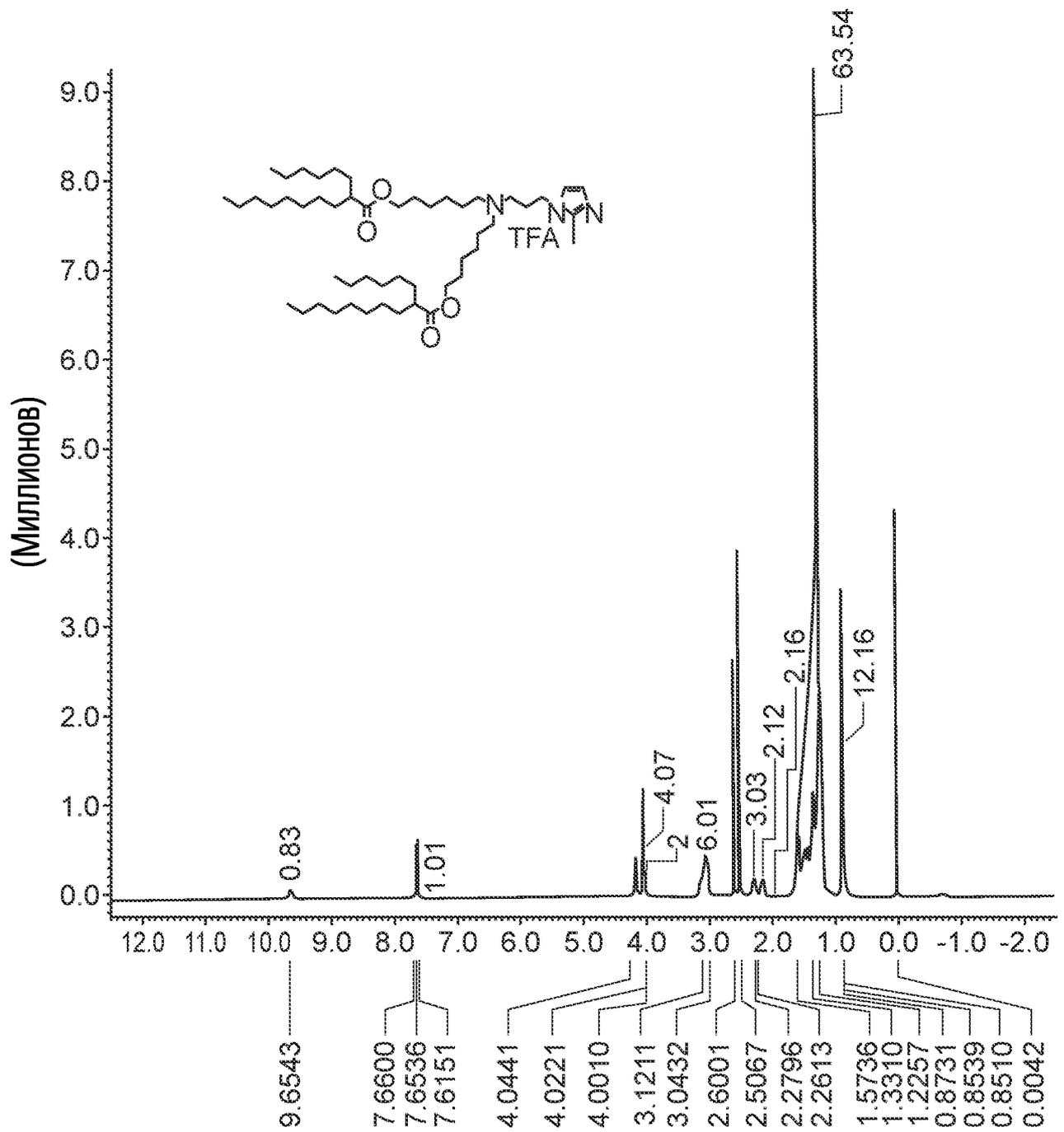
37/88



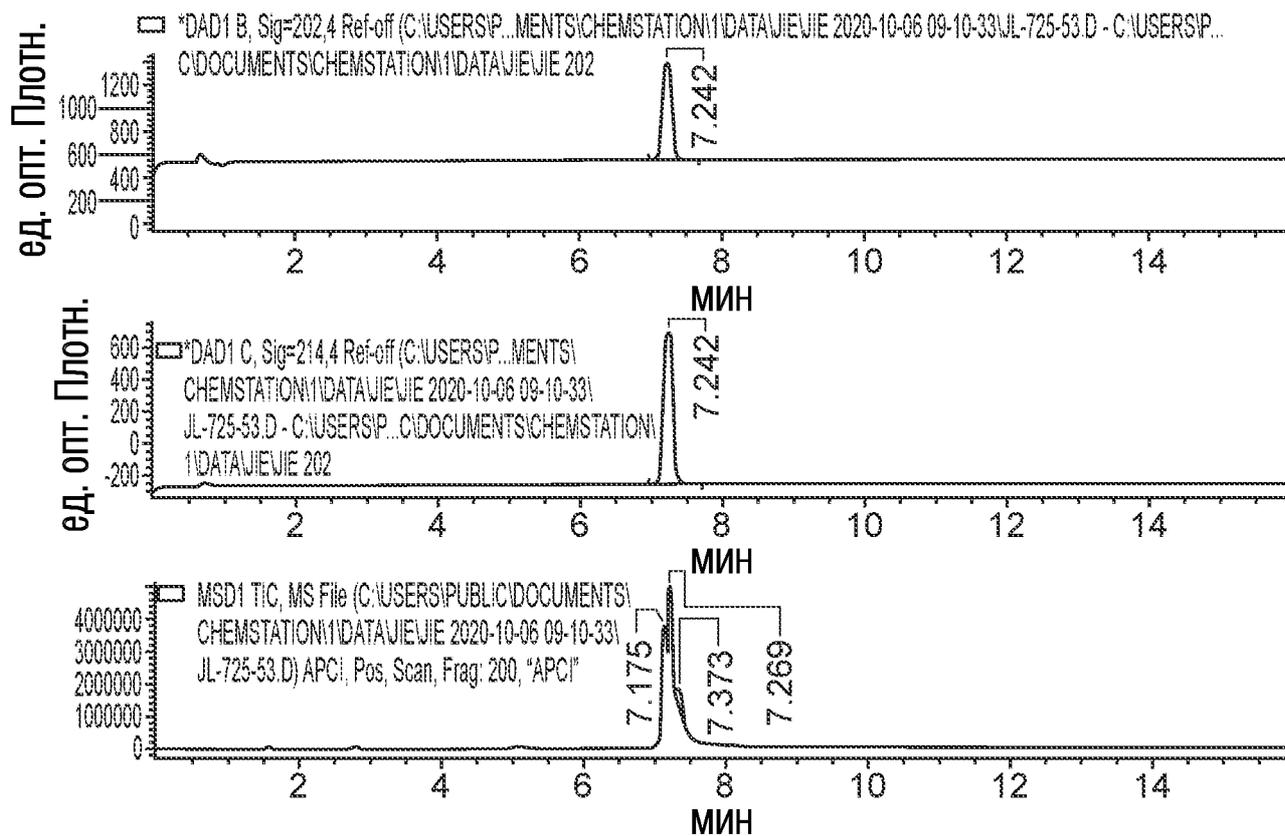
ФИГ. 27В



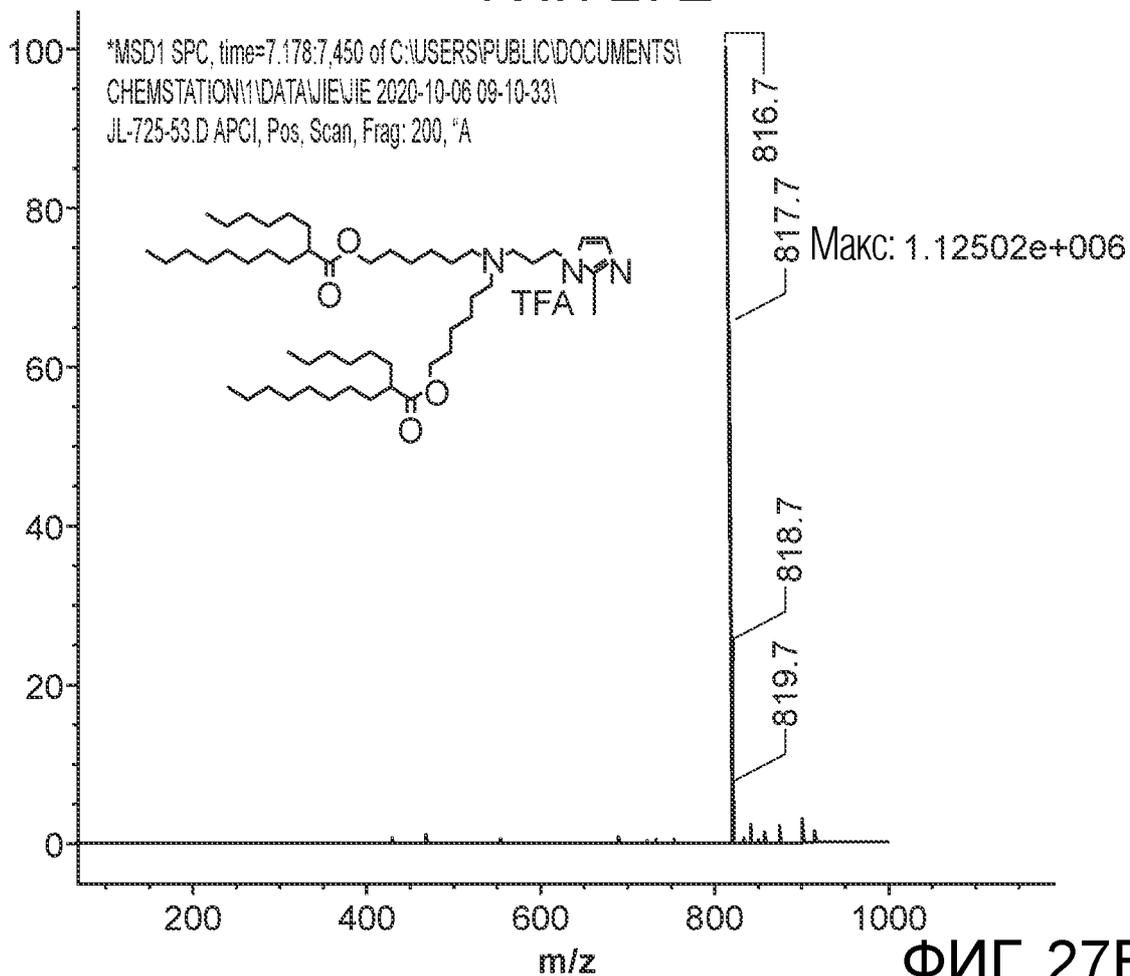
ФИГ. 27С



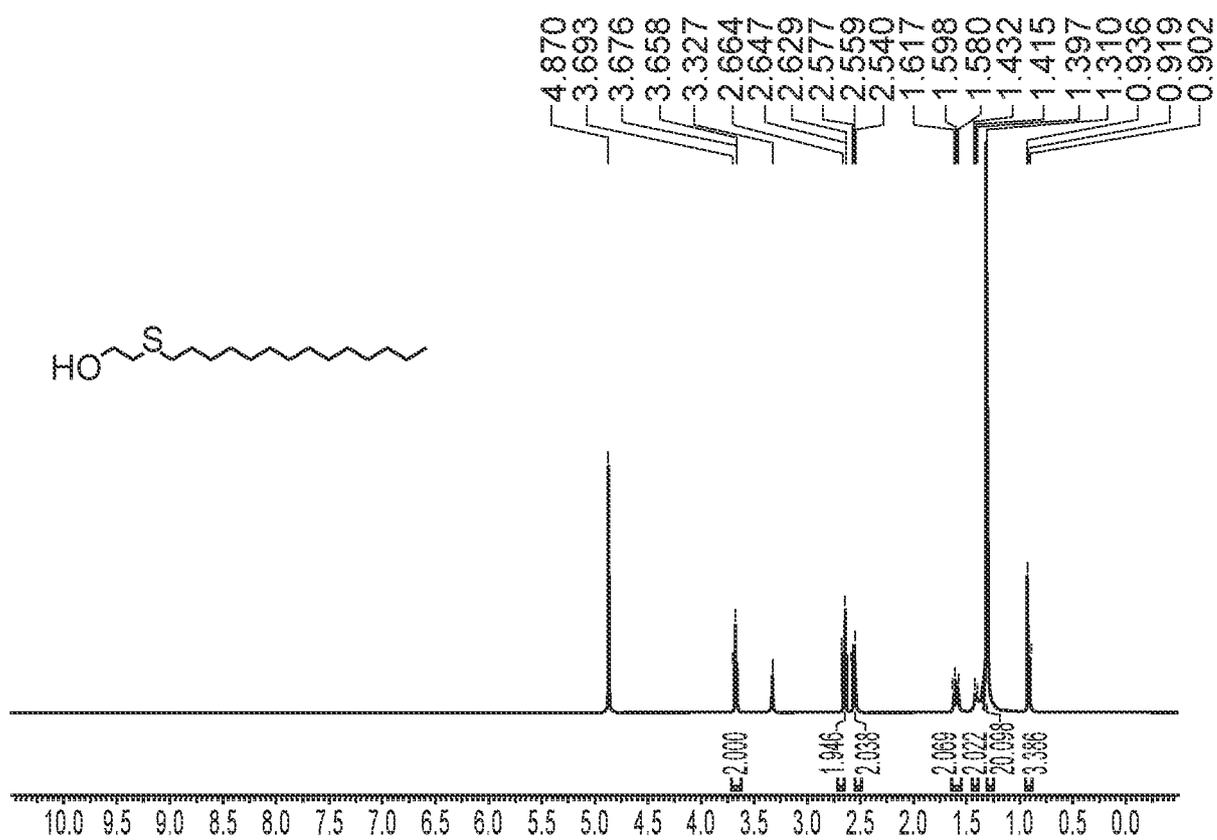
ФИГ. 27D



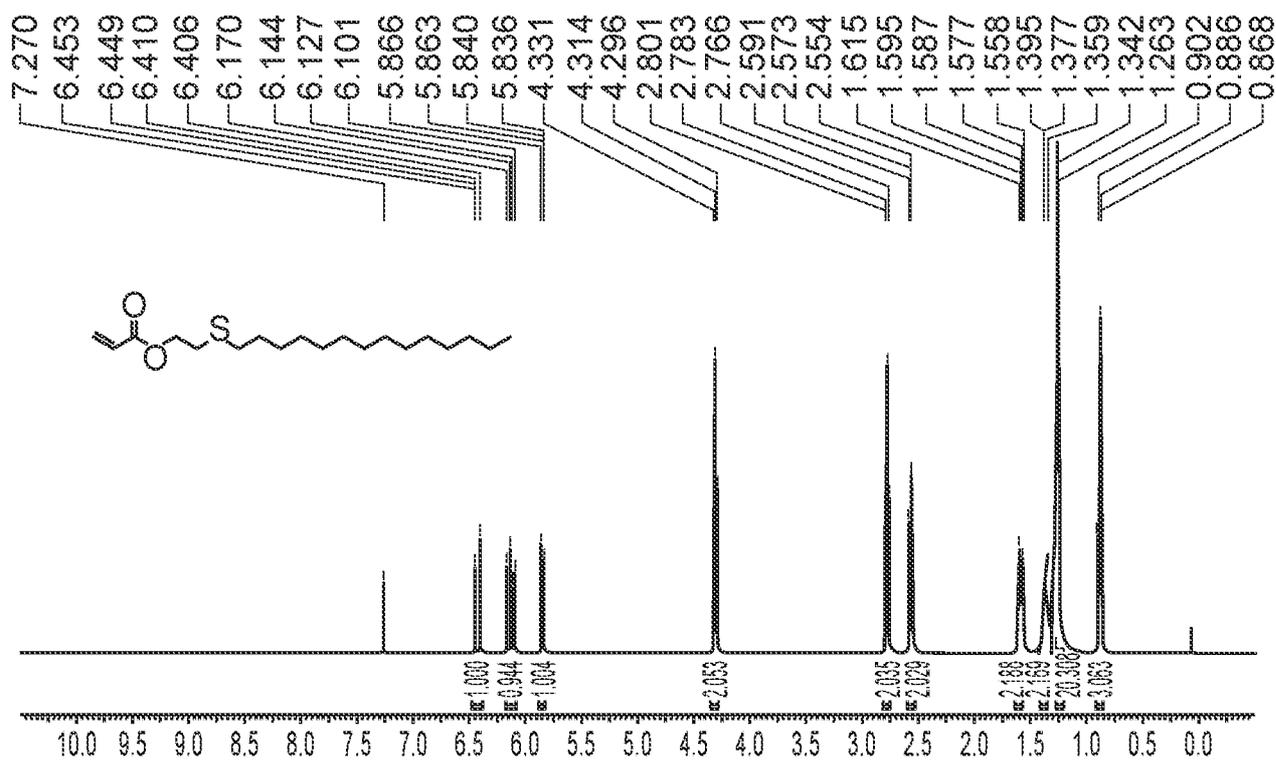
ФИГ. 27E



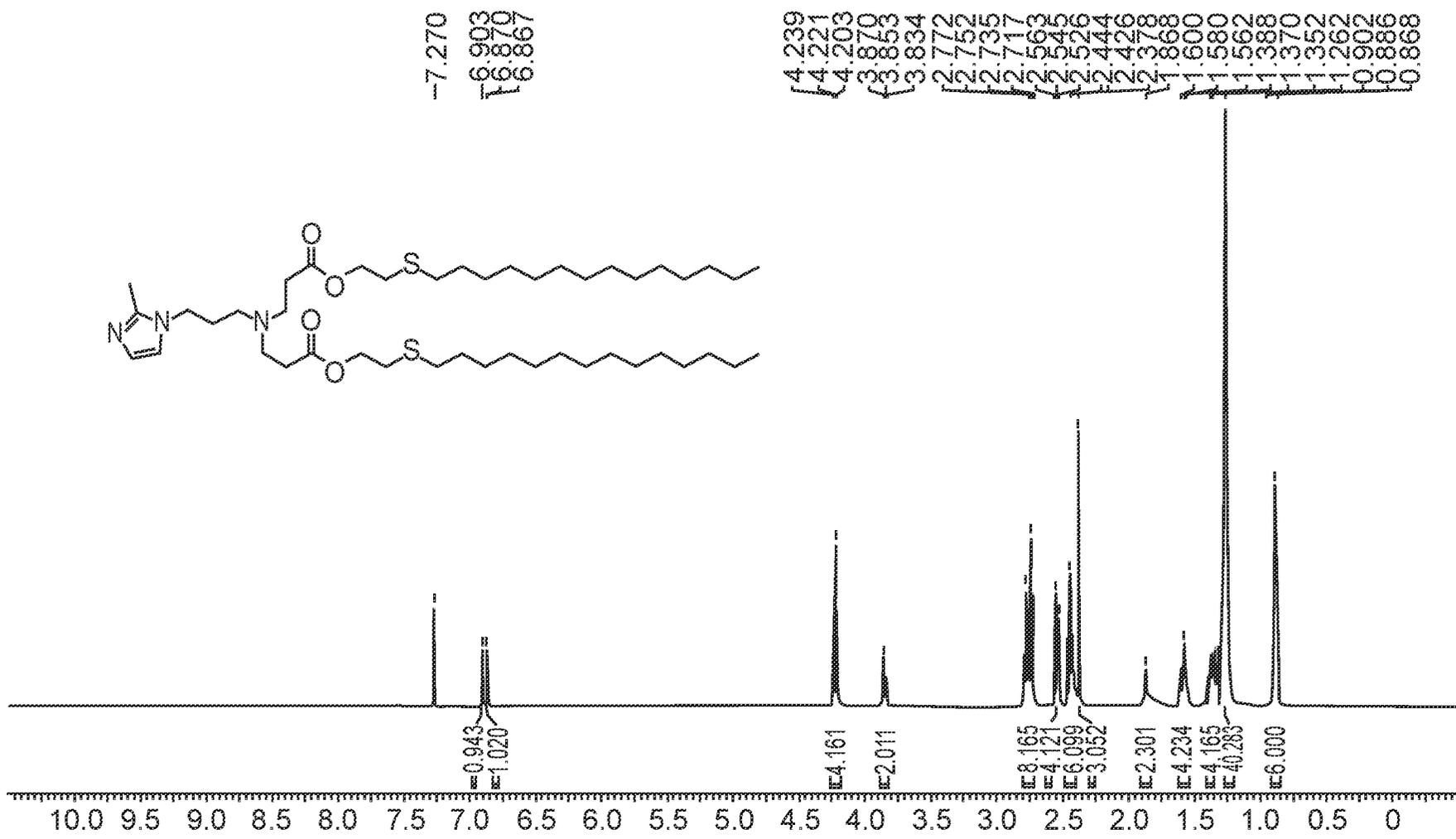
ФИГ. 27F



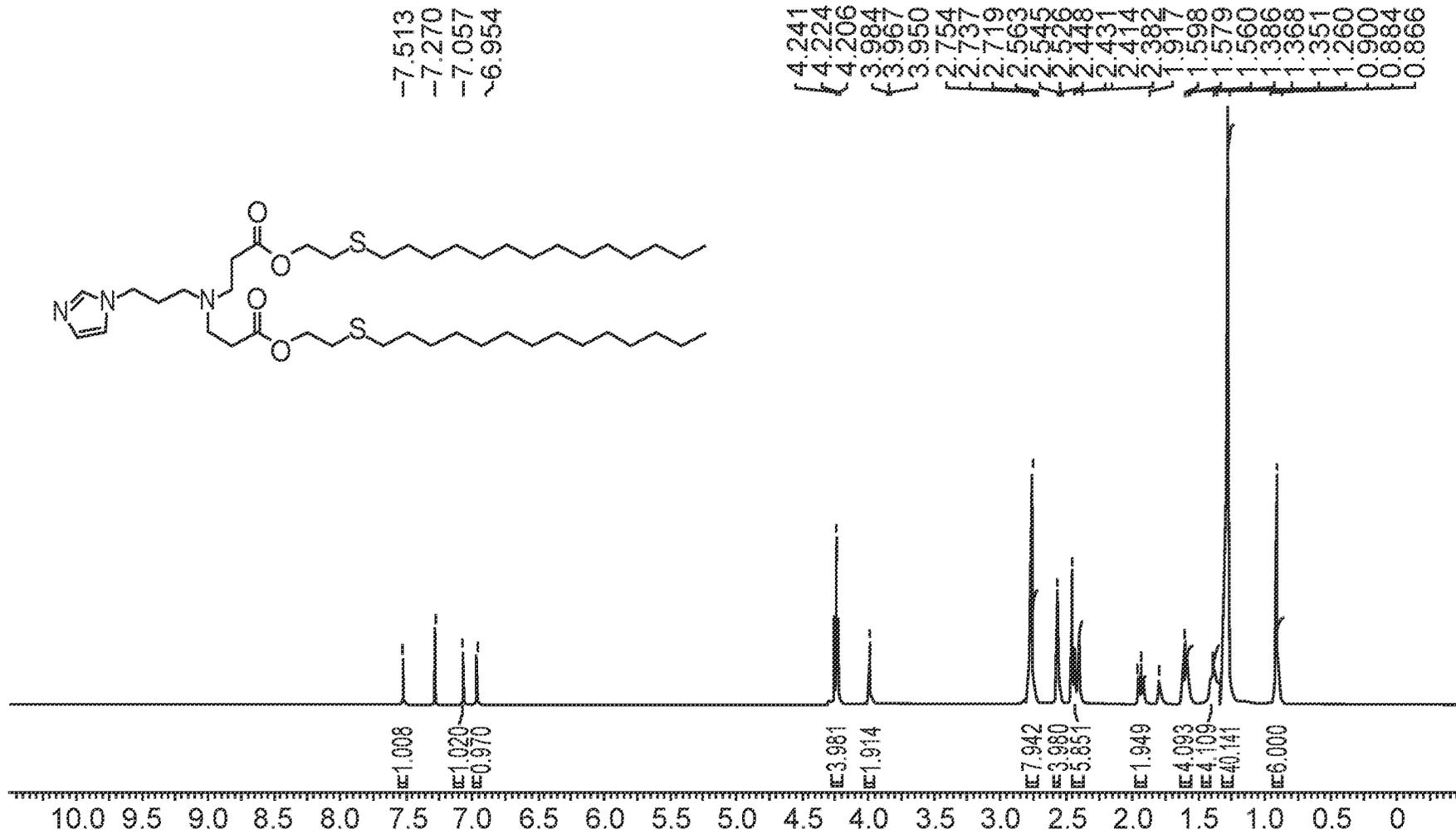
ФИГ. 28А



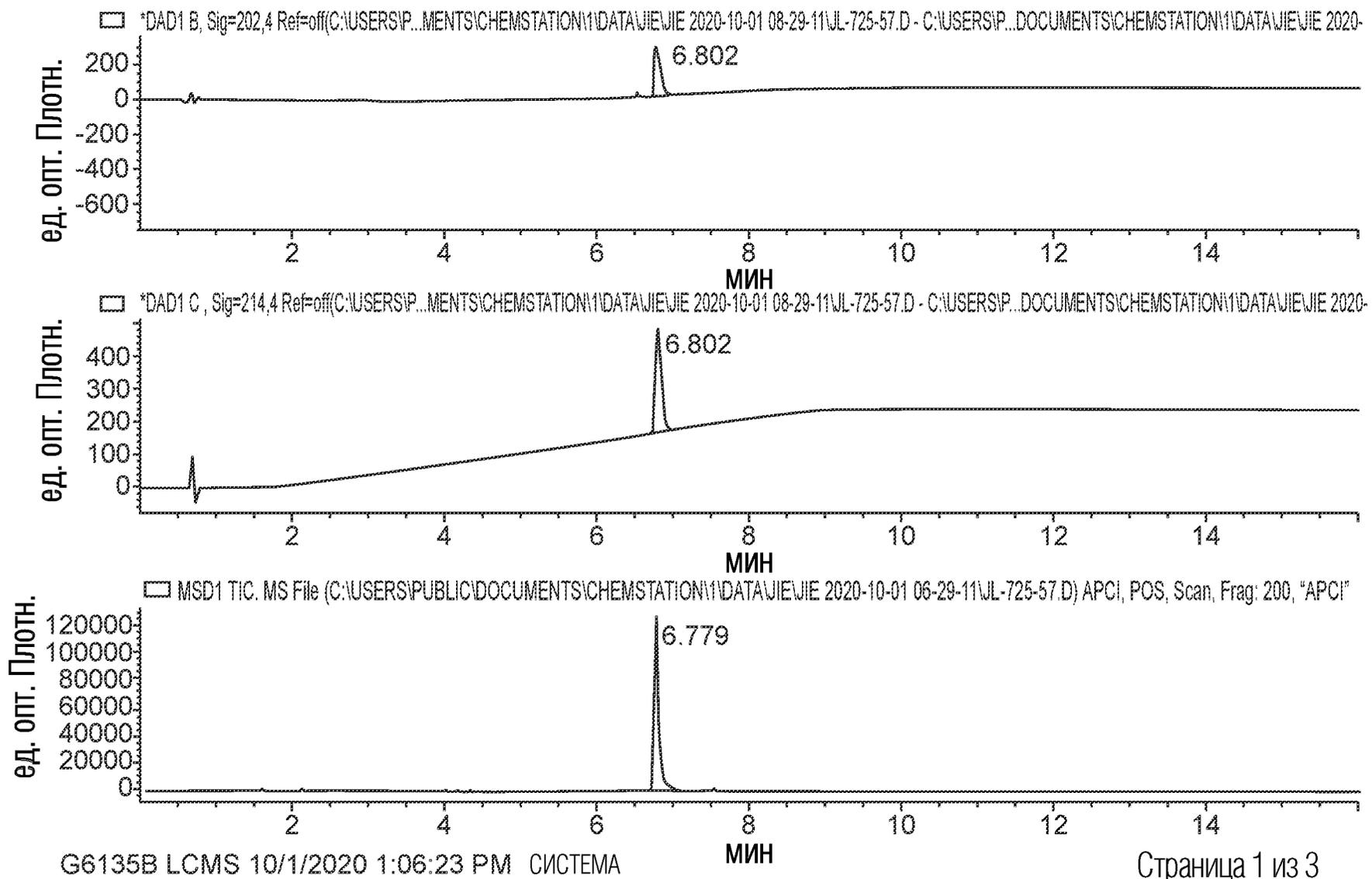
ФИГ. 28В



ФИГ. 28С

