(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293372 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.10

(22) Дата подачи заявки
2021.05.19

(51) Int. Cl. ***A61K 48/00*** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)
C12N 15/64 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОЛЬЦЕВОЙ РНК

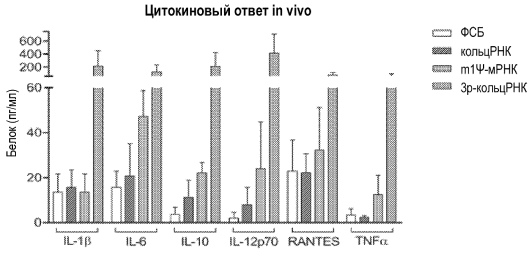
(31) **63/027,292; PCT/US21/31629**
(32) **2020.05.19; 2021.05.10**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/033276**
(87) **WO 2021/236855 2021.11.25**

(71) Заявитель:
ОРНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Вессельхофт Роберт Александр, Барнс Томас, Гудман Брайан, Мотц Грегори, Бекер Эми, Хорхота Аллен Т. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении описаны кольцевая РНК вместе с соответствующими композициями и способами. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК по данному изобретению содержит фрагменты интронов группы I, спейсеры, IRES, дуплексообразующие области и экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах реализации экспрессионная последовательность кодирует антиген. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК по данному изобретению имеет улучшенную экспрессию, функциональную стабильность, иммуногенность, простоту производства и/или время полужизни по сравнению с линейной РНК. В некоторых вариантах реализации способы и конструкции по данному изобретению приводят к повышению эффективности циркуляризации, эффективности сплайсинга и/или чистоты по сравнению с существующими подходами к циркуляризации РНК.



202293372 A1

202293372 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576755EA/085

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОЛЬЦЕВОЙ РНК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка претендует на преимущество и приоритет предварительной заявки США № 63/027292, поданной 19 мая 2020 г., содержание которой настоящим полностью включено посредством ссылки для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Обычная генная терапия включает применение ДНК для введения желаемой генетической информации в клетки-хозяева. ДНК, введенная в клетку, обычно в определенной степени интегрируется в геном одной или более трансфицированных клеток, что обеспечивает длительное действие введенного генетического материала в хозяине. Хотя такое продолжительное действие может иметь 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 привести к нарушению жизненно важной генетической функции у получающего лечение хозяина, например, к элиминации или пагубному уменьшению продукции основного фермента или прерыванию гена, критического для регуляции клеточного роста, что приводит к нерегулируемой или пролиферации раковых клеток. Кроме того, при обычной генной терапии на основе ДНК для эффективной экспрессии желаемого 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 к 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 является дорогим и времязатратным. Направленную доставку введенного генетического материала с использованием вирусных векторов также трудно контролировать. Таким образом, в то время как генная терапия на основе ДНК оценивалась для доставки секретируемых белков с использованием вирусных векторов (патент США № 6066626; публикация США № US2004/0110709), эти подходы могут быть ограничены по этим различным причинам.

В отличие от ДНК, применение РНК в качестве агента генной терапии значительно безопаснее, поскольку РНК не сопряжена с риском стабильной интеграции в геном трансфицированной клетки, что устраняет опасения, что введенный генетический материал нарушит нормальное функционирование необходимого гена или вызвать мутацию, которая приводит к вредным или онкогенным эффектам, а посторонние промоторные

последовательности не требуются для эффективной трансляции кодируемого белка, 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.

Кольцевая РНК полезна при разработке и производстве 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 приложений in vivo, особенно в области исследований основанного на РНК контроля экспрессии генов и терапии, включая заместительную терапию белками и вакцинацию.