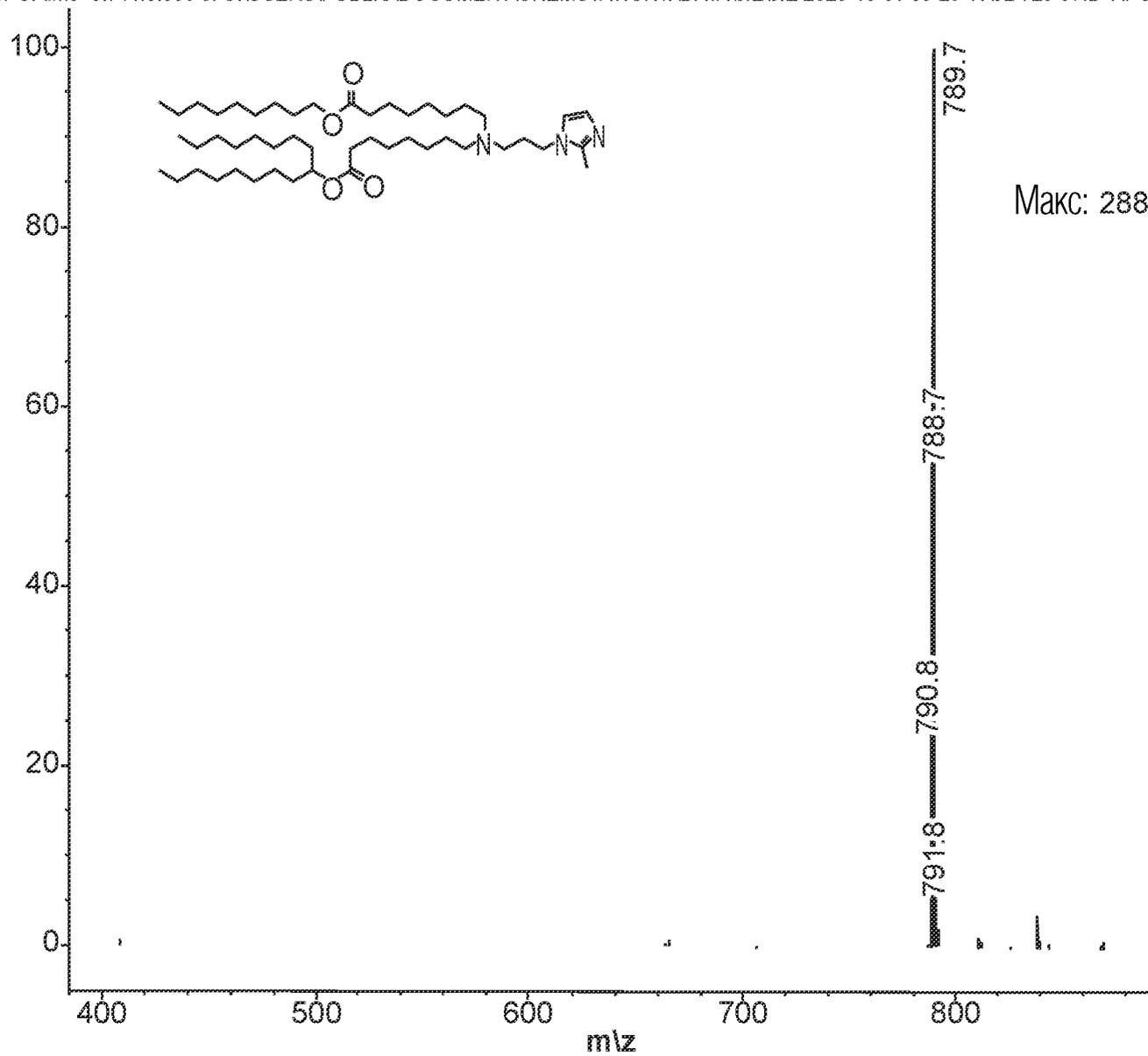


ФИГ. 29



ФИГ. 30В

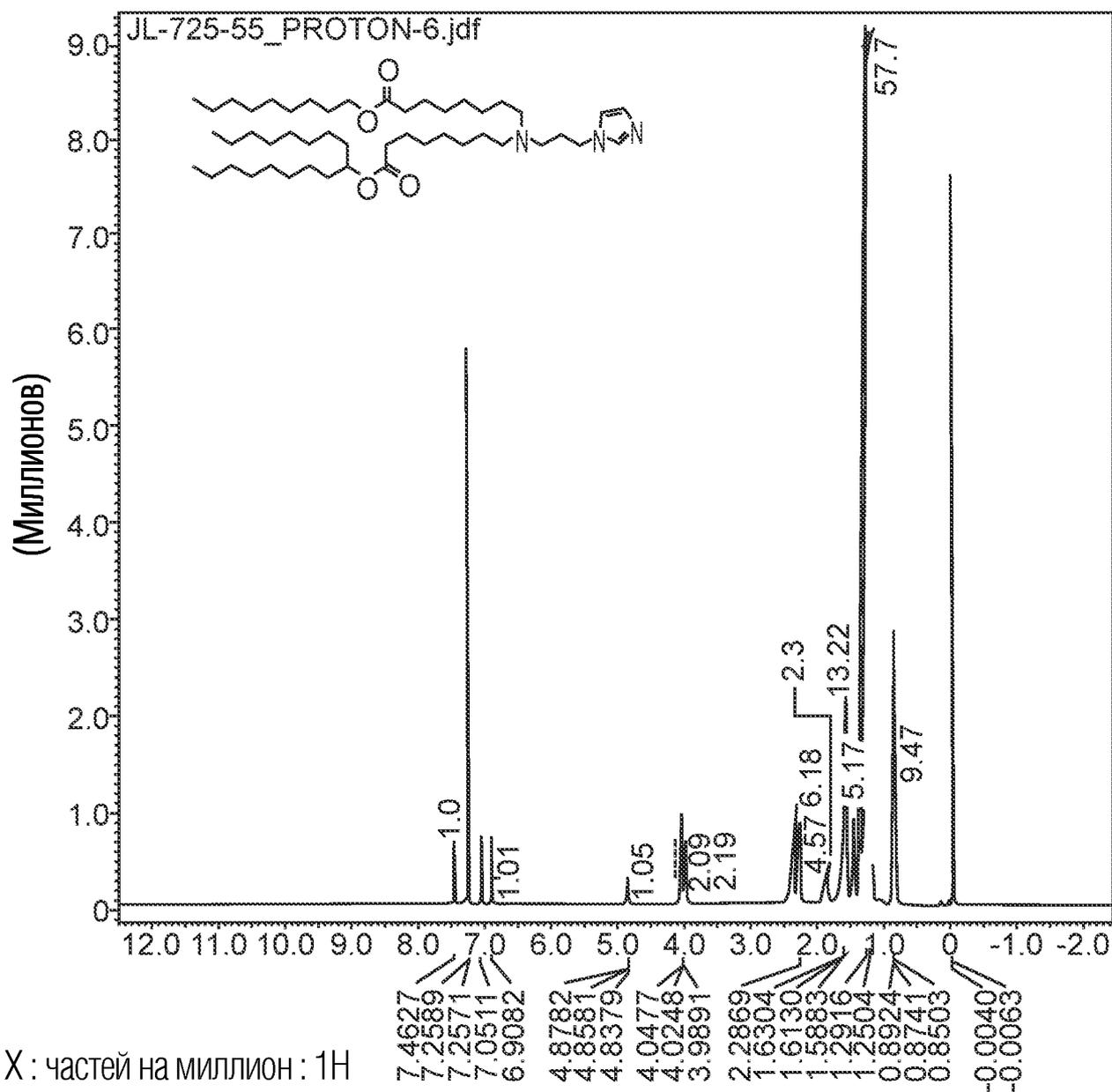
*MSD1 SPC. time=5.741:6.869 of C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENT\CHEMSTATION\1\DATA\JIE\JIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-57.D APCI, POS, Scan, Frag: 200, "A



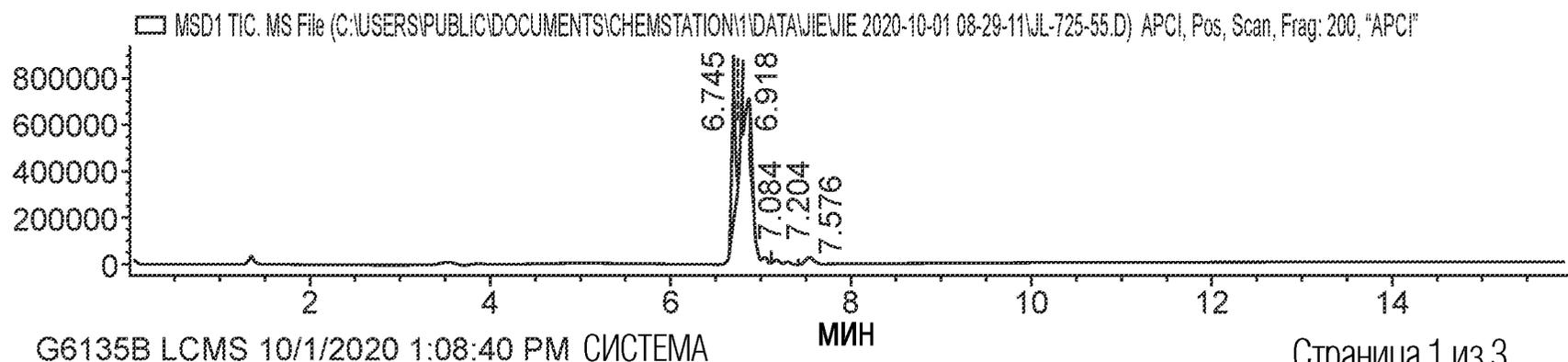
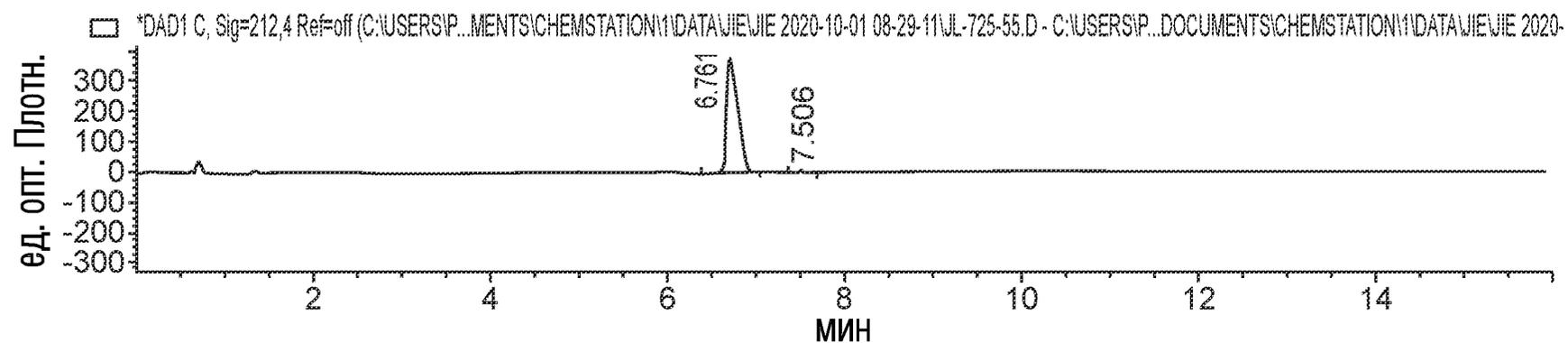
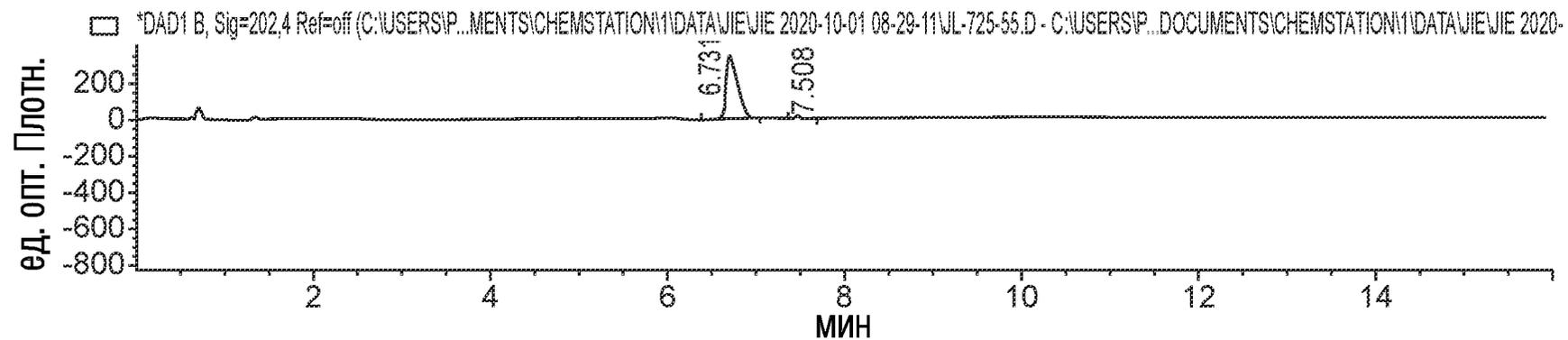
Макс: 28871

45/88

ФИГ. 30С



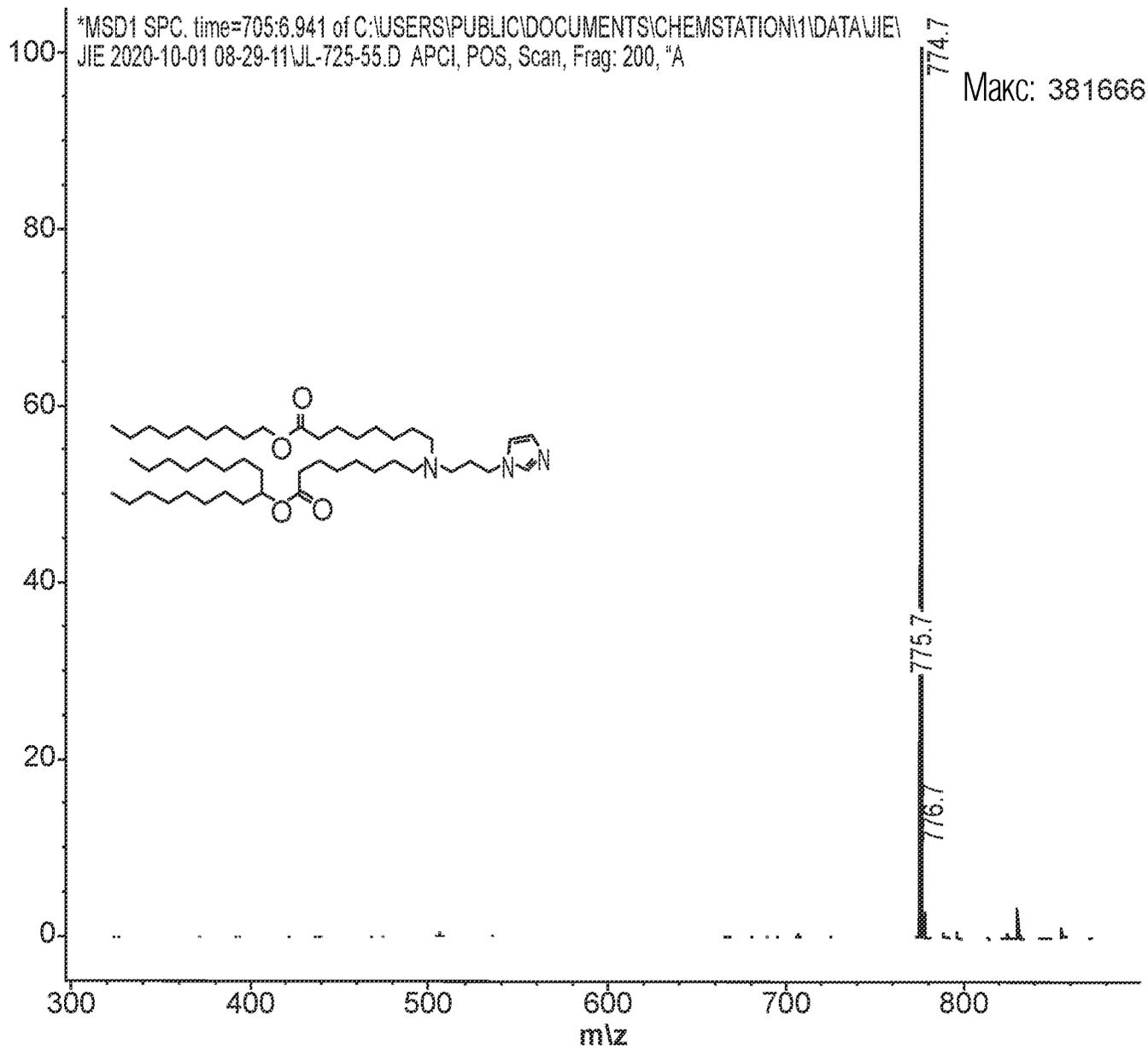
ФИГ. 31А



G6135B LCMS 10/1/2020 1:08:40 PM СИСТЕМА

Страница 1 из 3

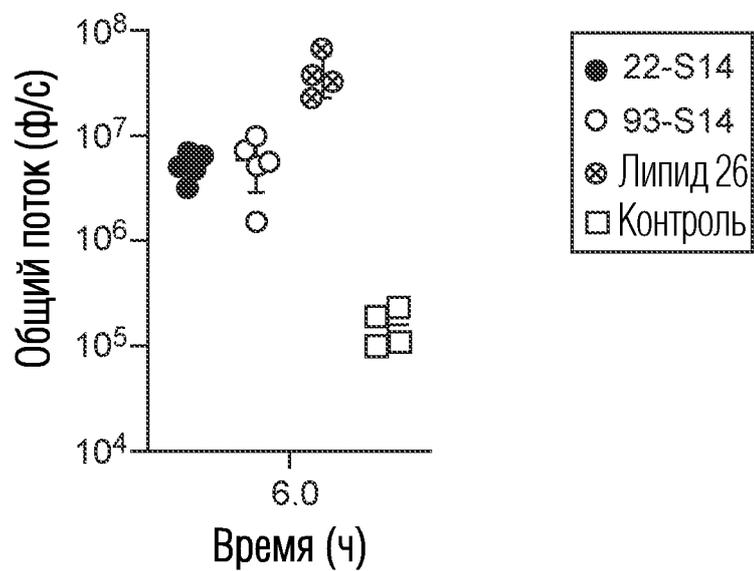
ФИГ. 31В



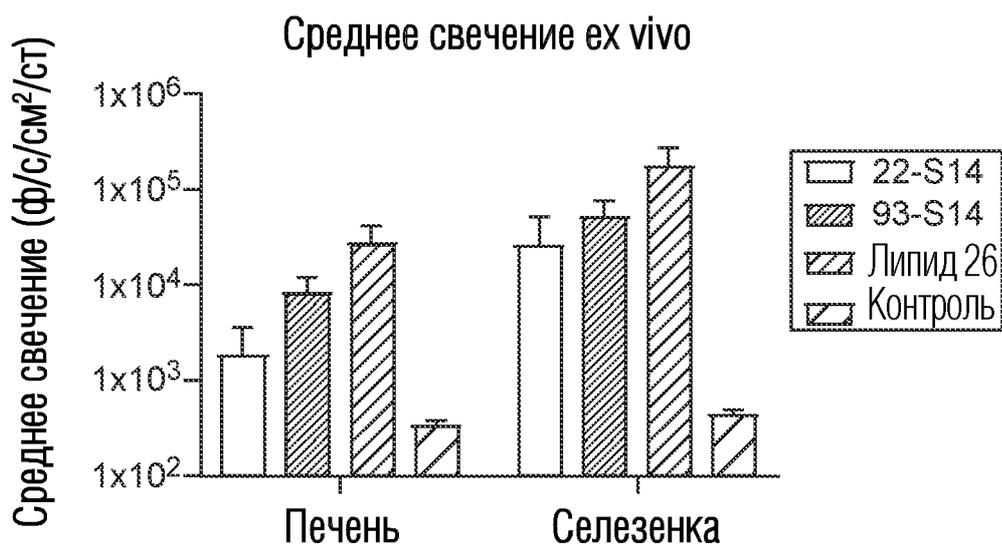
48/88

ФИГ. 31С

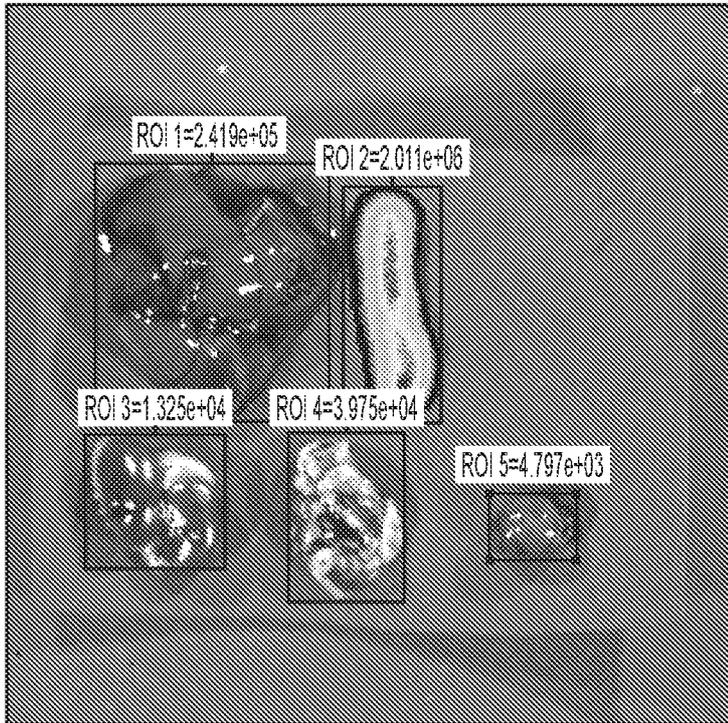
Общий поток по всему телу IVIS



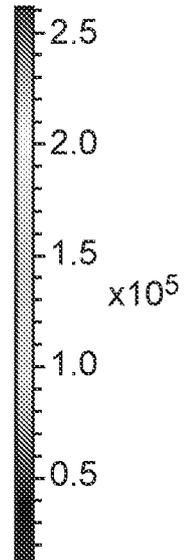
ФИГ. 32А



ФИГ. 32В



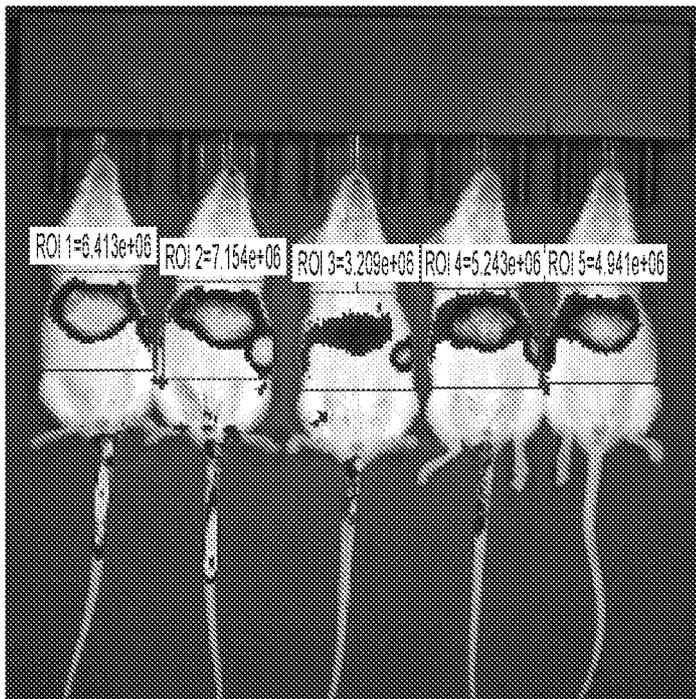
Люминесценция



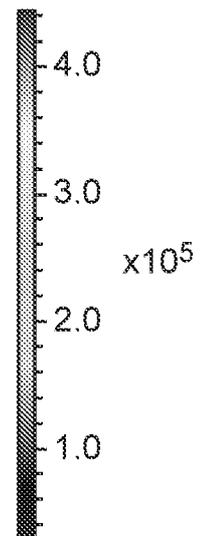
Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = 1.35e4
Макс = 2.61e5

ФИГ. 33А



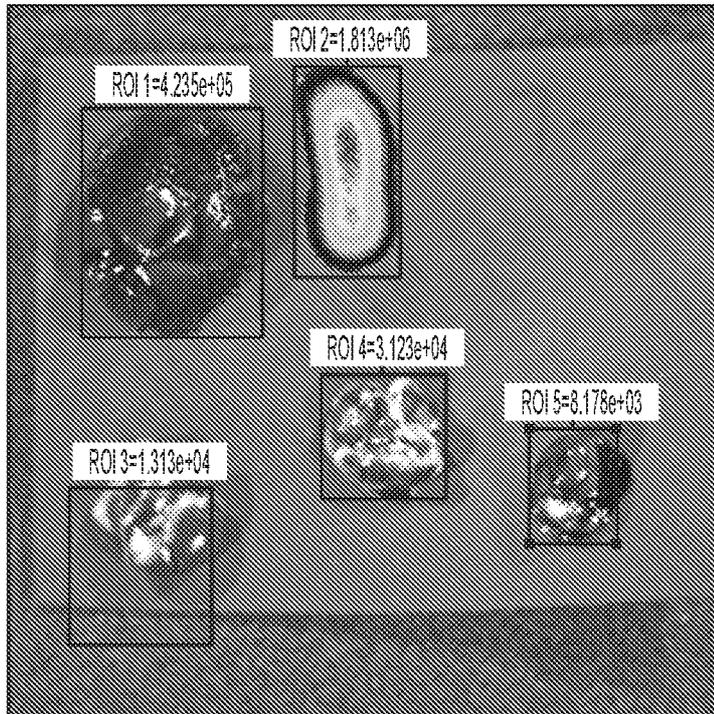
Люминесценция



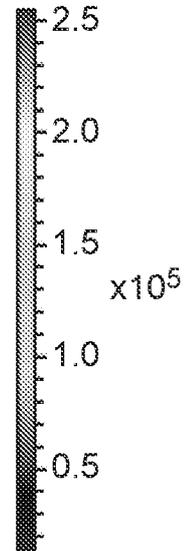
Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = 2.88e4
Макс = 4.44e5

ФИГ. 33В



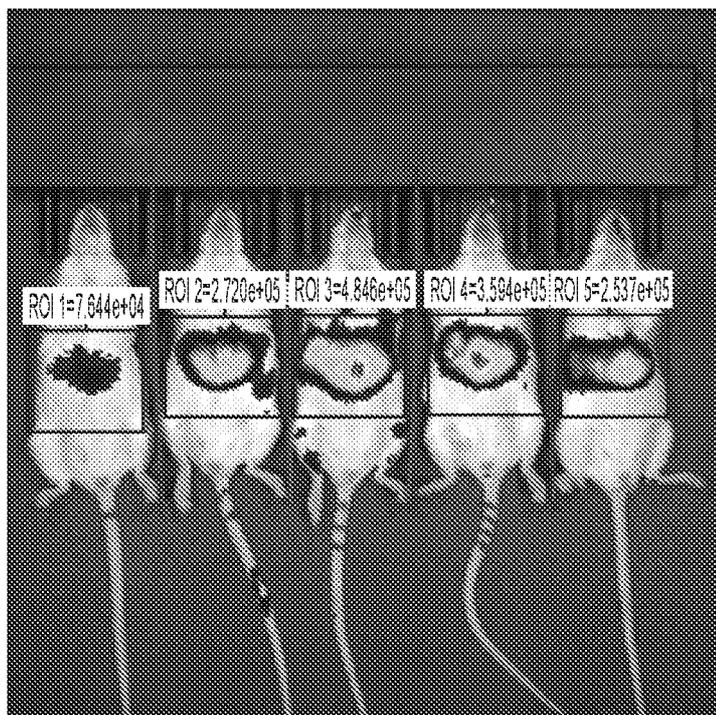
Люминесценция



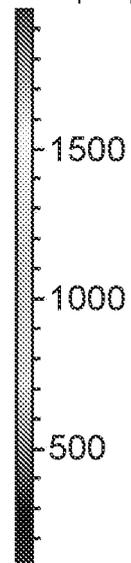
Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = 1.32e4
Макс = 2.55e5

ФИГ. 34А



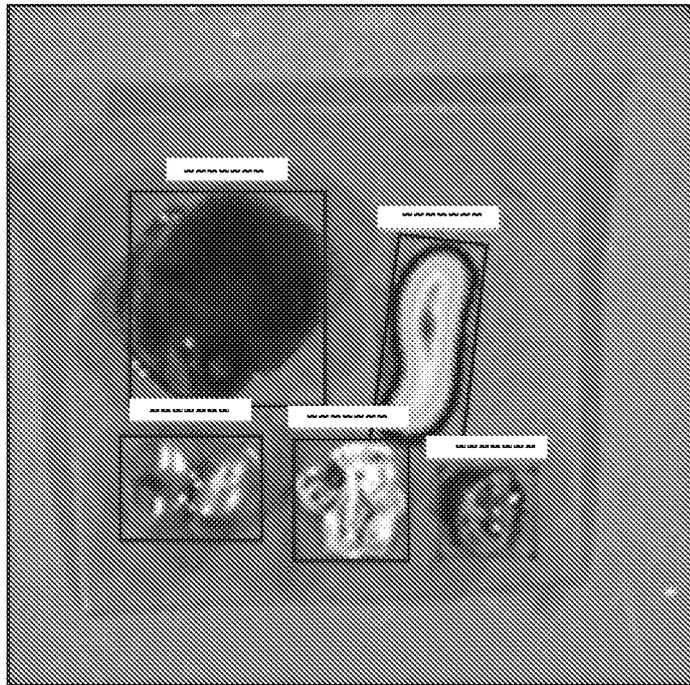
Люминесценция



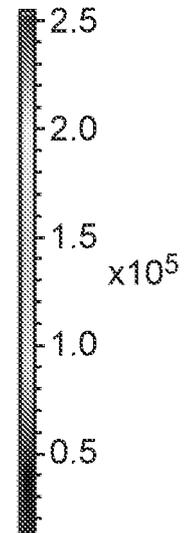
Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = 100
Макс = 1968

ФИГ. 34В



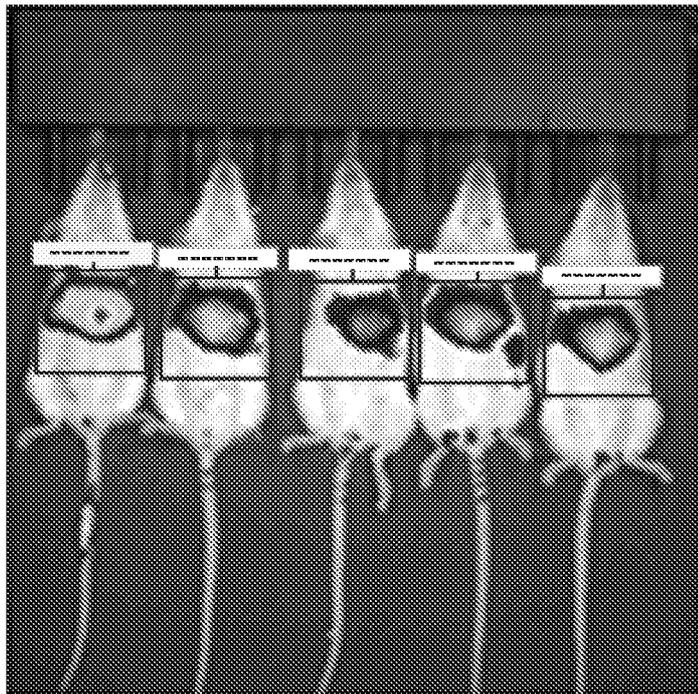
Люминесценция



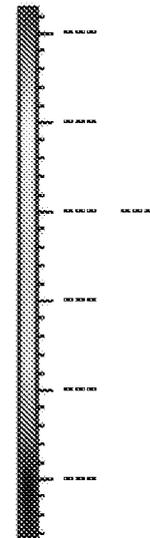
Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = -----
Макс = -----

ФИГ. 35А



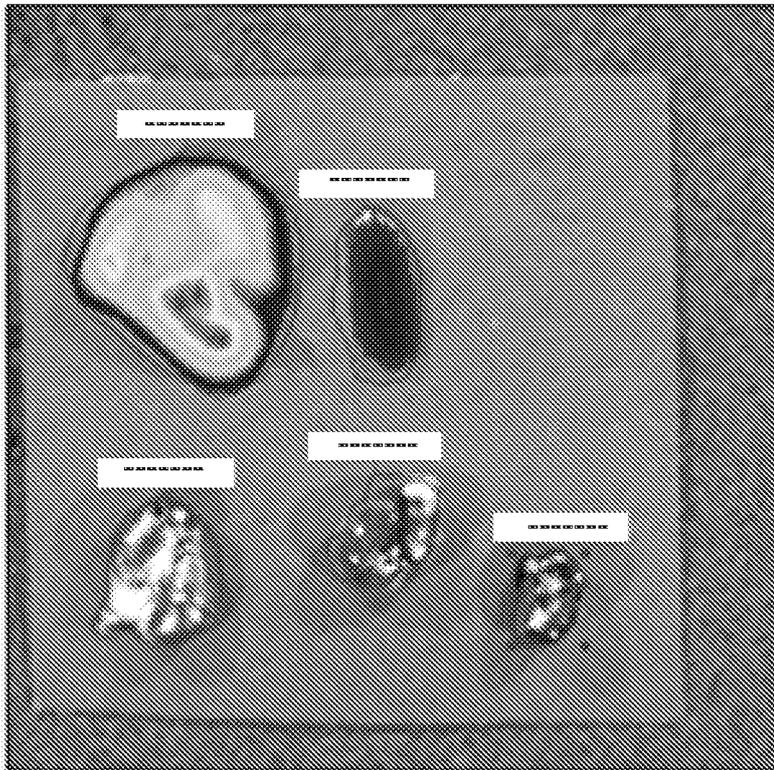
Люминесценция



Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = -----
Макс = -----

ФИГ. 35В



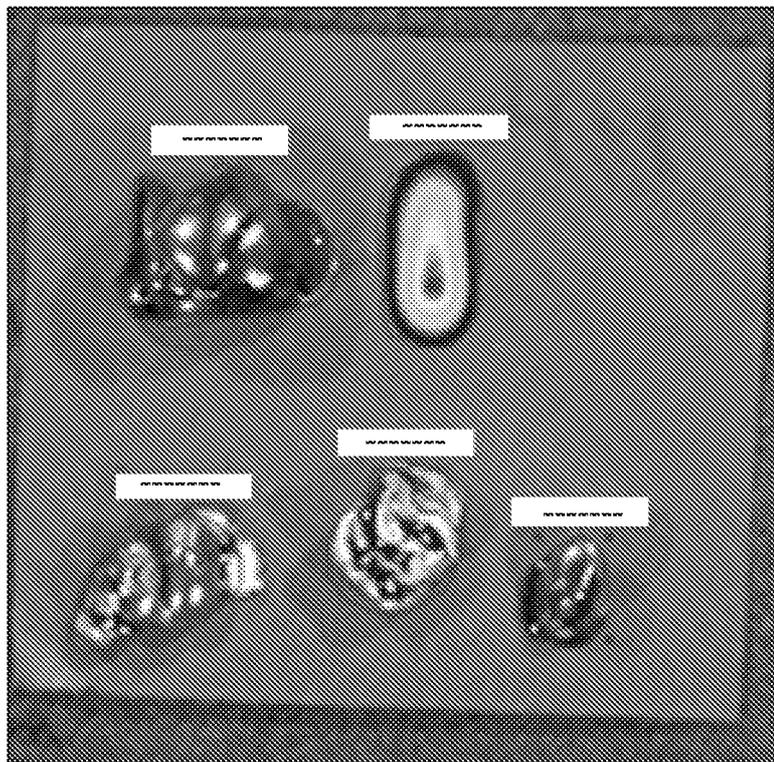
ФИГ. 36А

Люминесценция



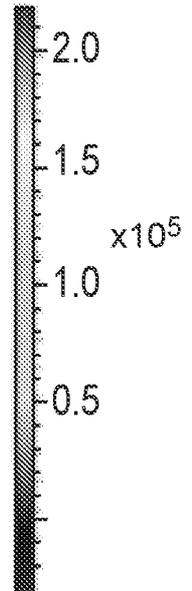
Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = -----
Макс = -----



ФИГ. 36В

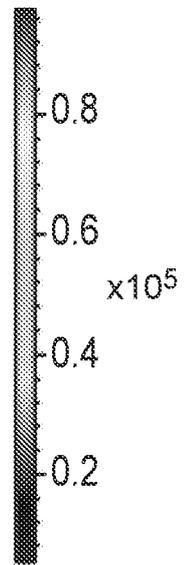
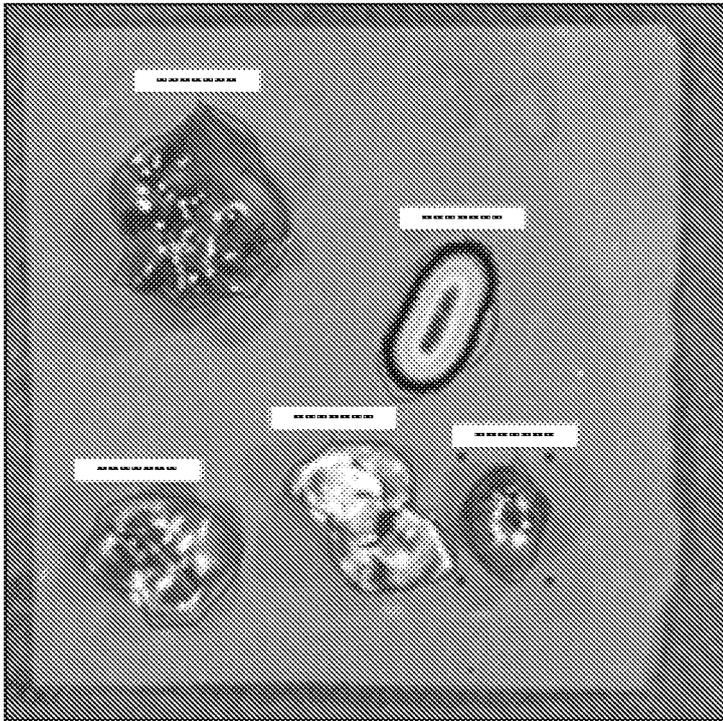
Люминесценция



Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = -----
Макс = -----

Люминесценция

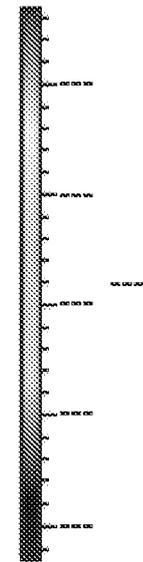
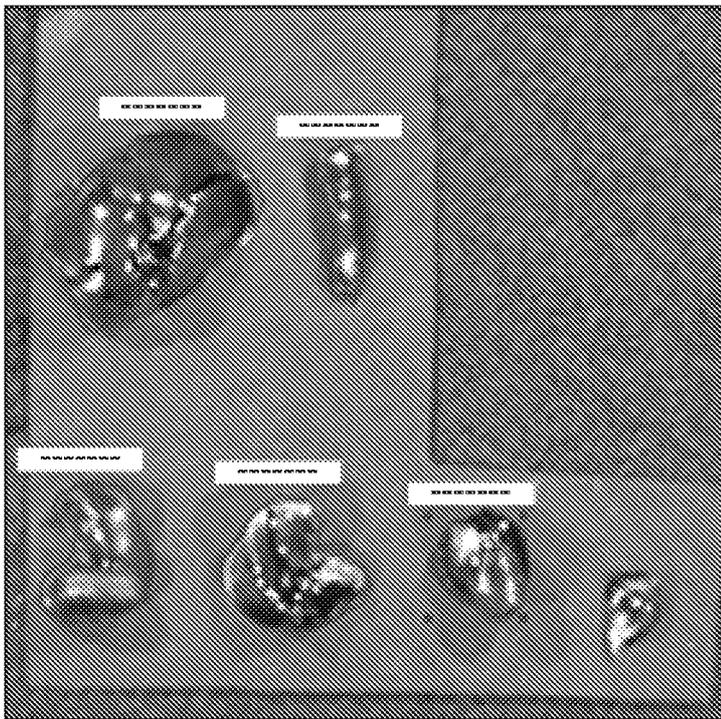


Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = -----
Макс = -----

ФИГ. 36С

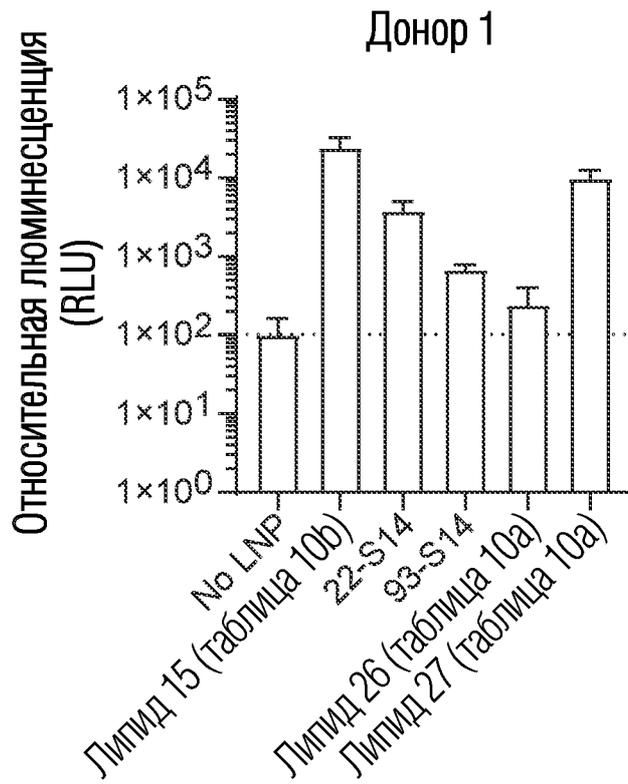
Люминесценция



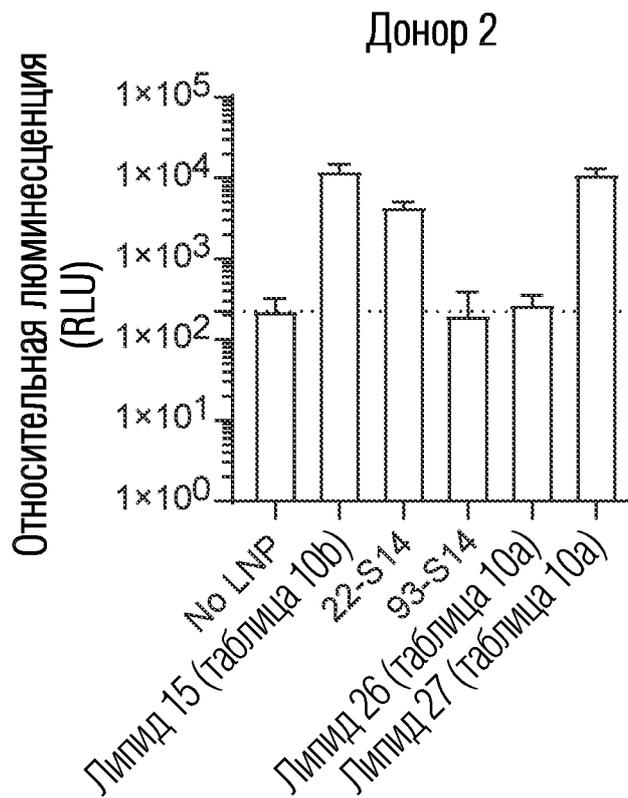
Свечение
(ф/с/см²/ст)