До этого изобретения существовало три основных способа получения кольцевой РНК in vitro: способ, опосредованный шиной, способ пермутированных интрон-экзонов и способ, опосредованный РНК-лигазой. Однако существующие методологии ограничены размером РНК, которая может быть циркулирована, что ограничивает их терапевтическое применение.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Кольцевая РНК вместе с соответствующими композициями и способами описаны в данном документе. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК по данному изобретению содержит фрагменты интронов группы I, спейсеры, IRES, дуплекс образующие участки и экспресионную последовательность. В некоторых вариантах реализации экспрессионная последовательность кодирует один или более антигенов. В некоторых вариантах реализации экспрессионная последовательность заменена некодирующей последовательностью. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК по данному изобретению имеет улучшенную экспрессию, функциональную стабильность, простоту производства и/или период полувыведения по сравнению с линейной РНК. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК по данному изобретению обладает пониженной иммуногенностью. В некоторых вариантах реализации способы и конструкции по изобретению приводят к повышению эффективности циркуляризации, эффективности сплайсинга и/или чистоты по сравнению с существующими подходами к циркуляризации РНК.

В одном аспекте в настоящем документе предложен полинуклеотид кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке: a. фрагмент интрона 3’ группы I, b. участок внутренней посадки рибосомы (IRES), c. экспрессионную последовательность, кодирующую один или более антигенов, адъювантов, антиген-подобных или адъювантоподобных полипептидов или их фрагментов, и d. фрагмент интрона 5' группы I. В некоторых вариантах реализации фрагмент интрона 3’ группы I включает динуклеотид сайта сплайсинга интрона 3’ группы I. В некоторых вариантах реализации фрагмент интрона 5’ группы I включает динуклеотид сайта сплайсинга интрона 5’ группы I.

В одном аспекте в настоящем документе предложен полинуклеотид кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке: a. фрагмент интрона 3’ группы I, b. участок внутренней

посадки рибосомы (IRES), c. некодирующую экспрессионную последовательность и d. фрагмент интрона 5’ группы I.

В одном аспекте в настоящем документе предложен полинуклеотид кольцевой РНК, полученный в результате транскрипции вектора, содержащего в следующем порядке: a. 5’-дуплексообразующую область, b. фрагмент интрона 3' группы I, c. участок внутренней посадки рибосомы (IRES), d. экспрессионную последовательность, кодирующую один или более антигенов, адъювантов, антиген-подобных или адъювантоподобных полипептидов или их фрагментов, e. фрагмент интрона 5’ группы I и f. 3' область формирования дуплекса.

В одном аспекте в настоящем документе предложен полинуклеотид кольцевой РНК, полученный в результате транскрипции вектора, содержащего в следующем порядке: a. 5’-дуплексообразующую область, b. фрагмент интрона 3' группы I, c. участок внутренней посадки рибосомы (IRES), d. некодирующую экспрессионную последовательность, e. фрагмент интрона 5’ группы I и f. 3’-дуплексообразующую область.

В некоторых вариантах реализации вектор дополнительно содержит трифосфорилированный 5'-конец. В некоторых вариантах реализации вектор дополнительно содержит монофосфорилированный 5'-конец.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК содержит первый спейсер между 5'-дуплексообразующей областью и фрагментом интрона 3' группы I и второй спейсер между фрагментом интрона 5' группы I и 3'-дуплексообразующей областью. В некоторых вариантах реализации каждый из первого и второго спейсеров имеет длину от около 10 до около 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации каждая из первой и второй образующих дуплекс областей имеет длину от около 9 до около 19 нуклеотидов. В некоторых других вариантах реализации каждая из первой и второй образующих дуплекс областей имеет длину около 30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах реализации IRES имеет последовательность IRES из вируса синдрома Таура, вируса триатомы, вируса энцефаломиелита Тейлера, обезьяньего вируса 40, вируса Solenopsis invicta 1, вируса Rhopalosiphum padi, вируса ретикулоэндотелиоза, полиовируса человека 1, кишечного вируса Plautia stali, кашмир вируса пчелы, риновируса человека 2, вируса Homalodisca coagulata-1, вируса иммунодефицита человека типа 1, вируса Homalodisca coagulata-1, вируса Himetobi P, вируса гепатита C, вируса гепатита A, вируса гепатита GB, вируса ящура, энтеровируса человека 71, вируса ринита лошадей, Ectropis obliqua picorna-подобного вируса, вируса энцефаломиокардита, вируса дрозофилы C, вируса Коксаки человека B3, тобамовируса крестоцветных, вируса паралича сверчков, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 1, вируса черного маточника, 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, антеннапедии дрозофилы, 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, n.myc человека, Gtx мыши, p27kipl человека, PDGF2/c-sis человека, p53

человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, жнец дрозофилы, Canine Scamper, Ubx дрозофилы, UNR человека, UtrA мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, безволосой дрозофилы, S. cerevisiae TFIID, S. cerevisiae YAP1, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, пикобирнавируса, HCV QC64, козавируса человека E/D, козавируса человека F, козавируса человека JMY, риновируса NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, саливируса A SH1, саливируса FHB, саливируса NG-J1, пареховируса человека 1, крохивируса B, Yc-3, розавируса M-7, шанбавируса A, пасивируса A, пасивируса A 2, эховируса E14, парэховируса человека 5, айчивируса, гепатита A HA16, фопивируса, CVA10, энтеровируса C, энтеровируса D, энтеровируса J, пегивируса человека 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, пегивируса A 1220, пасивируса A 3, сапеловируса, розавируса B, вируса Бакунса, тремовируса A, пазивируса свиней 1, PLV-CHN, пасивируса A, сицинивируса, гепацивируса K, гепацивируса A, BVDV1, вируса пограничной болезни овец, BVDV2, CSFV-PK15C, дицистровируса SF573, пикорноподобного вируса Хубэй, CRPV, саливируса A BN5, саливируса A BN2, саливируса A 02394, саливируса A GUT, саливируса A CH, саливируса A SZ1, саливируса FHB, CVB3, CVB1, эховируса 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 или аптамера к eIF4G.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК состоит из природных нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации экспрессионная последовательность оптимизирована по кодонам. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом, что в нем отсутствует по меньшей мере один сайт связывания микроРНК, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом, что в нем отсутствует по меньшей мере один чувствительный к эндонуклеазе сайт, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК оптимизирован таким образом, чтобы в нем отсутствовал по меньшей мере один сайт, восприимчивый к редактированию РНК, присутствующий в эквивалентном предварительно оптимизированном полинуклеотиде.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК имеет длину от около 100 нуклеотидов до около 10 тысяч пар оснований.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК имеет продолжительность терапевтического действия in vivo у людей по меньшей мере около 20 часов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональный период полужизни по меньшей мере около 20 часов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК имеет продолжительность терапевтического эффекта в клетке человека, превышающую или равную продолжительности терапевтического действия эквивалентного линейного полинуклеотида РНК, содержащего ту же экспрессионную последовательность. В

некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональное время полужизни в клетке человека, превышающую или равную продолжительности терапевтического действия эквивалентного линейного полинуклеотида РНК, содержащего ту же экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК имеет продолжительность терапевтического эффекта in vivo у человека больше, чем у эквивалентного линейного полинуклеотида РНК, имеющего такую же экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК имеет функциональный период полужизни in vivo у человека больше, чем у эквивалентного линейного полинуклеотида РНК, имеющего такую же экспрессионную последовательность.

В некоторых вариантах реализации адъювант или адъювантоподобный полипептид выбран из группы, включающей лиганд толл-подобного рецептора, цитокин, FLt3-лиганд, антитело, хемокины, химерный белок, эндогенный адювант, высвобождаемый из умирающей опухоли, и белки ингибирования контрольной точки. В некоторых вариантах реализации адъювант или адъювантоподобный полипептид выбран из группы, включающей BCSP31, MOMP, FomA, MymA, ESAT6, PorB, PVL, Porin, OmpA, PepO, OmpU, лумазинсинтазу, Omp16, Omp19, CobT, RpfE, Rv0652, HBHA, NhhA, DnaJ, пневмолизин, фалгелин, IFN-альфа, IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF, IL-1b, IL-6, TNF-a, IL-7, IL-17, бета IL-1, анти-CTLA4, анти-PD1, анти-41BB, PD-L1, Tim-3, Lag-3, TIGIT, GITR и анти-CD3. В некоторых вариантах реализации адъювант или адъювантоподобный полипептид выбран из таблицы 10.

В одном аспекте в настоящем документе предложен полинуклеотид РНК, содержащий в следующем порядке фрагментом интрона 3' и трифосфорилированный 5'-конец. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид РНК содержит 5'-спейсер, расположенный выше фрагмента интрона 3' и ниже трифосфорилированного 5'-конца.