Цветовая шкала
Мин = -----
Макс = -----

ФИГ. 36D

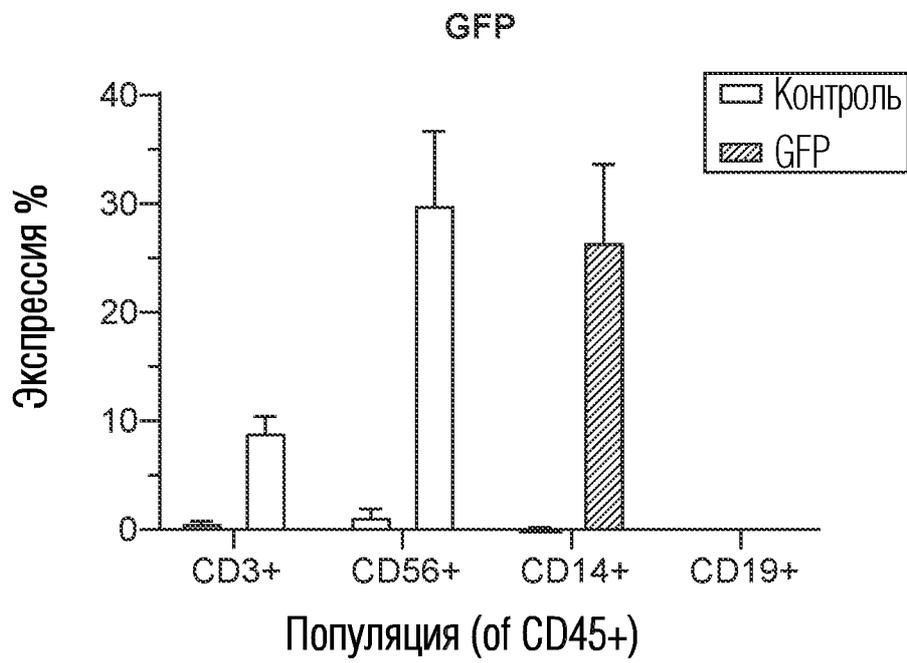


ФИГ. 37А

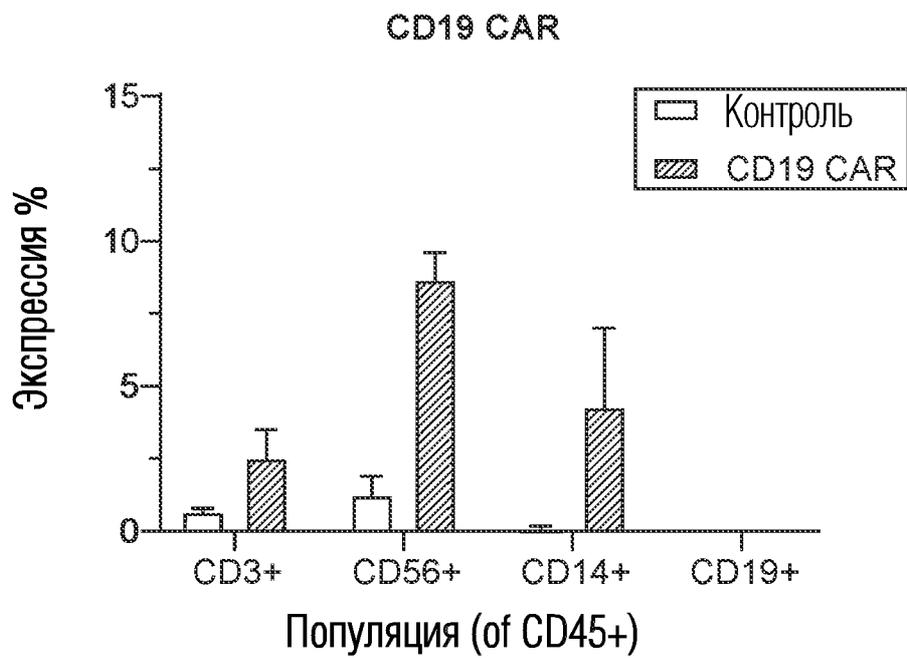


ФИГ. 37В

56/88

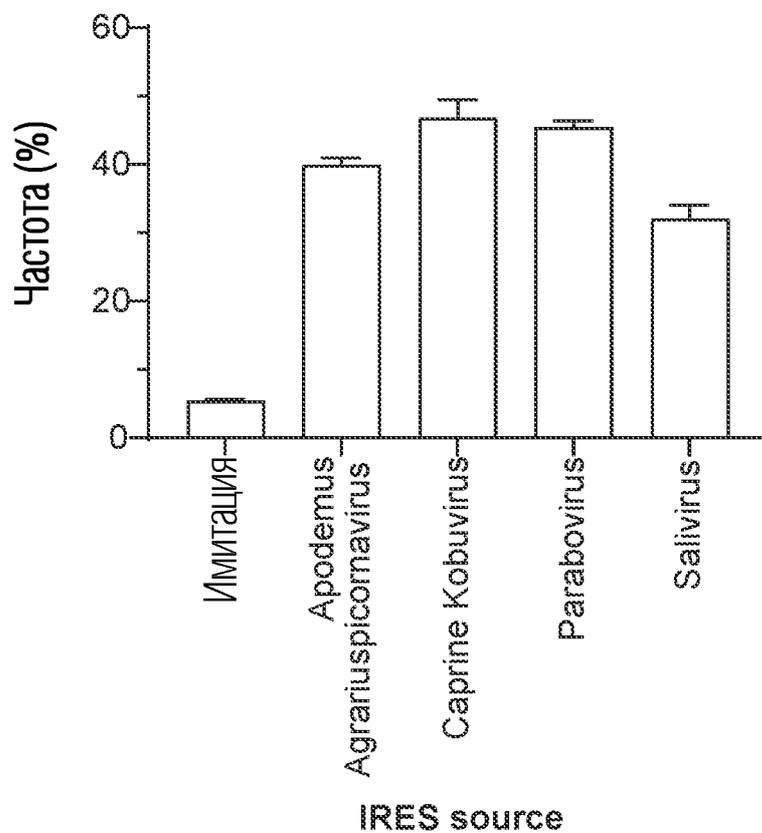


ФИГ. 38А

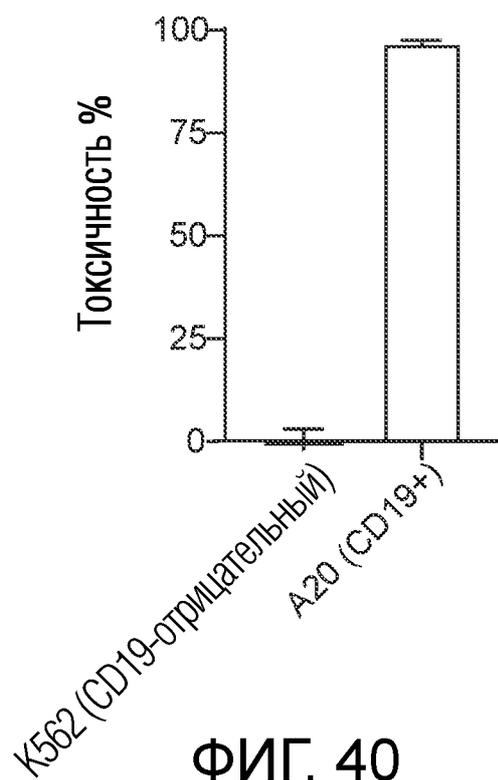


ФИГ. 38В

Экспрессия CAR против мышинных CD19

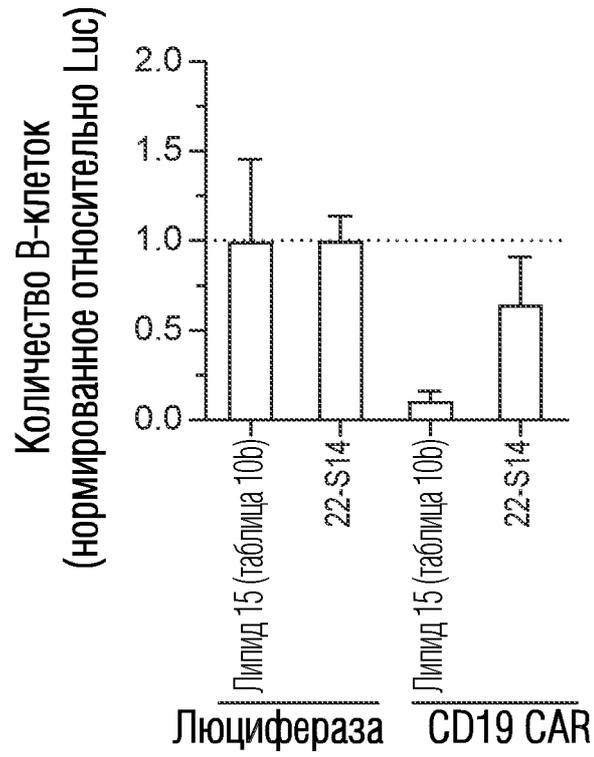


ФИГ. 39



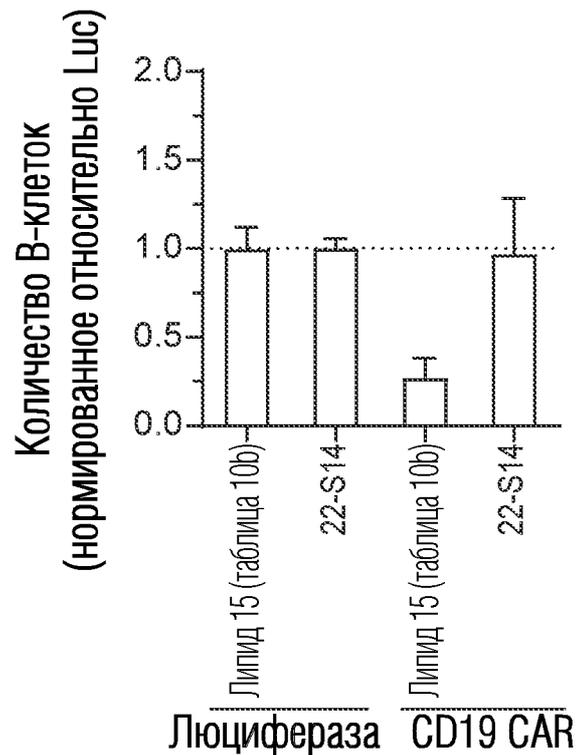
ФИГ. 40

Количество В-клеток в периферической крови на 8 день

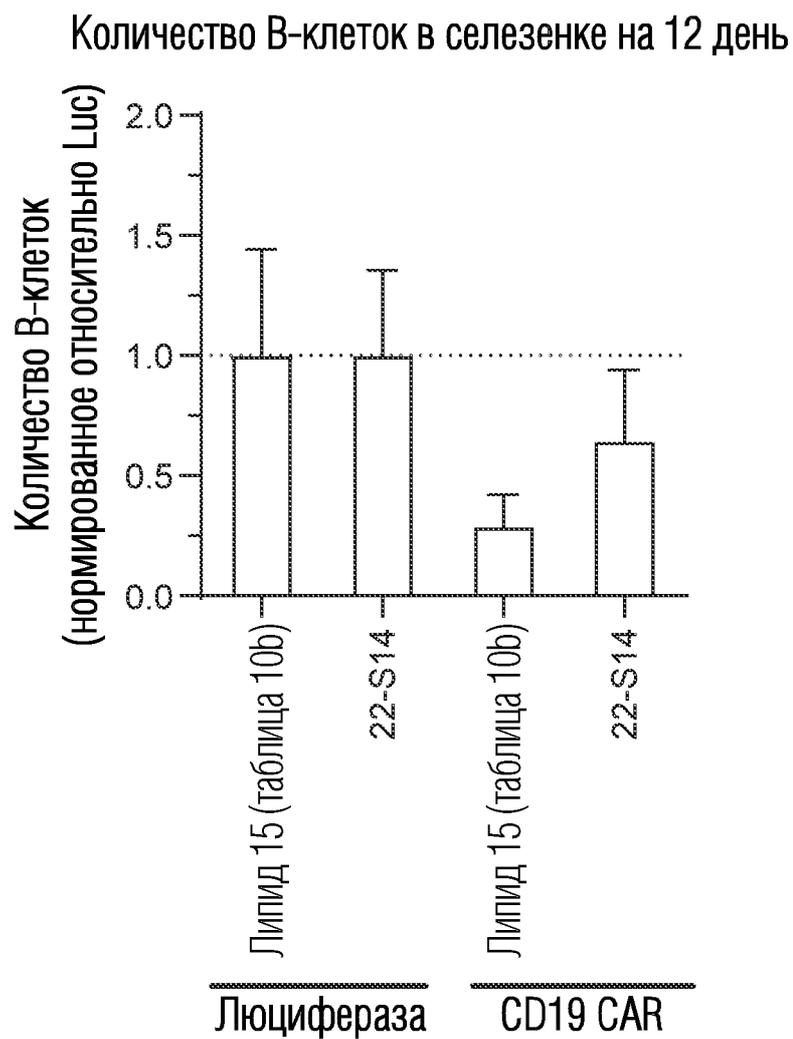


ФИГ. 41А

Количество В-клеток в селезенке на 12 день

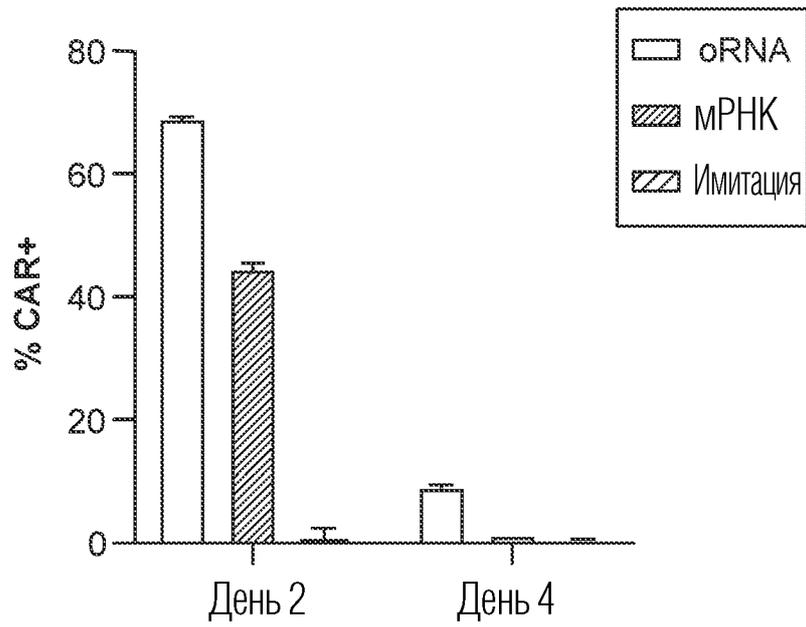


ФИГ. 41В



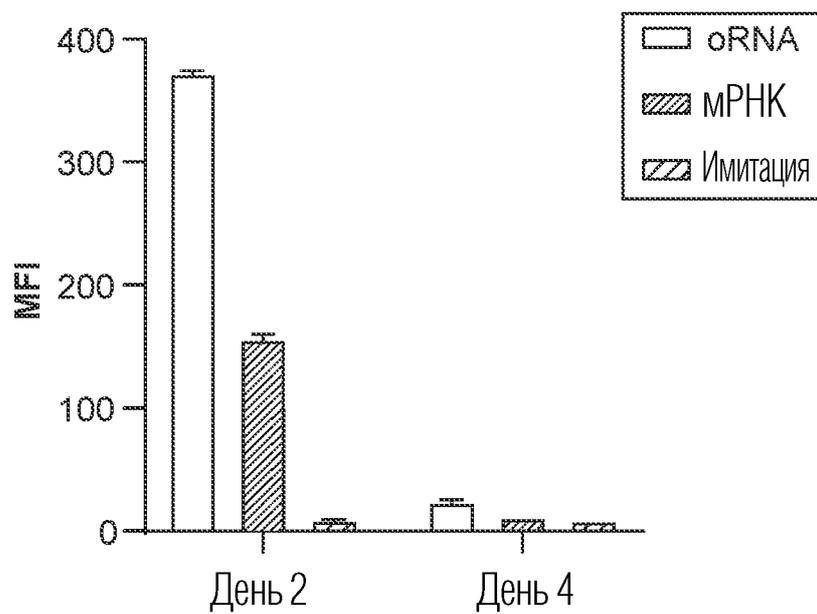
ФИГ. 41С

CD19 CAR экспрессия

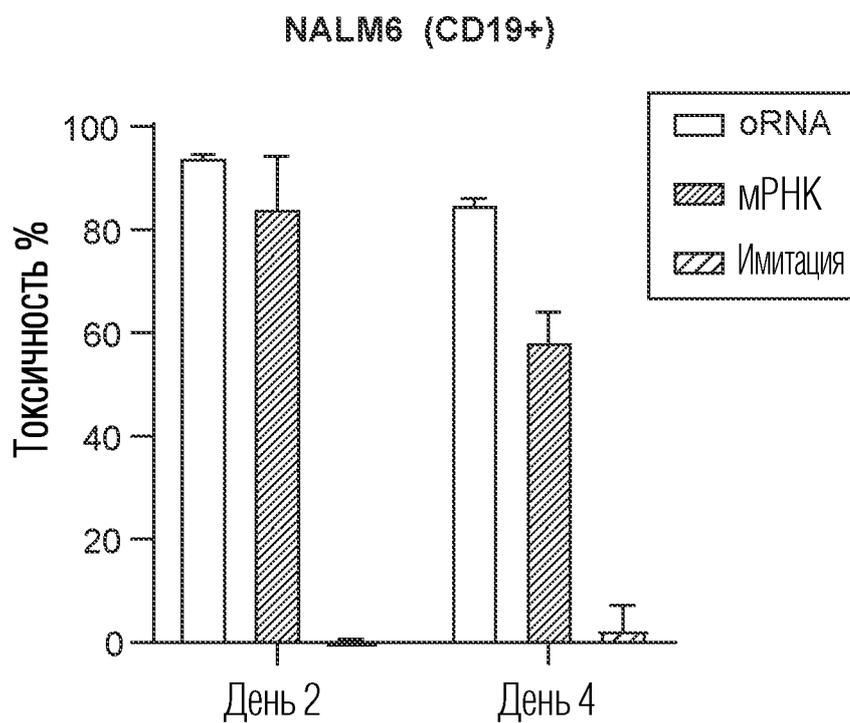


ФИГ. 42А

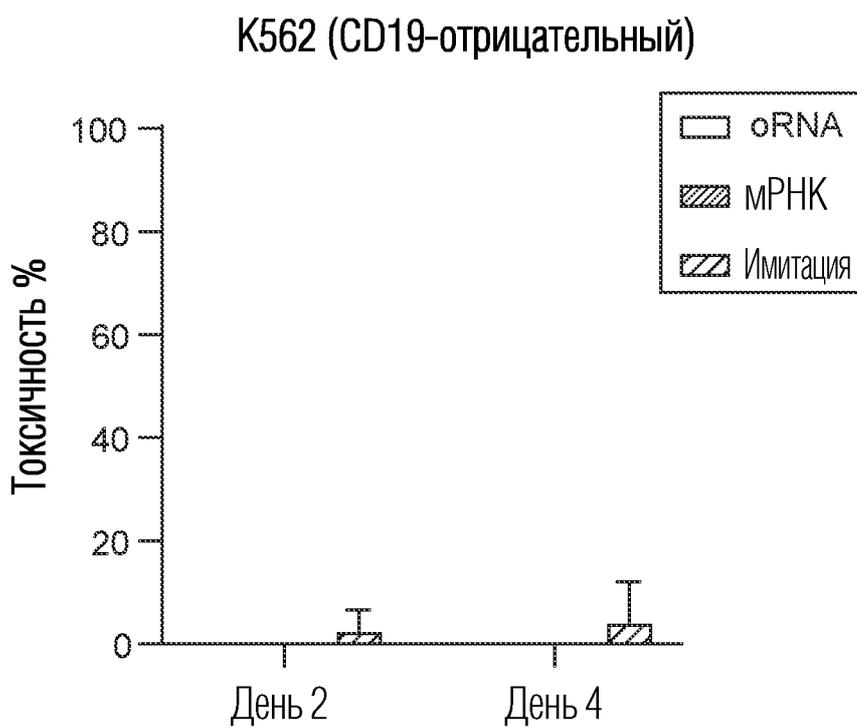
CD19 CAR экспрессия



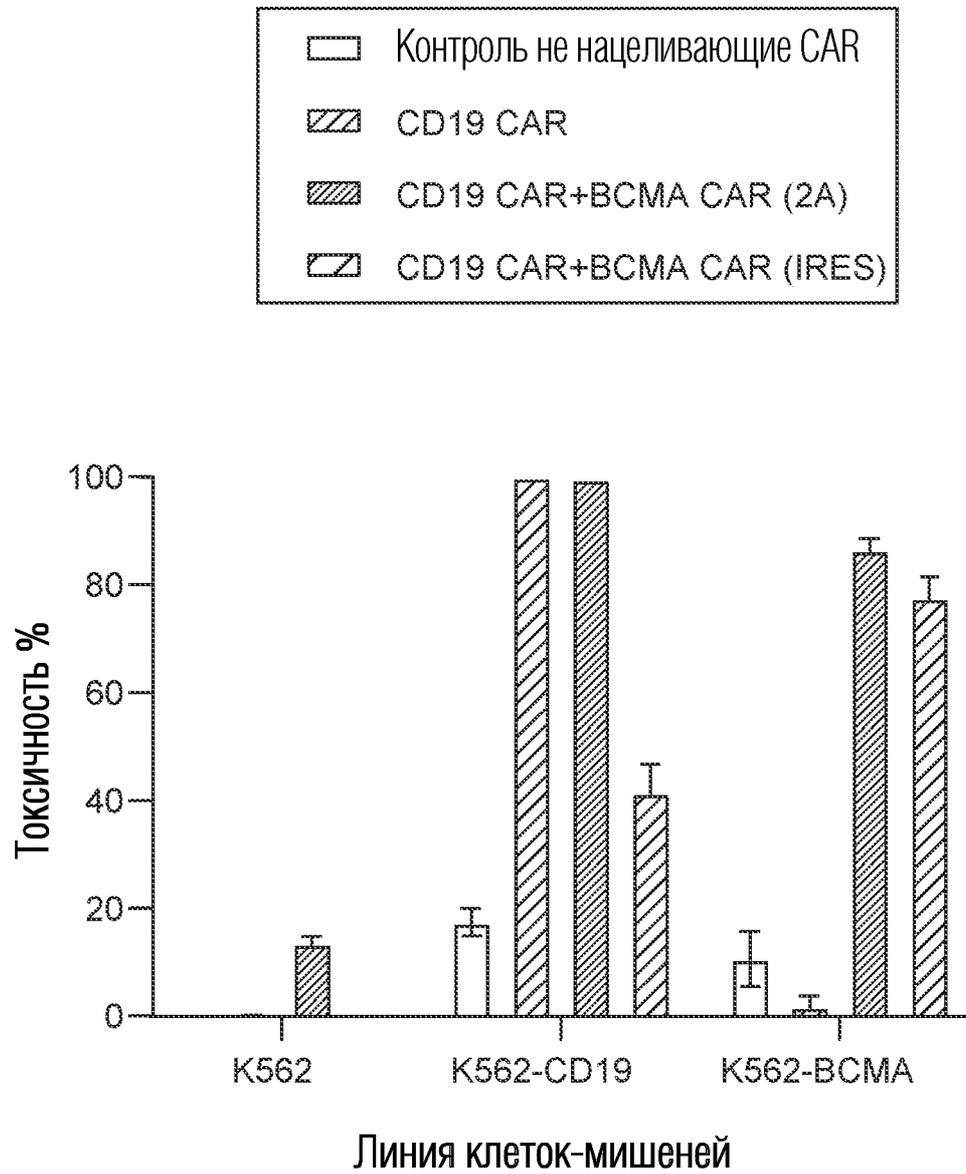
ФИГ. 42В



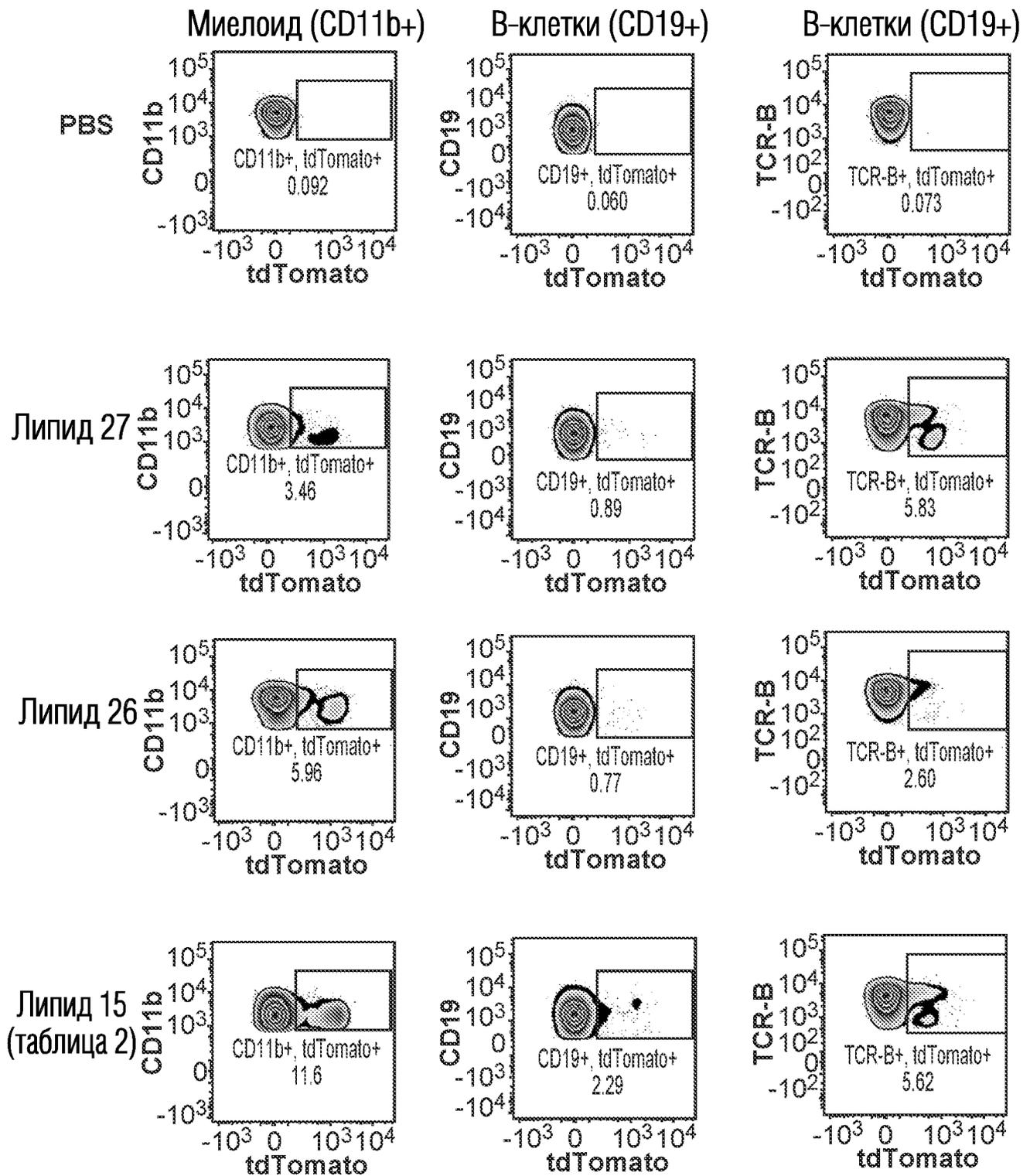
ФИГ. 43А



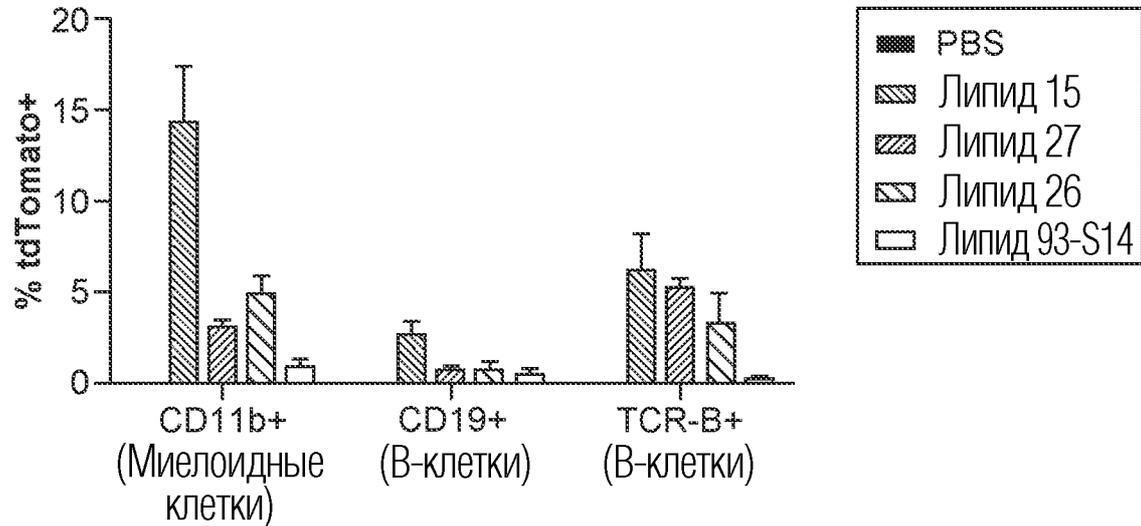
ФИГ. 43В



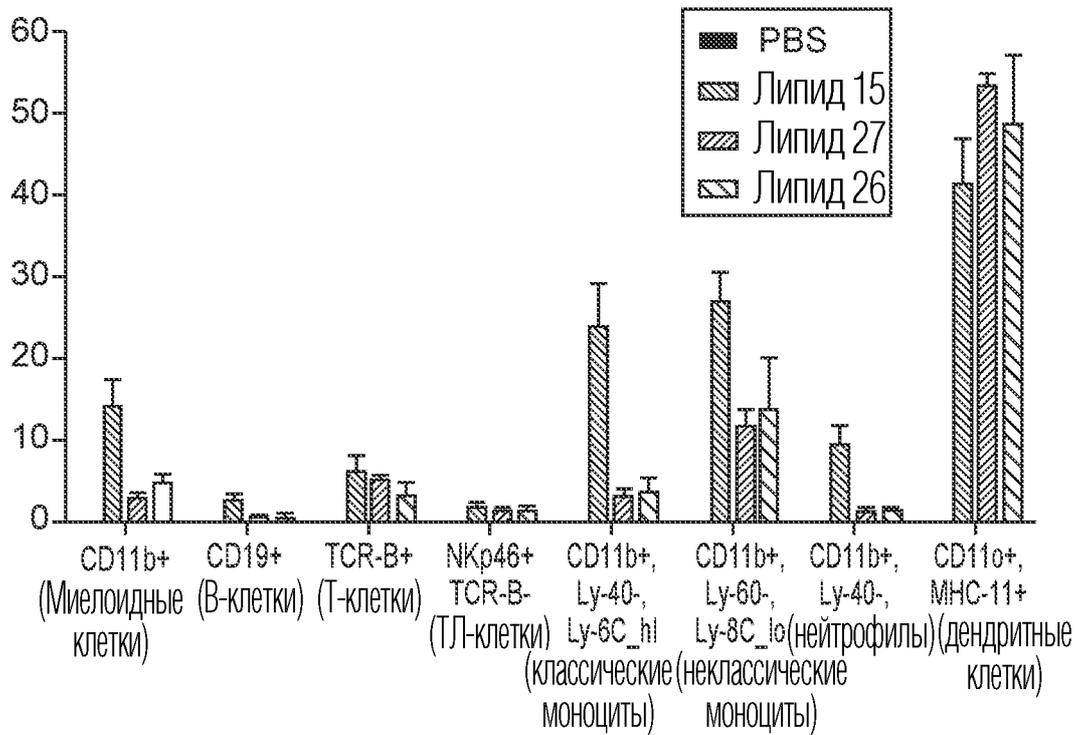
ФИГ. 44



ФИГ. 45А

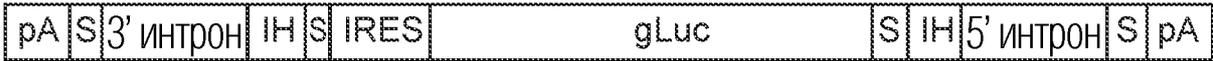


ФИГ. 45В

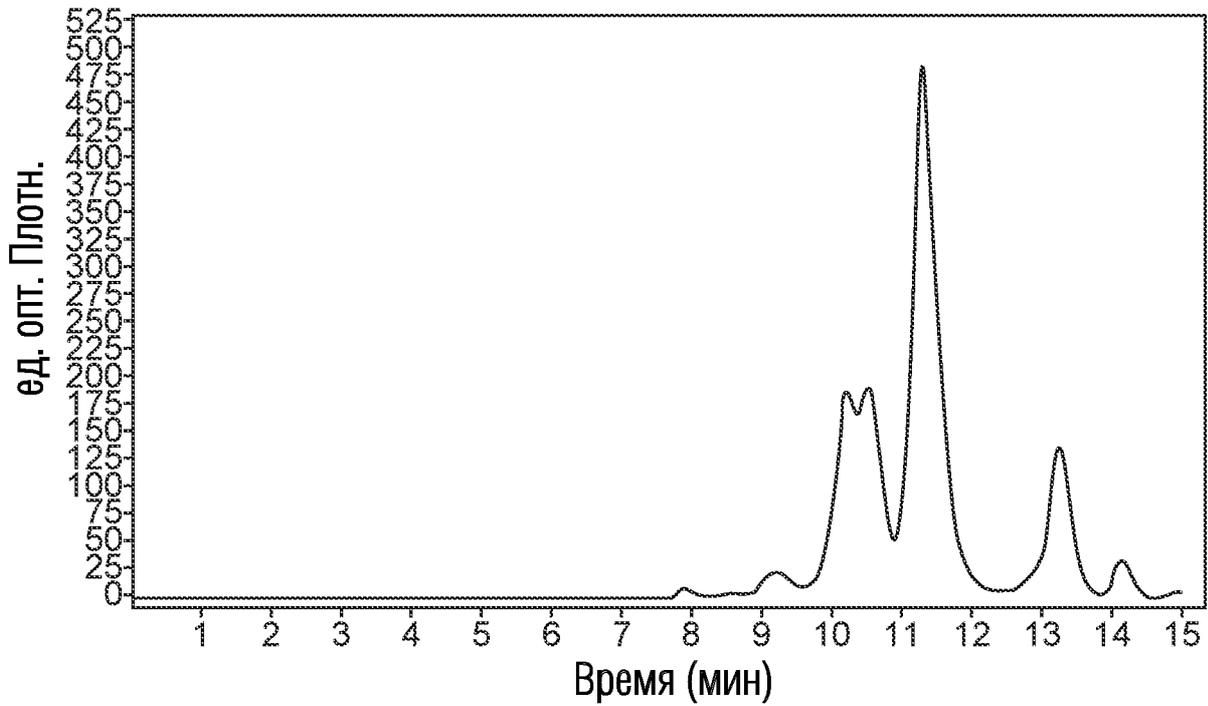


ФИГ. 45С

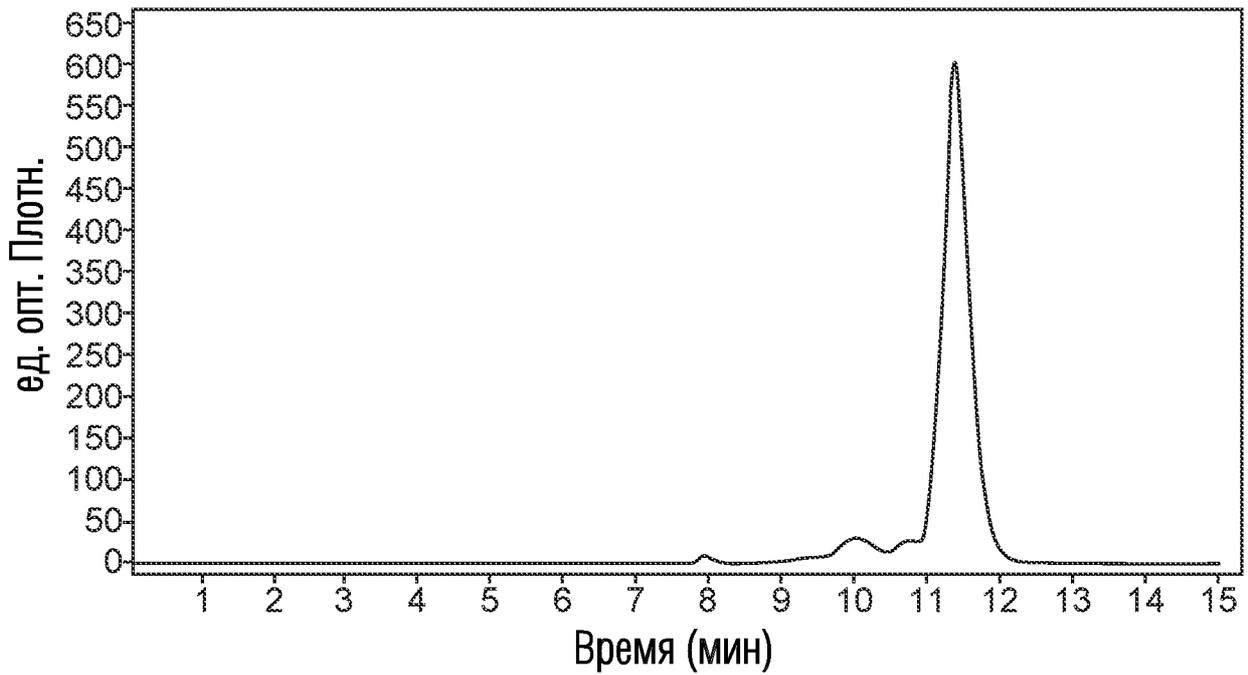
65/88



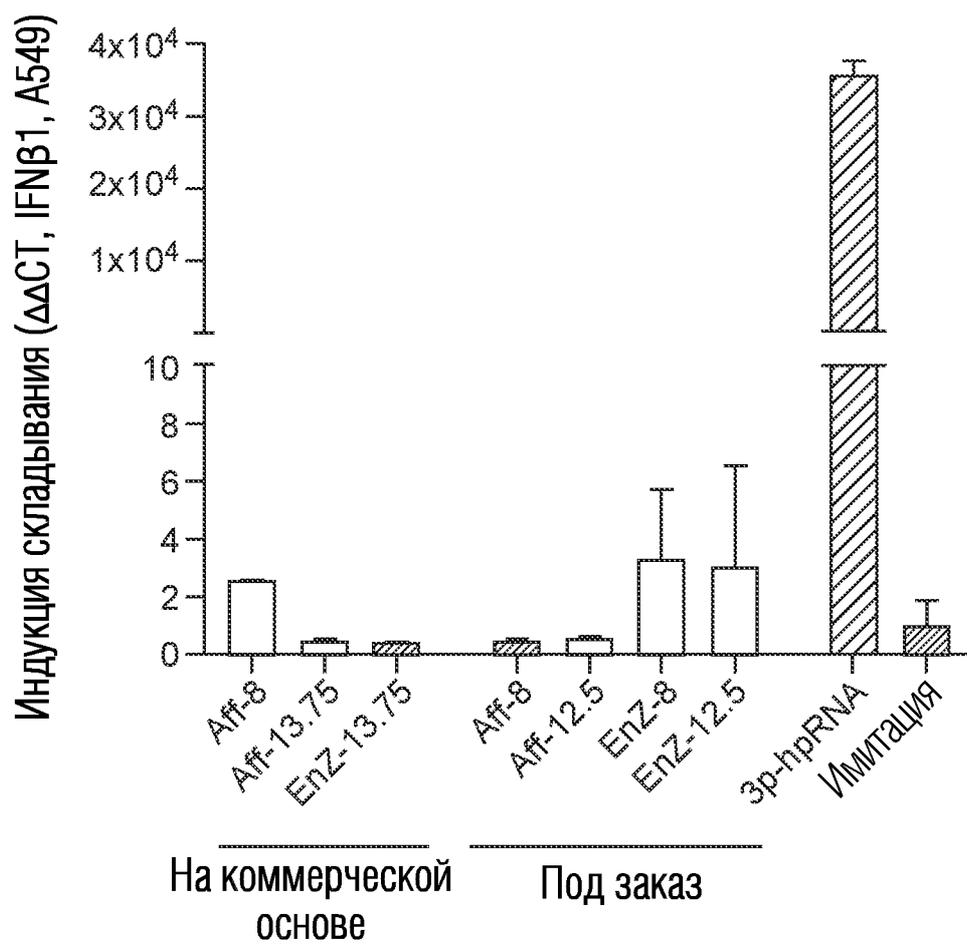
ФИГ. 46А



ФИГ. 46В



ФИГ. 46С

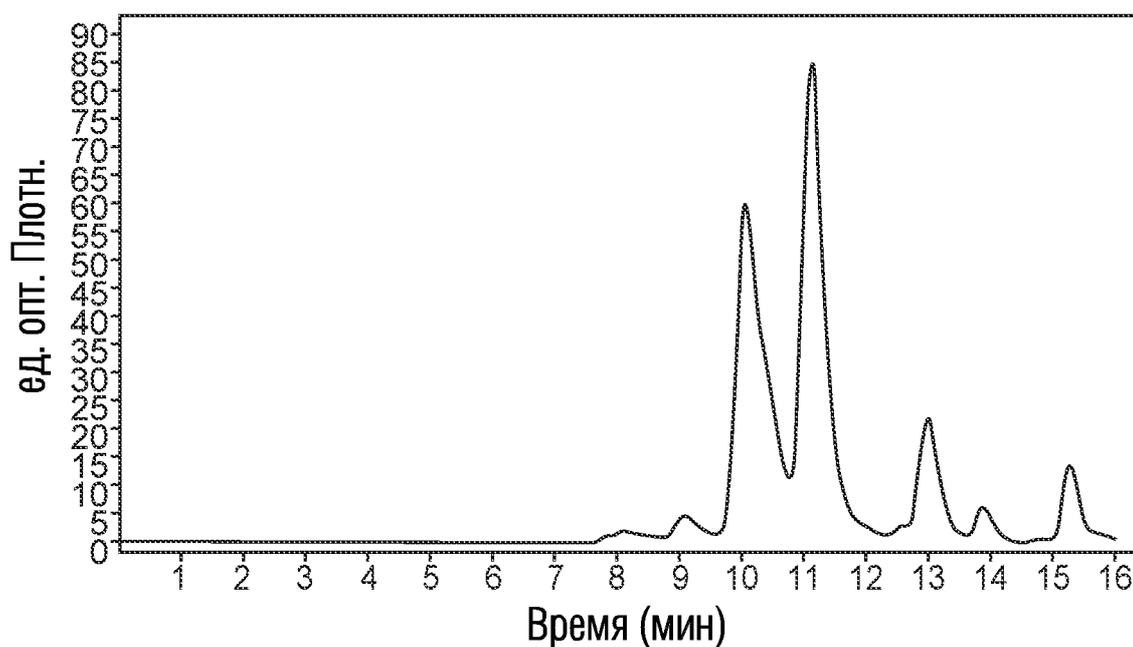


ФИГ. 46D

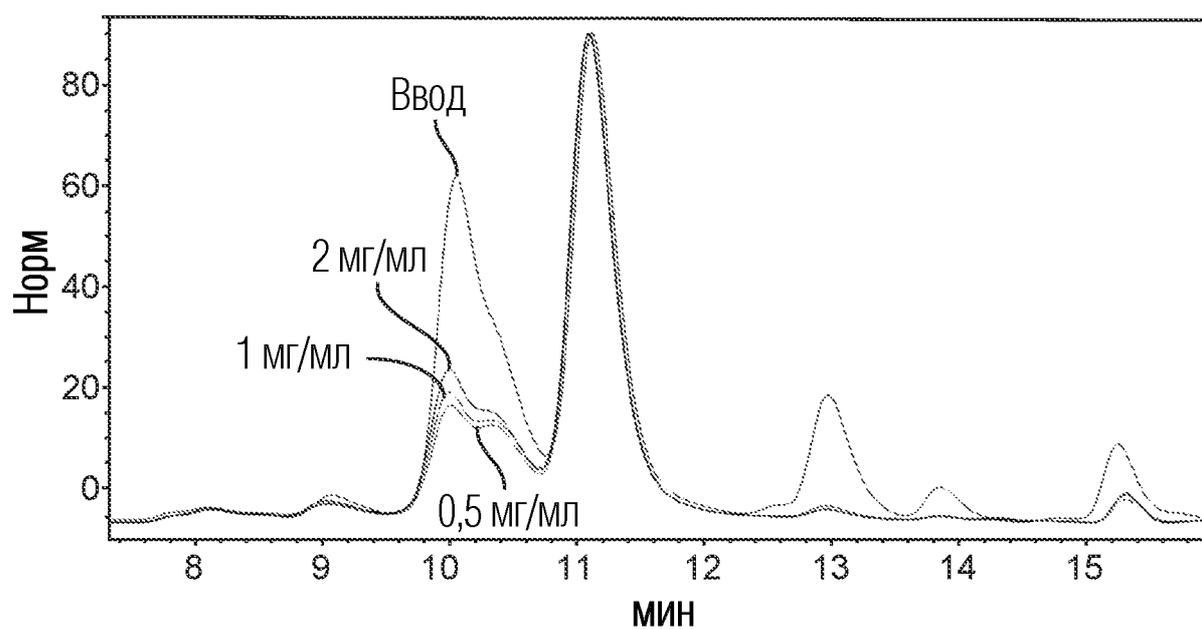
DBS	S	3'интрон	ИН	S	IRES	Кодирующая область	S	ИН	5'интрон	S	DBS
-----	---	----------	----	---	------	--------------------	---	----	----------	---	-----