В одном аспекте в настоящем документе предложен полинуклеотид РНК, содержащий фрагмент интрона 5' и трифосфорилированный 5'-конец. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид РНК содержит 5'-спейсер, расположенный ниже фрагмента интрона 5’.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид РНК дополнительно содержит монофосфорилированный 5'-конец.

В одном аспекте в настоящем документе предложен полинуклеотид РНК, содержащий в следующем порядке фрагмент интрона 3' и монофосфорилированный 5'-конец. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид РНК содержит 5'-спейсер, расположенный выше фрагмента интрона 3' и ниже монофосфорилированного 5'-конца.

В одном аспекте в настоящем документе предложен полинуклеотид РНК, содержащий фрагмент интрона 5' и монофосфорилированные 5’-концы. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид РНК содержит 5'-спейсер, расположенный ниже фрагмента интрона 5’.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид РНК дополнительно содержит

трифосфорилированный 5'-конец.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид РНК дополнительно содержит метку очистки полиА. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид РНК дополнительно содержит инициирующую последовательность.

В одном аспекте в настоящем документе предложен препарат РНК, содержащий: a. полинуклеотид кольцевой РНК по п. 1, п. 2 или оба; и b. полинуклеотид линейной РНК, содержащий по меньшей мере одно из следующего: i. 3'-интронный полинуклеотид, содержащий монофосфорилированный 5'-конец и фрагмент интрона 3'; ii. 5'-интронный полинуклеотид, содержащий монофосфорилированный 5'-конец и фрагмент интрона 5'; iii. 3'-интронный полинуклеотид, содержащий трифосфорилированный 5'-конец и фрагмент интрона 3'; и iv. 5'-интронный полинуклеотид, содержащий трифосфорилированный 5'-конец и фрагмент интрона 3', при этом кольцевой РНК-полинуклеотид составляет по меньшей мере 90% препарата РНК.

В некоторых вариантах реализации 3’-интронный полинуклеотид или 5’-интронный полинуклеотид содержит спейсер. В некоторых вариантах реализации 3’-интронный полинуклеотид или 5’-интронный полинуклеотид содержит полиА-последовательность. В некоторых вариантах реализации 3’-интронный полинуклеотид или 5’-интронный полинуклеотид содержит UTR. В некоторых вариантах реализации 3’-интронный полинуклеотид или 5’-интронный полинуклеотид содержит IRES.

В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в настоящем документе, разбавитель и, необязательно, солевой буфер.

В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая описанный в настоящем документе препарат РНК, разбавитель и, необязательно, солевой буфер.

В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в настоящем документе, и поликатионное, катионное или полимерное соединение.

В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая препарат РНК, раскрытый в настоящем документе, и поликатионное, катионное или полимерное соединение.

В некоторых вариантах реализации поликатионное или катионное соединение выбрано из группы, состоящей из: катионных пептидов или белков, основных полипептидов, пептидов, проникающих в клетку (CPP), пептидов, происходящих от Tat, пенетратина, пептидов, производных или аналогов VP22, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA или доменов трансдукции белка (PTD), PpT620, пептидов, богатых пролином, пептидов, богатых аргинином, пептидов, богатых лизином, MPG-пептида(ов), Pep-1, L-олигомеров, пептида(ов) кальцитонин, пептидов, полученных из Antennapedia, pAntp, pIsl, FGF, лактоферрина, транспортана, буфорин-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, пептидов, полученных из hCT, SAP, гистонов, катионных полисахаридов, катионных