ТАТААТТСТАСССТАТТГАГГСАТТГАСТА

ФИГ. 47А

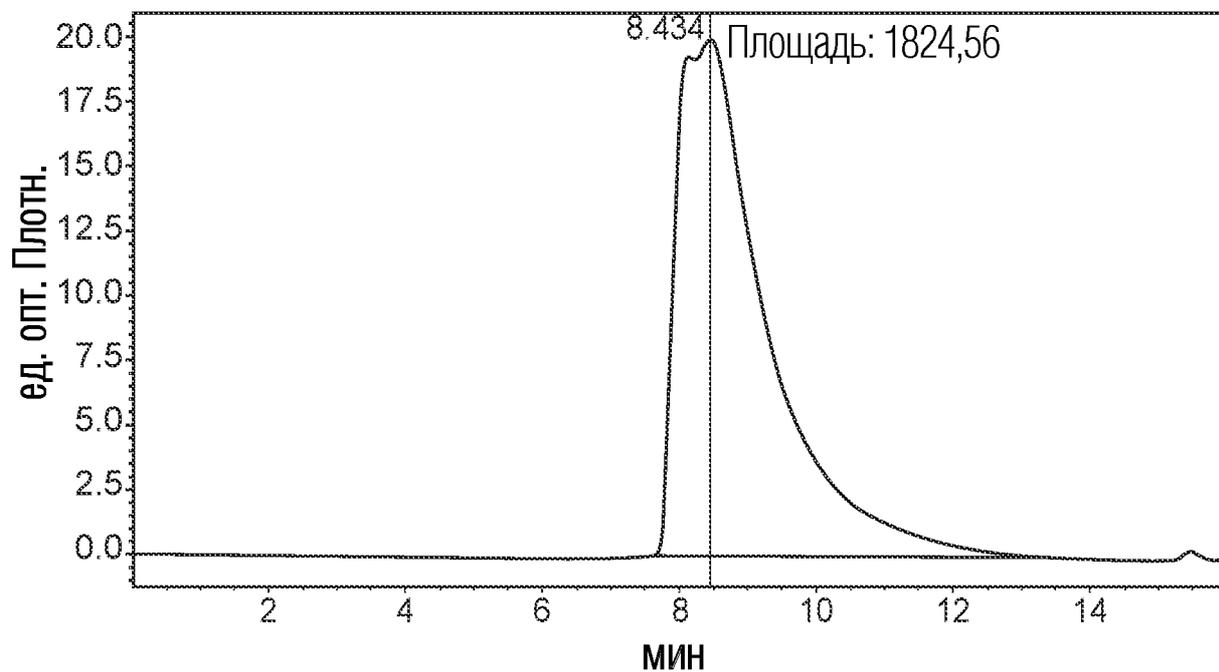


ФИГ. 47В



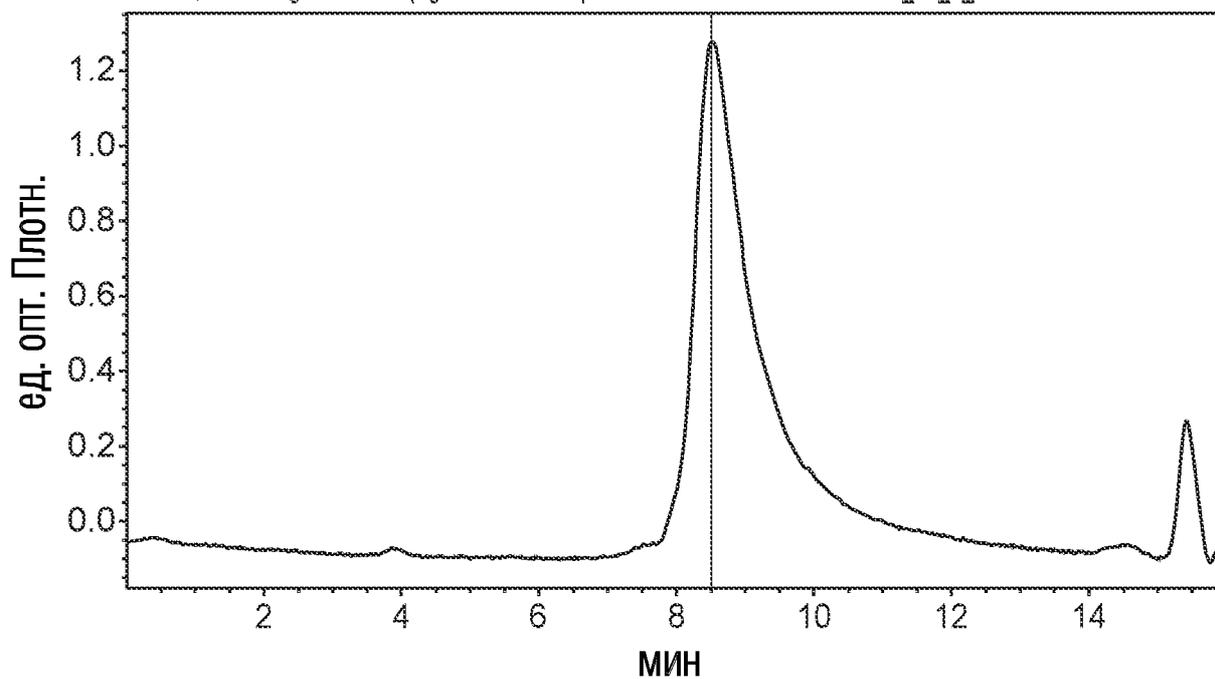
ФИГ. 47С

68/88

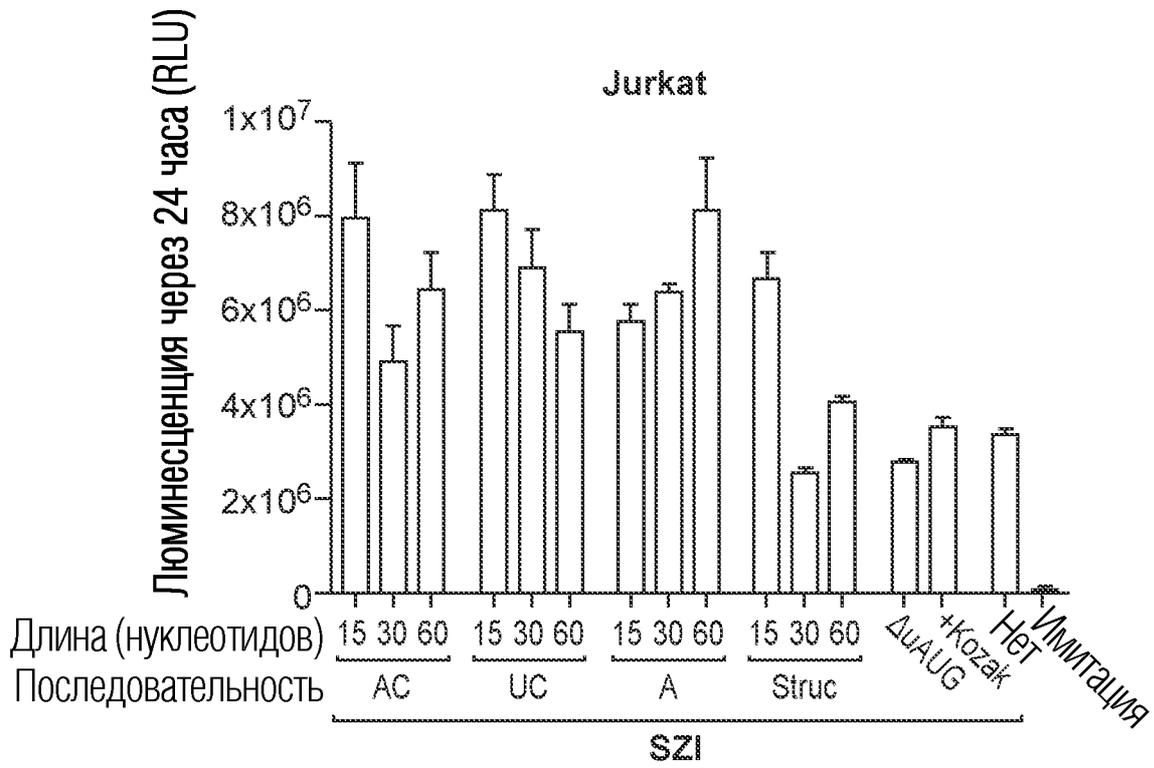


ФИГ. 48А

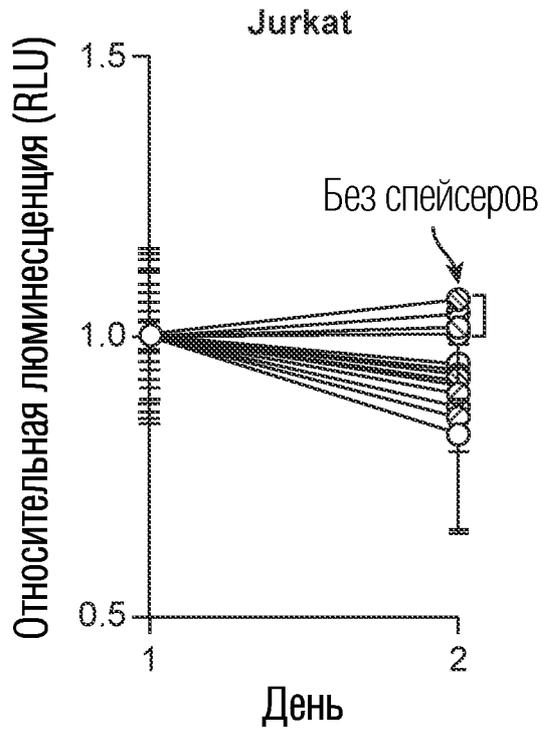
VWD1 A, Wavelength=280 nm (Agilent\Ba...A Sequence 2020-04-22 12-48-18\654B_dT_2_enz2020-04-2214-13-16.D)



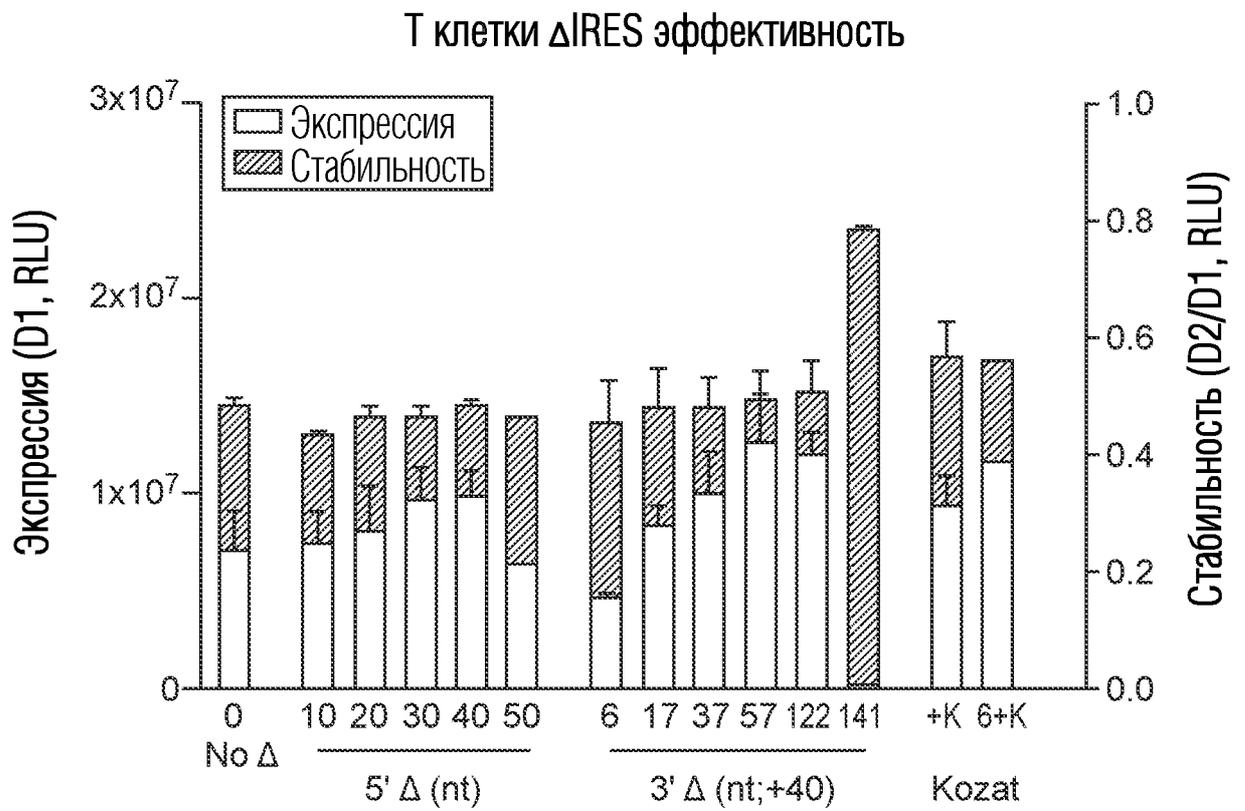
ФИГ. 48В



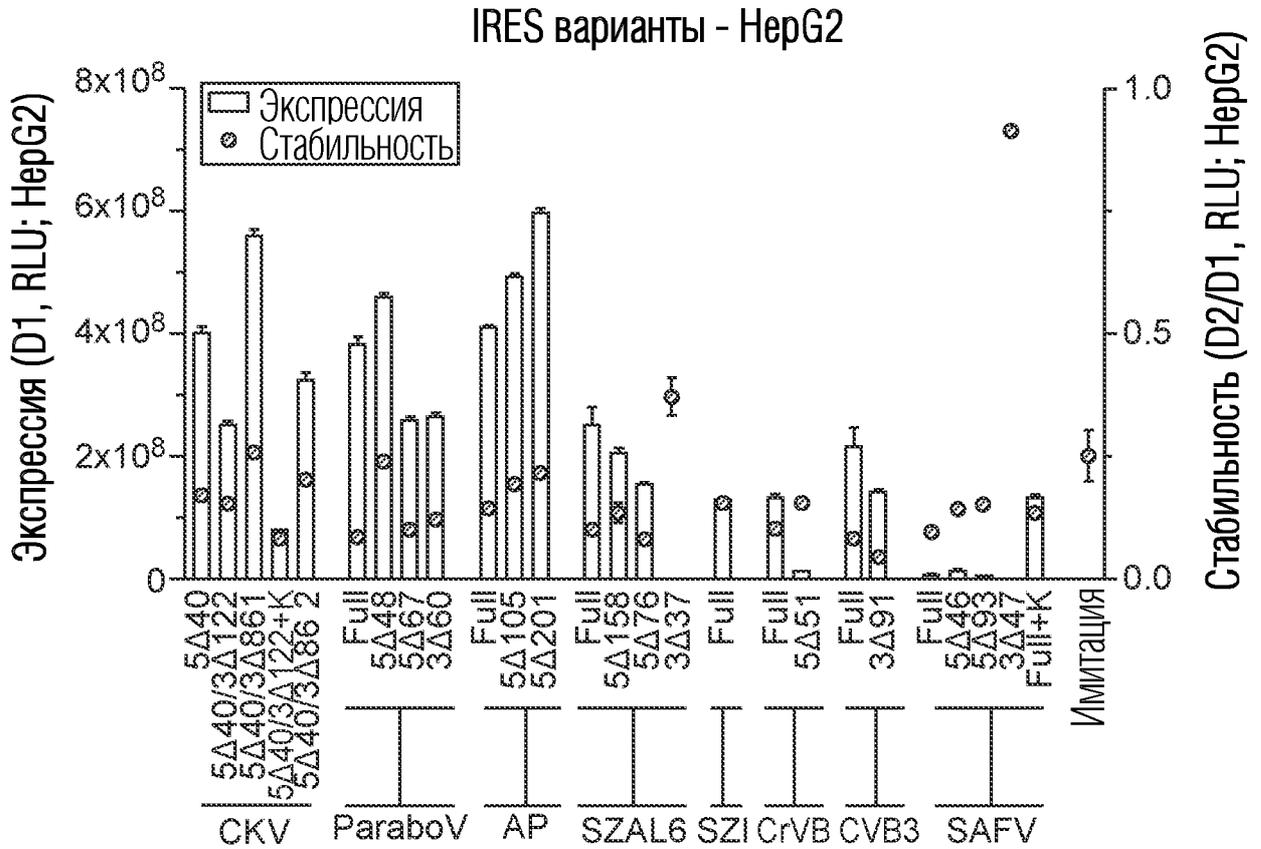
ФИГ. 49А



ФИГ. 49В

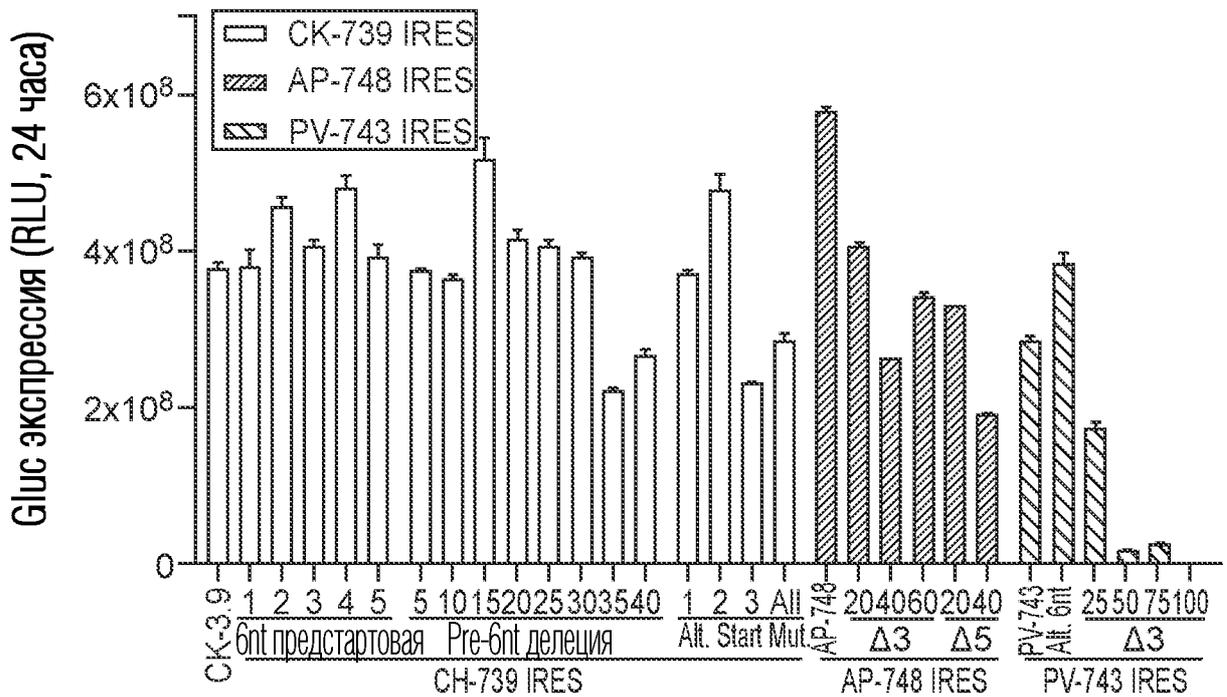


ФИГ. 50

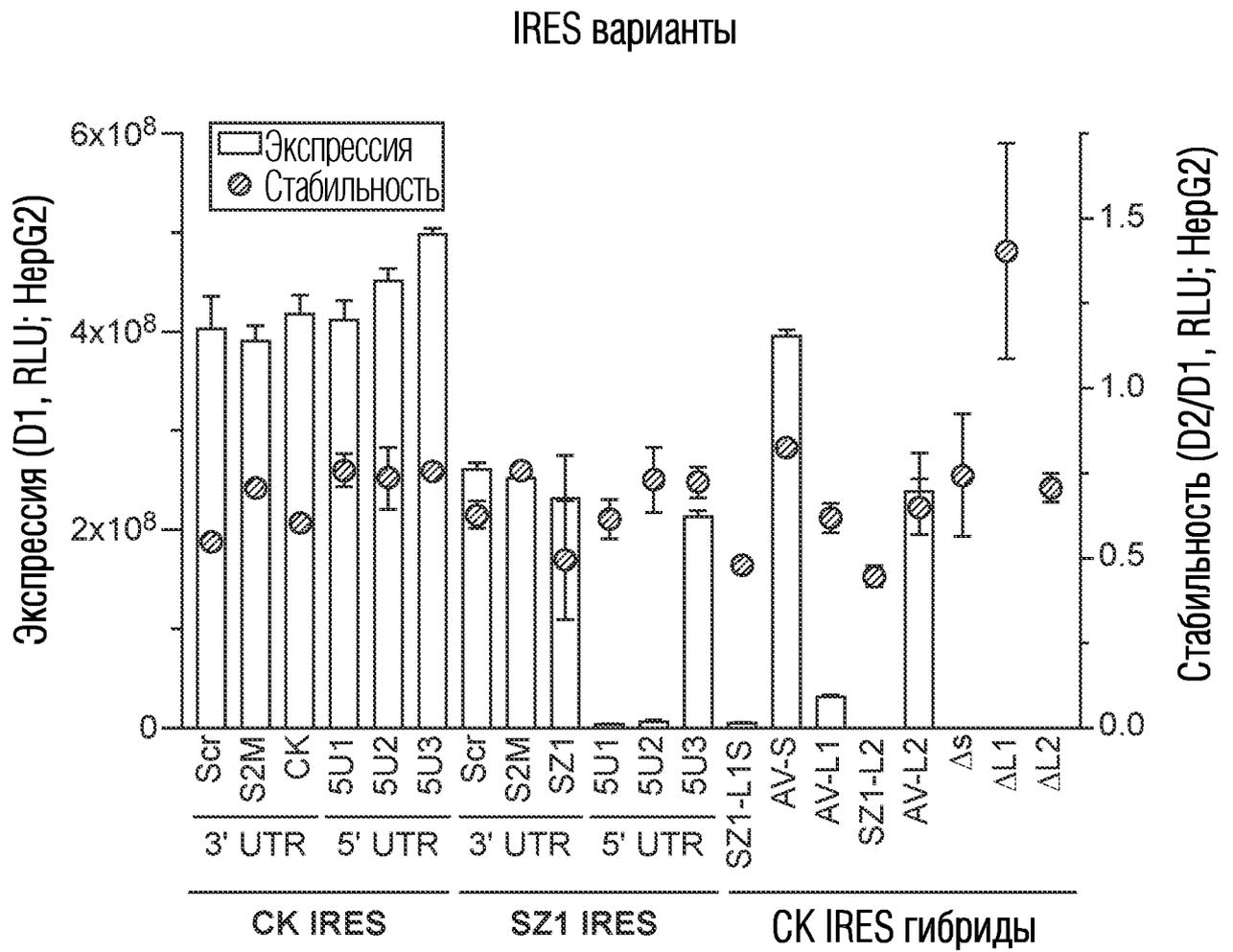


ФИГ. 51

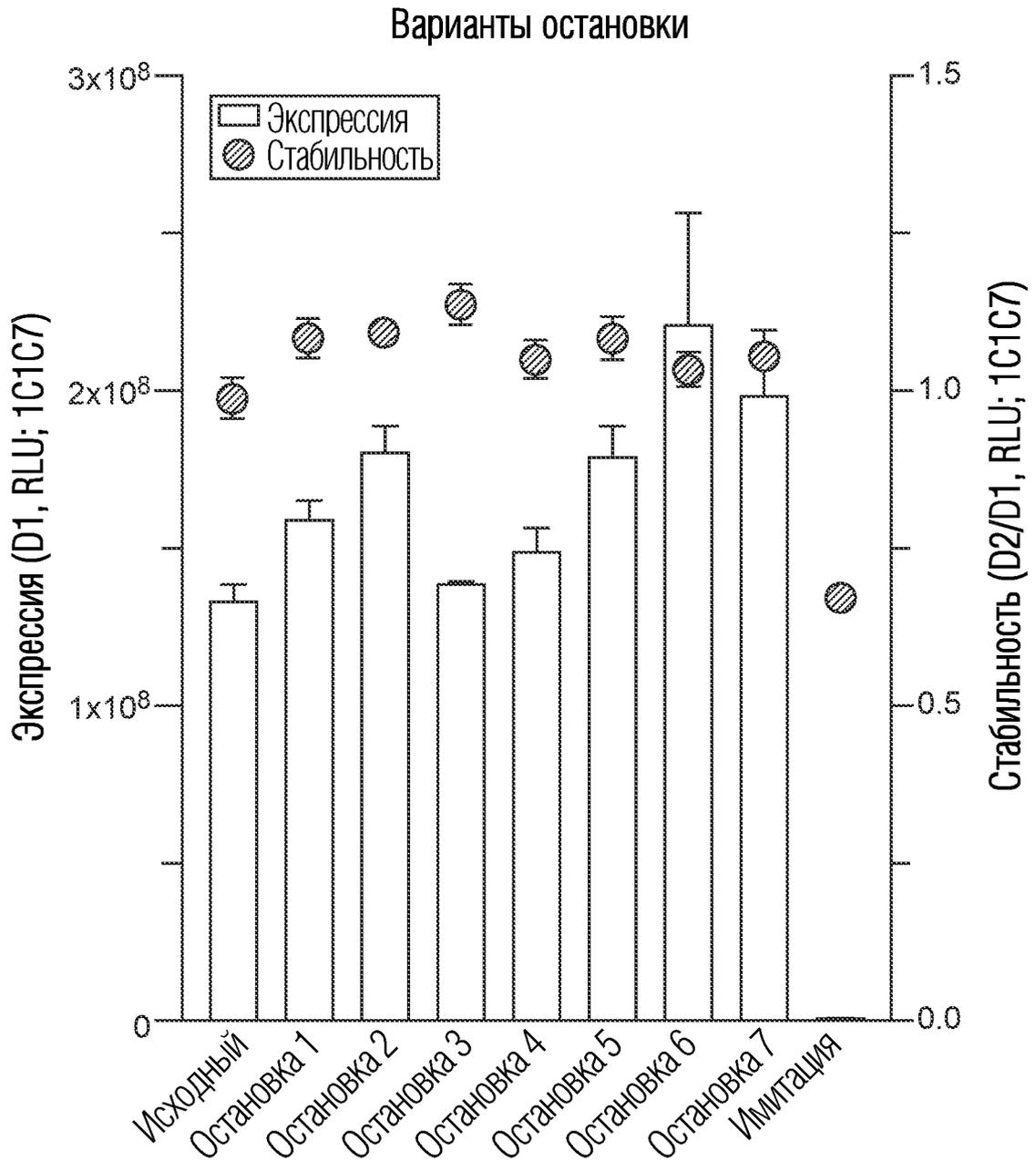
oRNA Экспрессия 1C1C7



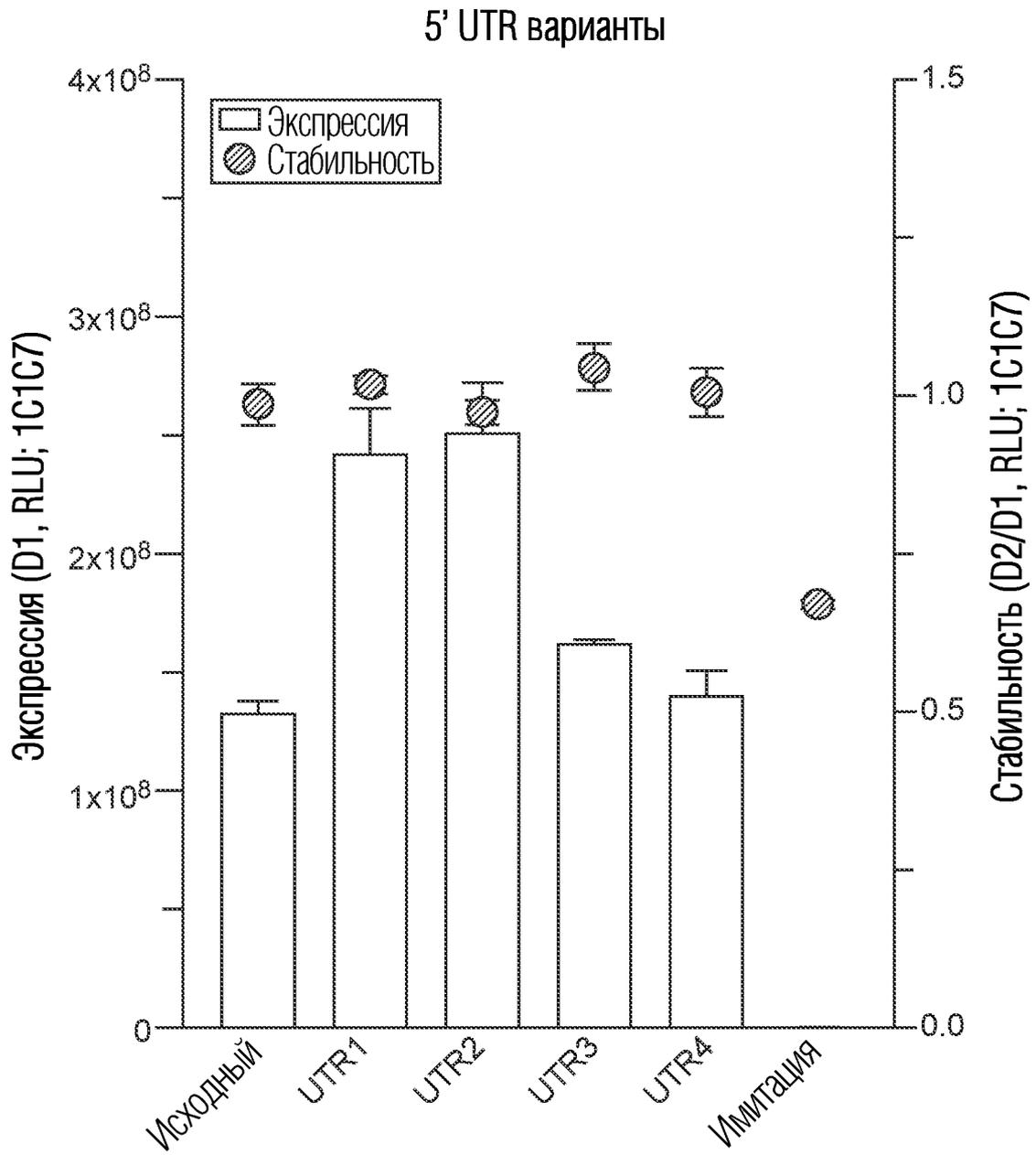
ФИГ. 52



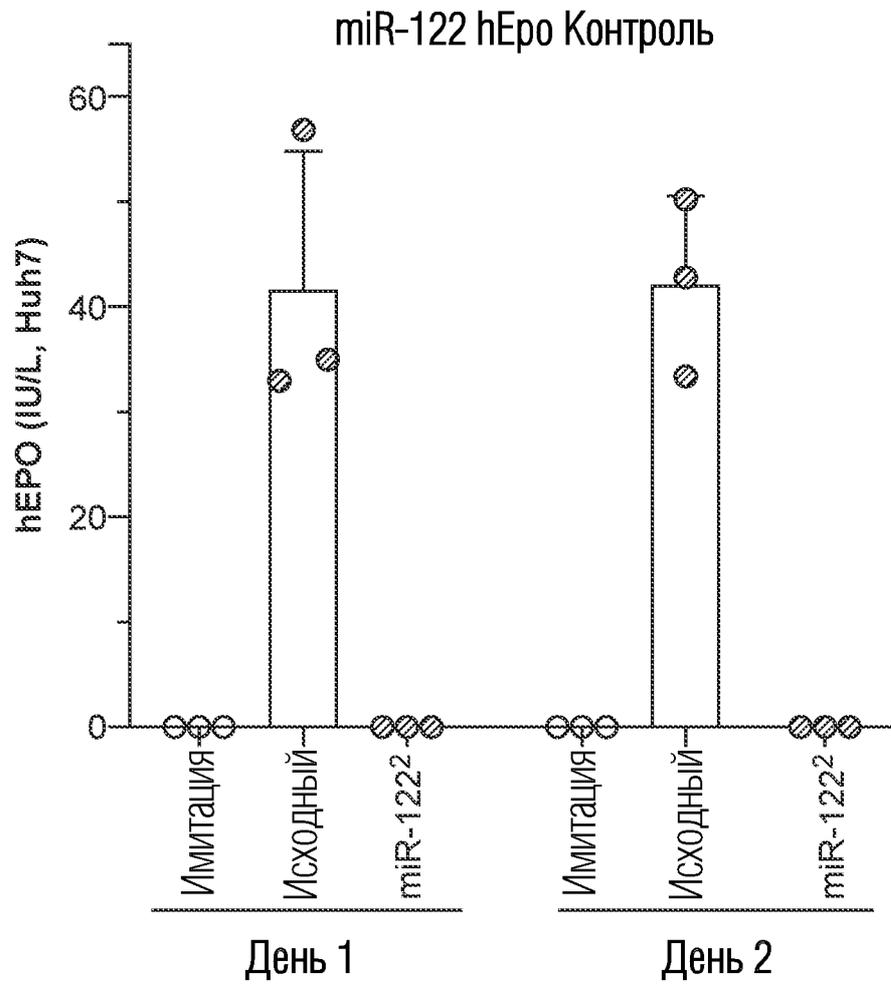
ФИГ. 53



ФИГ. 54

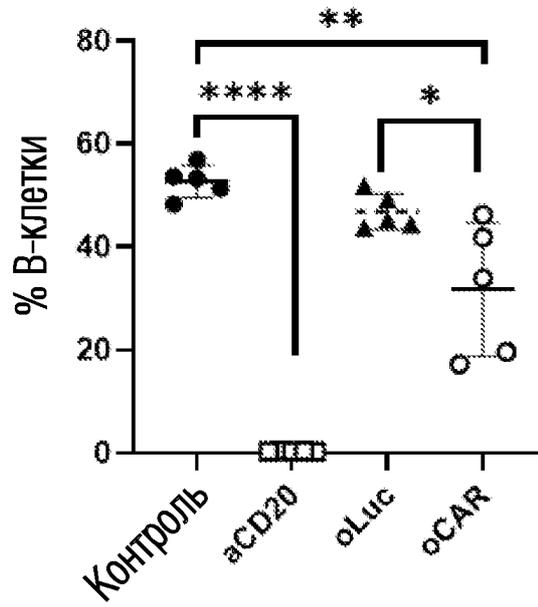


ФИГ. 55



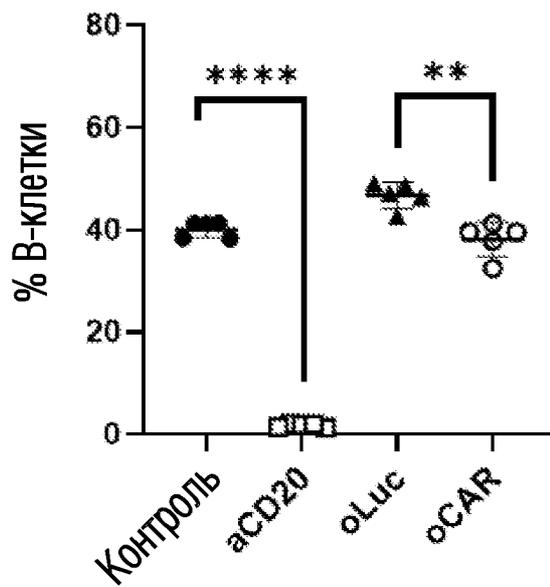
ФИГ. 56

Периферическая кровь

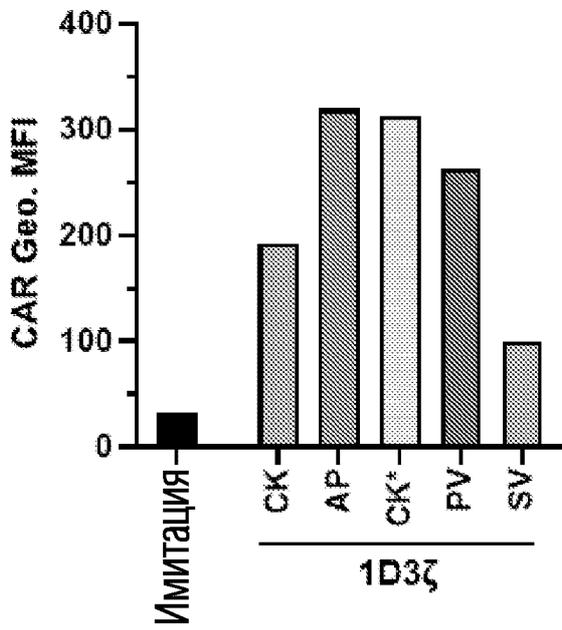


ФИГ. 57А

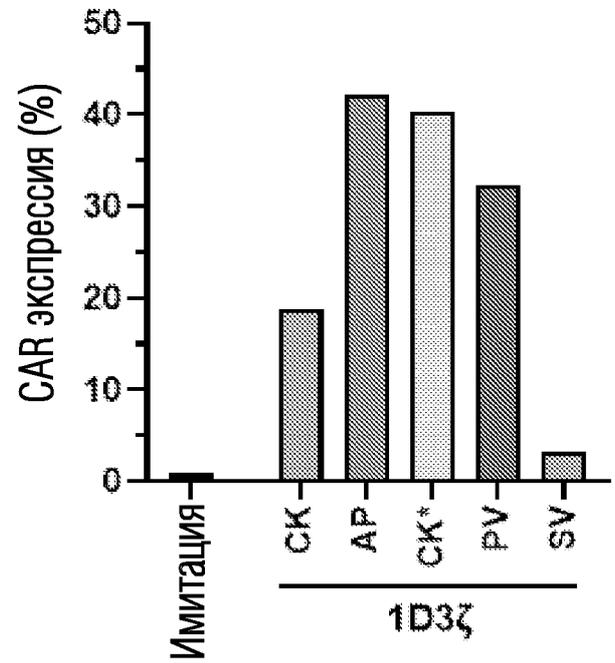
Селезенка



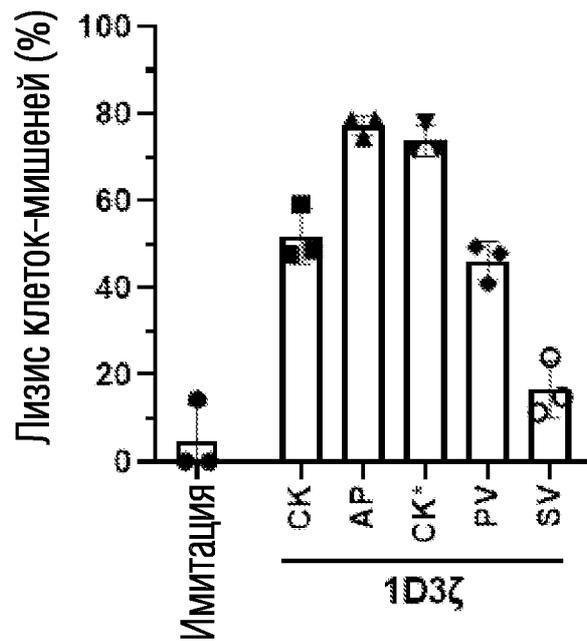
ФИГ. 57В



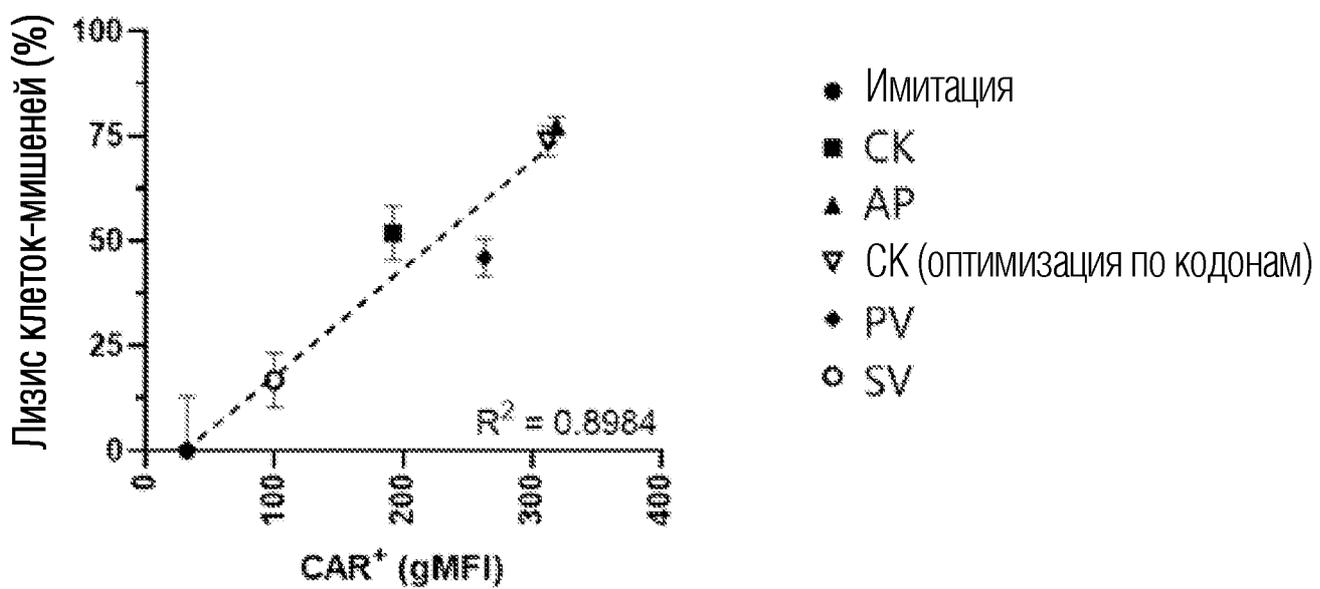
ФИГ. 58А



ФИГ. 58В



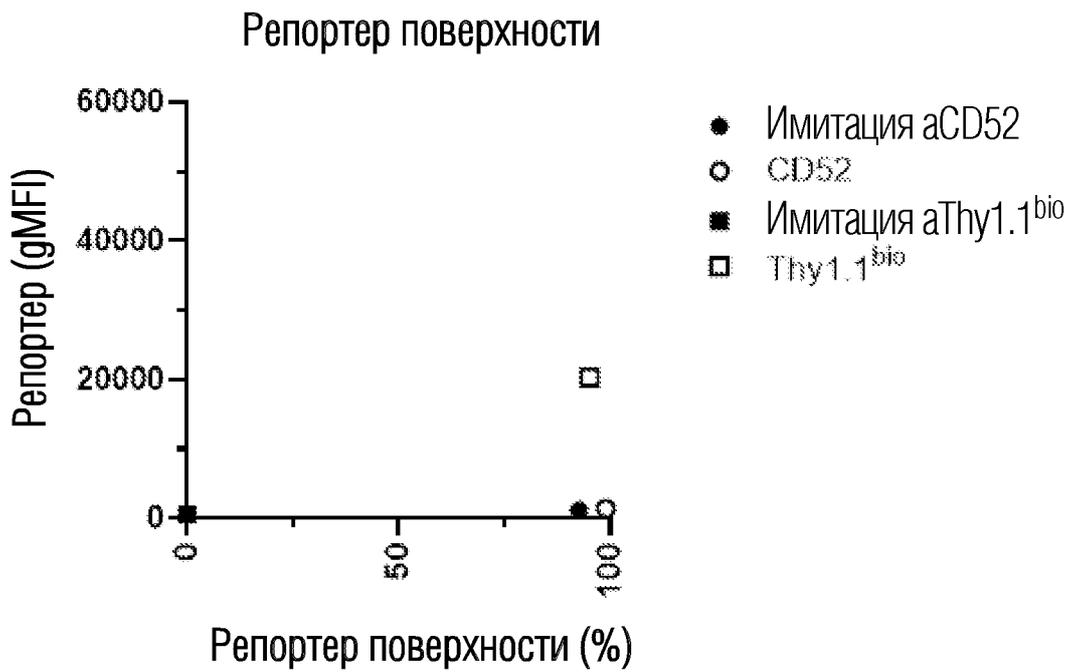
ФИГ. 58С



ФИГ. 59

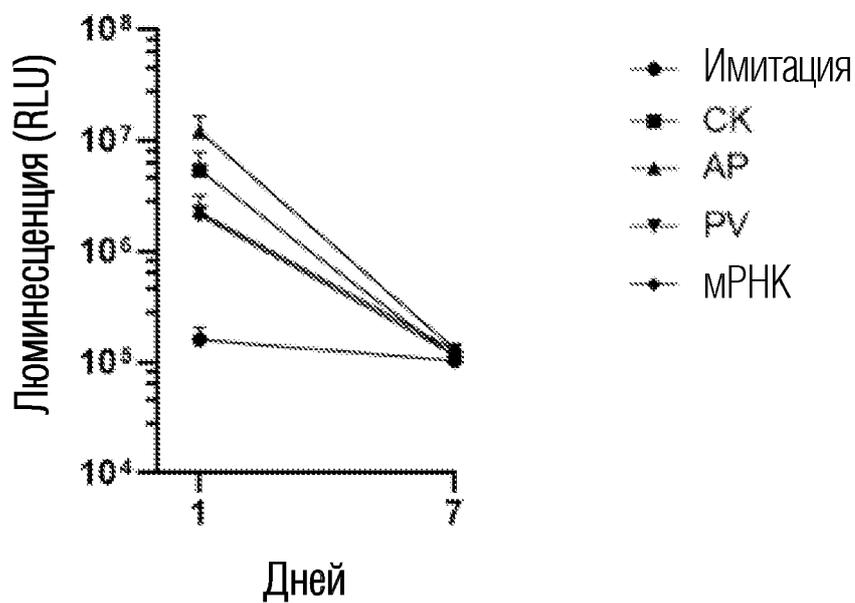


ФИГ. 60А



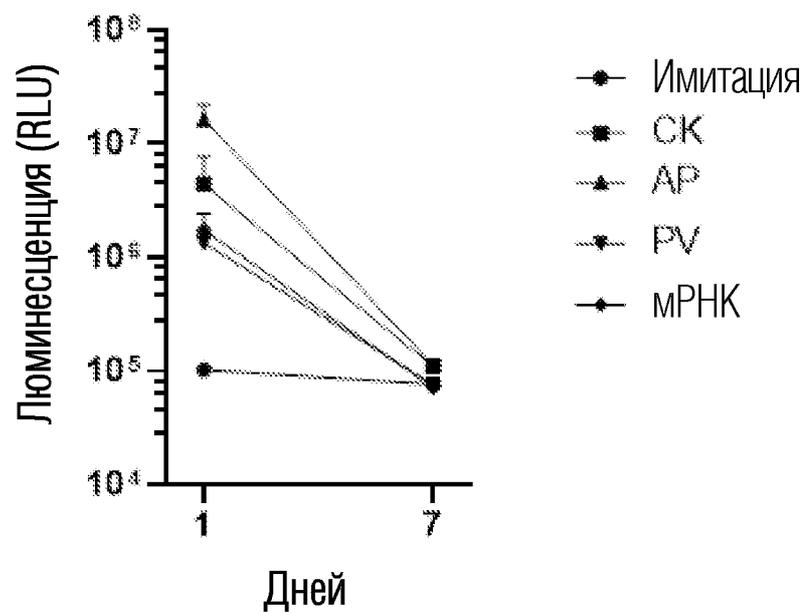
ФИГ. 60В

Донор А



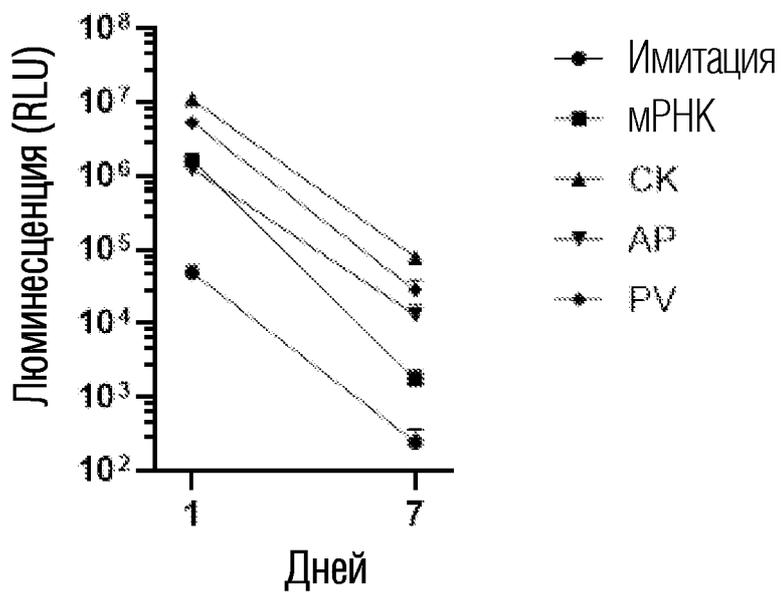
ФИГ. 61А

Донор В



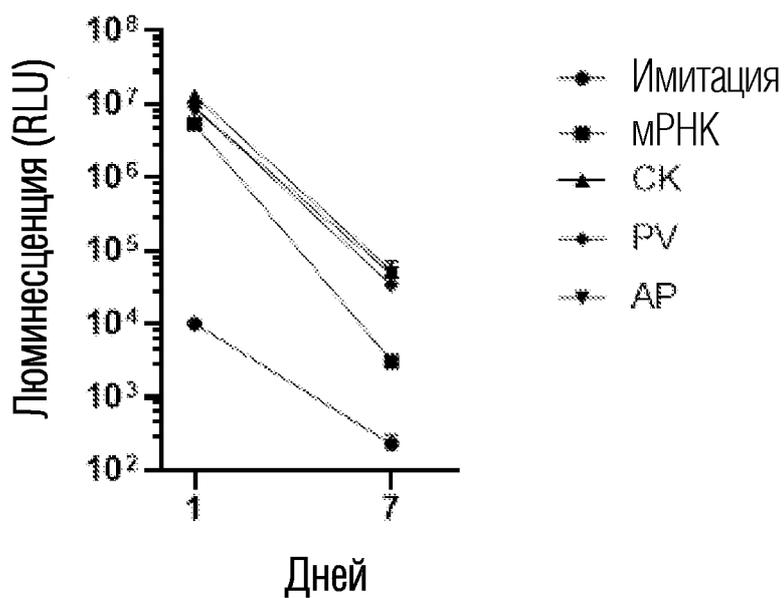
ФИГ. 61В

Донор А

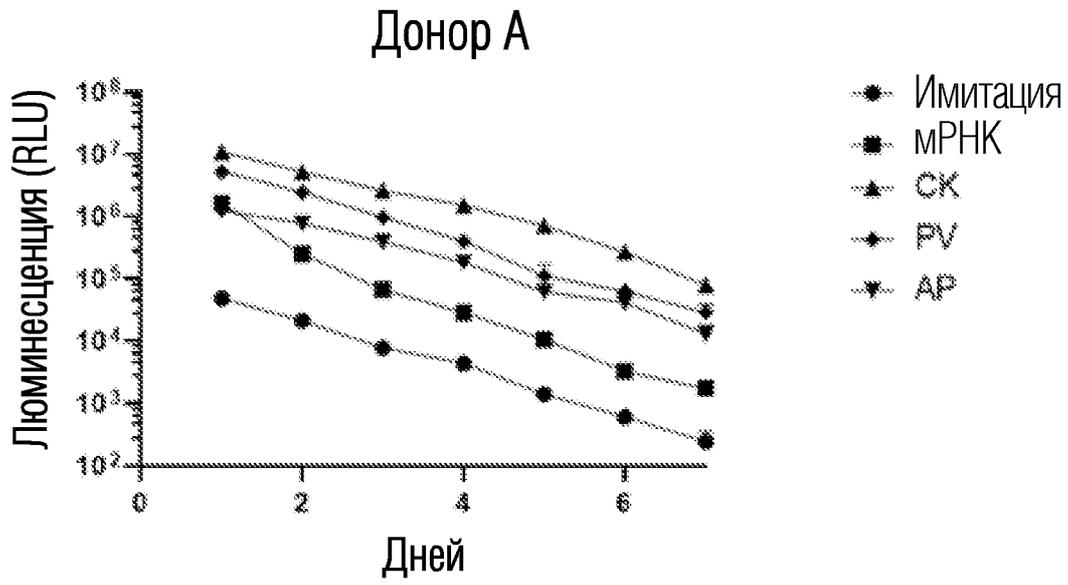


ФИГ. 61С

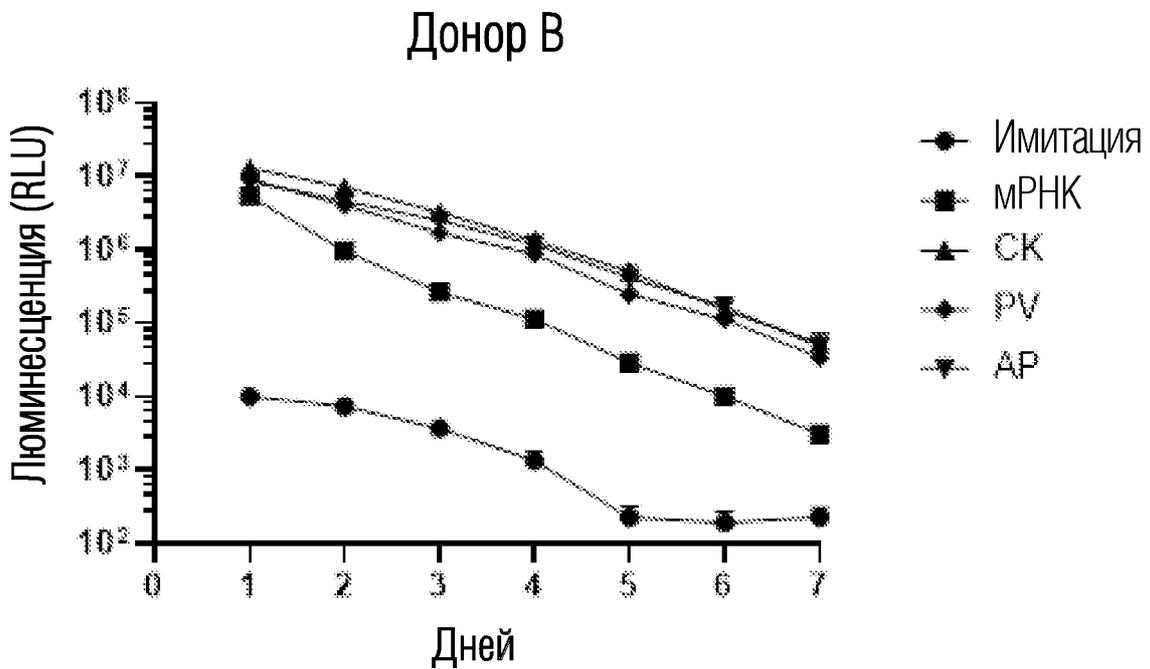
Донор В



ФИГ. 61D

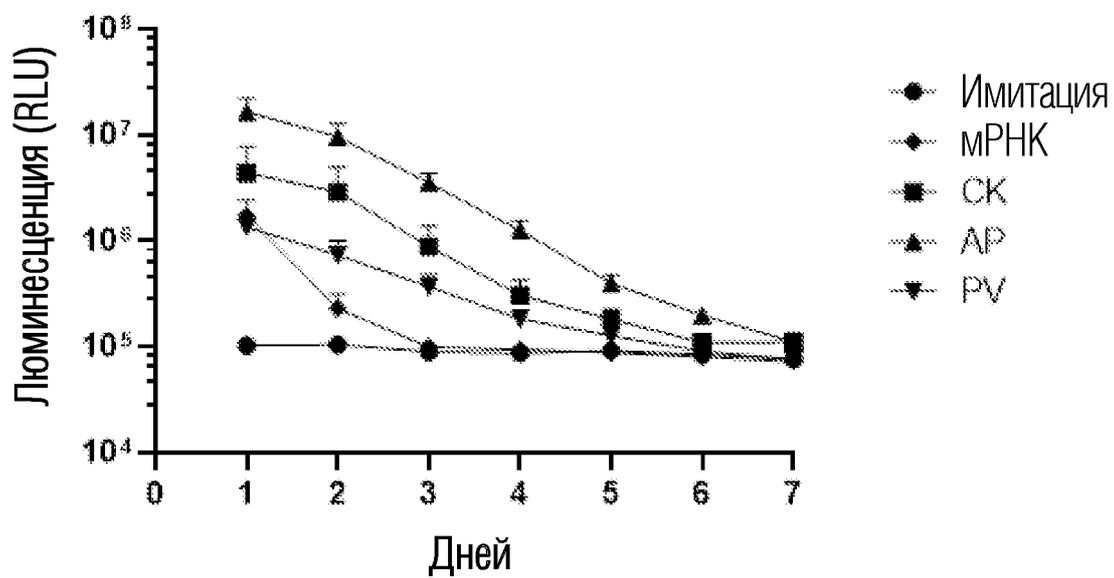


ФИГ. 61Е

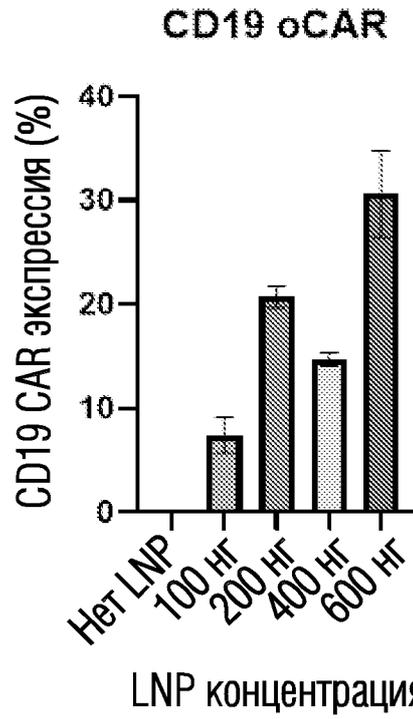


ФИГ. 61F

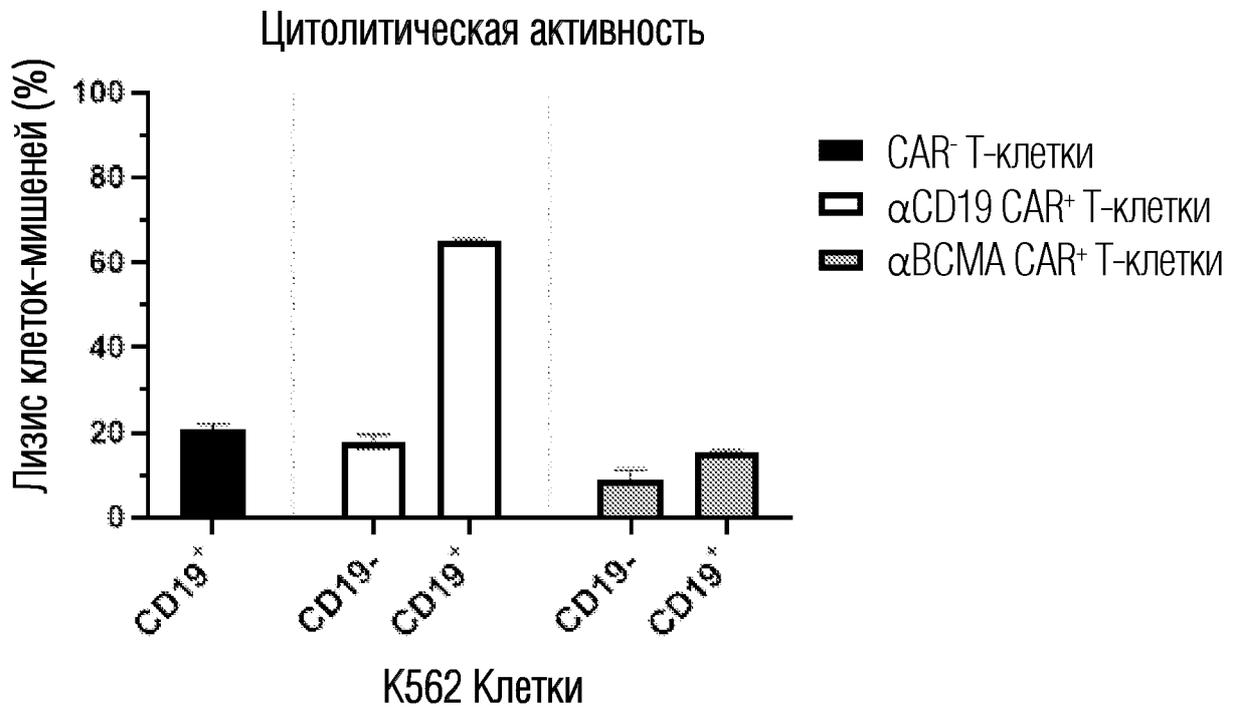
Считывание данных Gluc в активированных Т-клетках
Донор RR10898



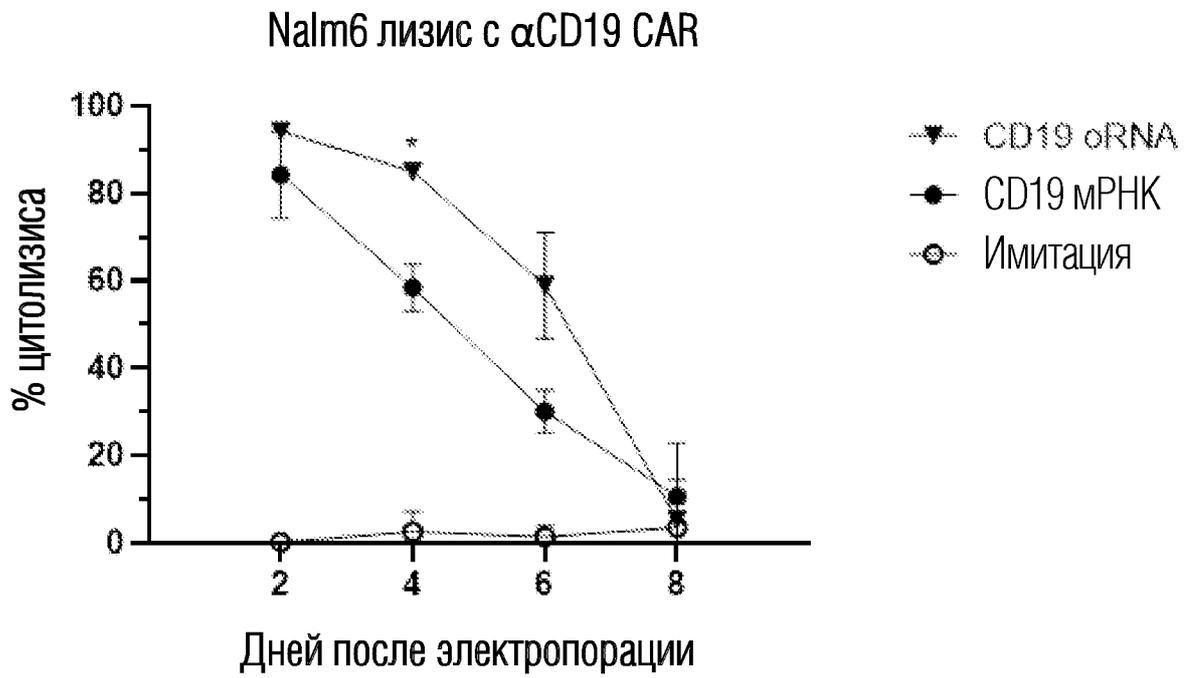
ФИГ. 61G



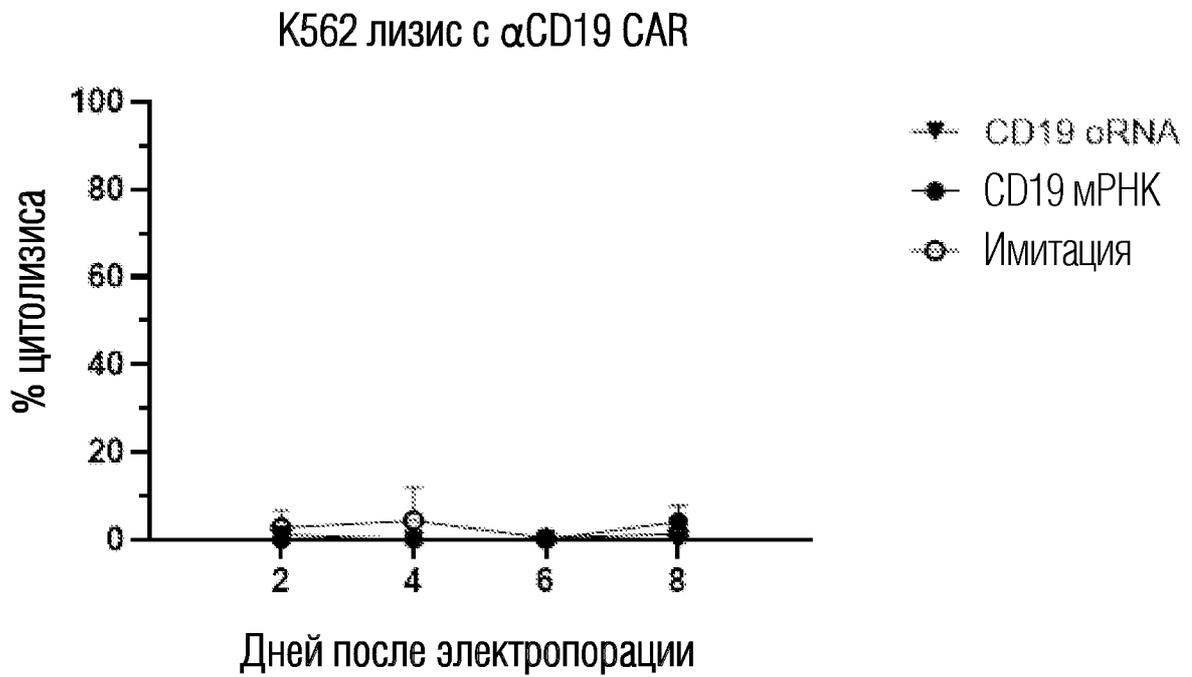
ФИГ. 62А



ФИГ. 62В

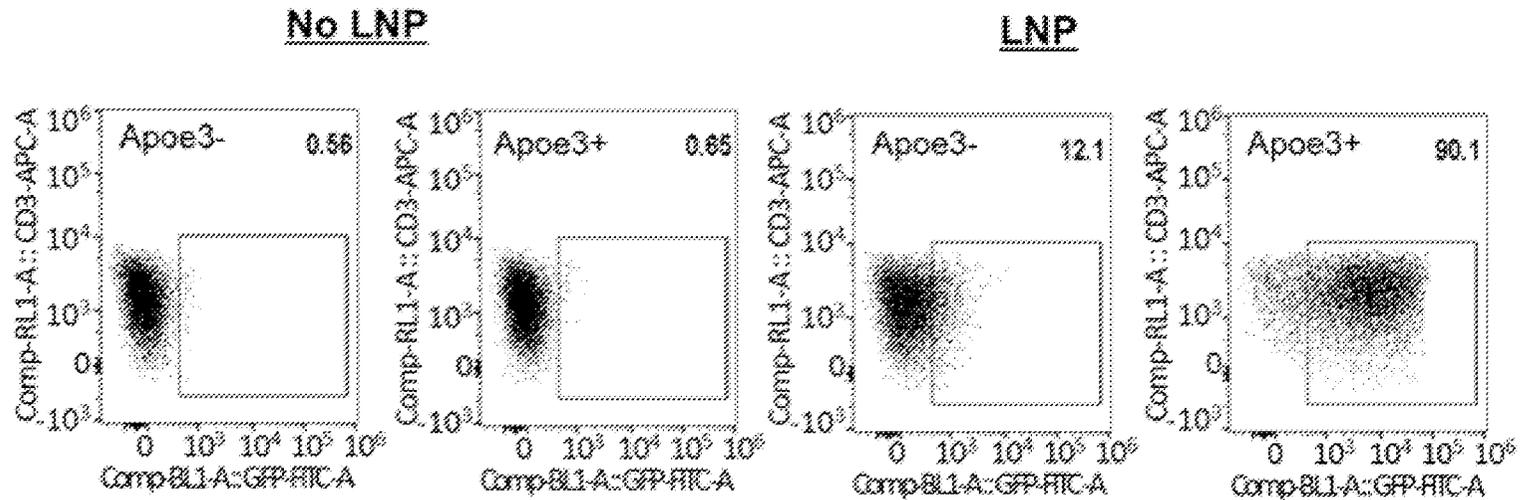


ФИГ. 63А

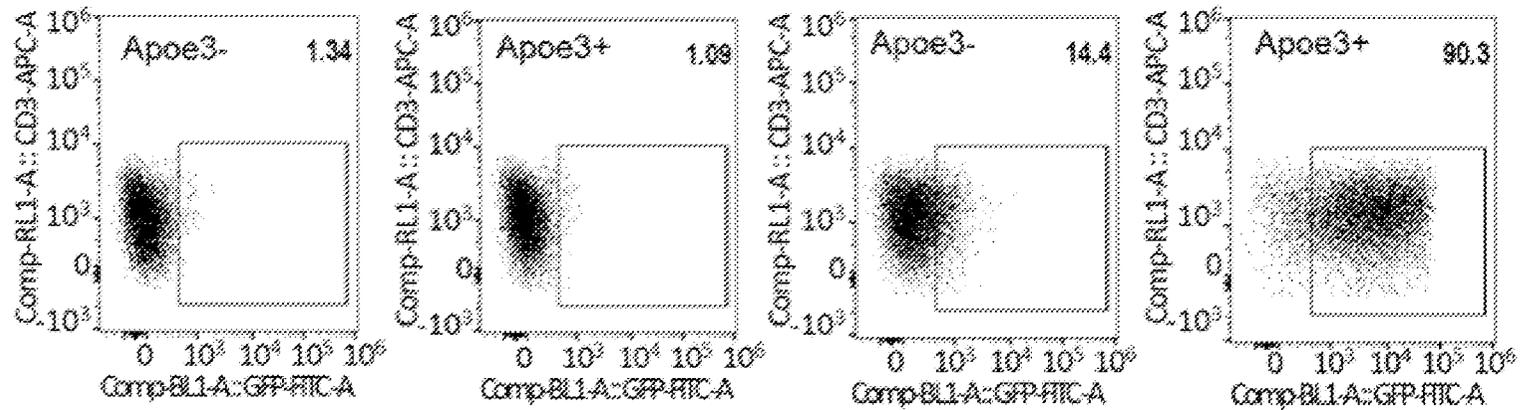


ФИГ. 63В

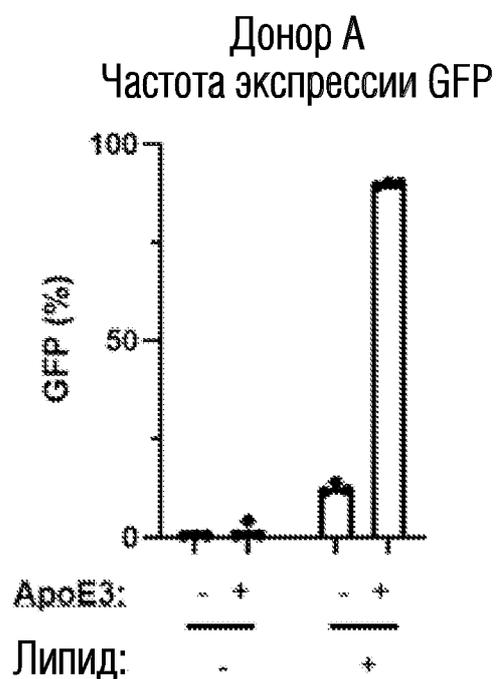
Донор А



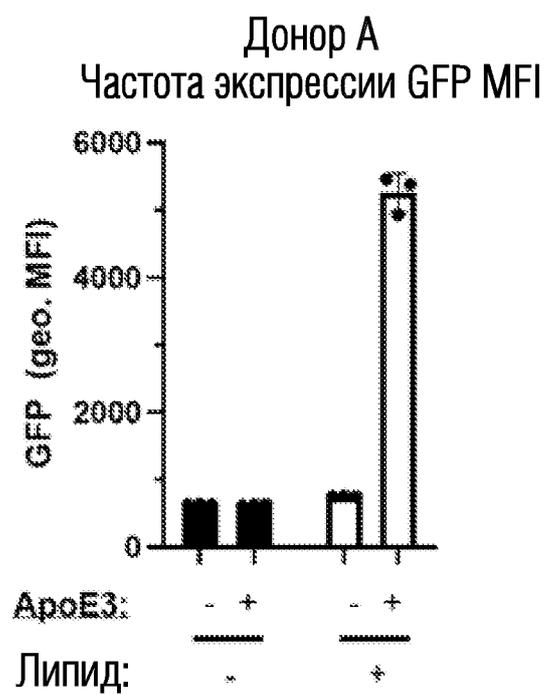
Донор В



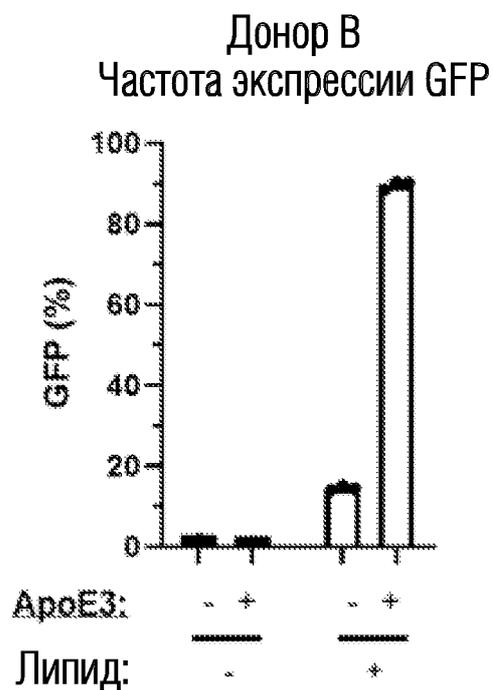
ФИГ. 64А



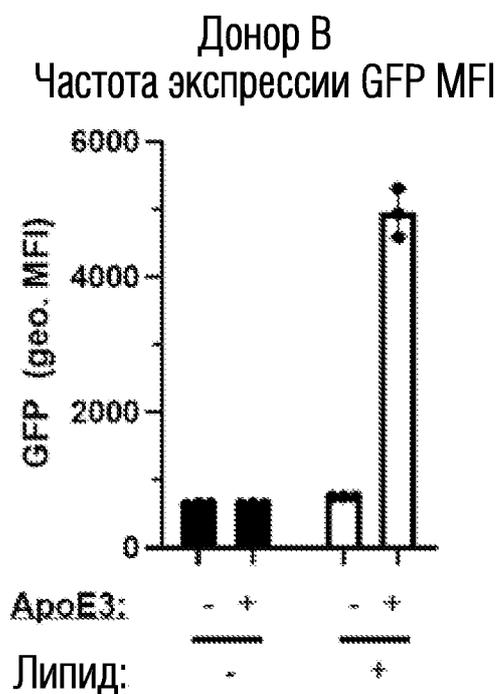
ФИГ. 64В



ФИГ. 64С



ФИГ. 64D



ФИГ. 64E