полимеров, катионных липидов, дендримеров, полиимина, полиаллиламина, олигофектамина или катионных или поликатионных полимеров, полимеров на основе сахарного остова, полимеров на основе силанового остова, модифицированных полиаминокислот, модифицированных акрилатов, модифицированных полибетаминоэфиров (PBAE), модифицированных амидоаминов, дендримеров, блок-полимеров, состоящих из сочетания одного или более катионных блоков и одного или более гидрофильных или гидрофобных блоков. В некоторых вариантах реализации полимерное соединение выбрано из группы, состоящей из: полиаминов, простых полиэфиров, полиамидов, сложных полиэфиров, поликарбаматов, полимочевины, поликарбонатов, полистиролов, полиимидов, полисульфонов, полиуретанов, полиацетиленов, полиэтиленов, полиэтилениминов, полиизоцианатов, полиакрилатов, полиметакрилатов, полиакрилонитрилов и полиарилатов. Например, полимер может включать поли(капролактон) (PCL), полимер этиленвинилацетата (EVA), поли(молочную кислоту) (PLA), поли(L-молочную кислоту) (PLLA), поли(гликолевую кислоту) (PGA), поли(молочную кислоту-со-гликолевую кислоту) (PLGA), поли(L-молочную кислоту-со-гликолевую кислоту) (PLLGA), поли(D, L-лактид) (PDLA), поли(L-лактид) (PLLA), поли(D, L-лактид-со-капролактон), поли(D, L-лактид-со-капролактон-согликолид), поли(D, L-лактид-со-PEO-со-D, L-лактид), поли(D, L-лактид-со-PPO-со-D, L-лактид), полиалкилцианоакрилат, полиуретан, поли-L-лизин (PLL), гидроксипропилметакрилат (HPMA), полиэтиленгликоль, поли-L-глутаминовую кислоту, поли(оксикислоты), полиангидриды, полиортоэфиры, поли(эфирамиды), полиамиды, поли(эфирные эфиры), поликарбонаты, полиалкилены, такие как полиэтилен и полипропилен, полиалкиленгликоли, такие как поли(этиленгликоль) (ПЭГ), полиалкиленоксиды (ПАО), полиалкилентерефталаты, такие как поли(этилентерефталат), поливиниловые спирты (ПВС), поливиниловые эфиры, поливинилэфиры сложные эфиры, такие как поли(винилацетат), поливинилгалогениды, такие как поли(винилхлорид) (ПВХ), поливинилпирролидон (ПВП), полисилоксаны, полистирол, полиуретаны, производные целлюлозы, такие как алкилцеллюлозы, гидроксиалкилцеллюлозы, простые эфиры целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы, нитро целлюлозы, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, полимеры акриловых кислот, такие как поли(метил(мет)акрилат) (ПММА), поли(этил(мет)акрилат), поли(бутил(мет)акрилат), 363 5 10 15 20 25 30 35 WO 2021/076805 PCT/US2020/055844 поли(изобутил(мет)акрилат), поли(гексил(мет)акрилат), поли(изодецил(мет)акрилат), поли(лаурил(мет)акрилат), поли(фенил(мет)акрилат)метакрилат), поли(метилакрилат), поли(изопропилакрилат), поли(изобутилакрилат), поли(октадецилакрилат) и их сополимеры и смеси, полидиоксанон и его сополимеры, полигидроксиалканоаты, полипропиленфлимарат, полиоксиметилен, полоксамеры, полоксамины, поли(орто)эфиры, поли(масляная кислота), поли(валериановая кислота), поли(лактид-со-капро олактон), триметиленкарбонат, поли(N-акрилоилморфолин) (PAcM), поли(2-метил-2-оксазолин) (PMOX), поли(2-этил-2-оксазолин) (PEOZ) и полиглицерин. В некоторых вариантах реализации поликатионное или

катионное соединение выбрано из группы, включающей: протамин, нуклеолин, спермин или спермидин, поли-L-лизин (PLL), полиаргинин, ВИЧ-связывающие пептиды, ВИЧ-1 Tat (ВИЧ), полиэтиленимин (ПЭИ), DOTMA: [1-(2,3-сиолеилокси)пропил)]-N, N,N-триметиламмоний хлорид, DMRIE, ди-C14-амидин, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Диолеилфосфатидилэтаноламин, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Диоктадециламидоглицилспермин, DIMRI: Бромид димиристооксипропилдиметилгидроксиэтиламмония, DOTAP: диолеоилокси-3-(триметиламмонио)пропан, DC-6-14: O, O-дитетрадеканоил-N-альфа-триметиламмониоацетил)диэтаноламин хлорид, CLIP 1: rac-[(2,3-диоктадецилоксипропил)(2-гидроксиэтил)]-диметиламмоний хлорид, CLIP6: rac-[2(2,3 -дигексадецилоксипропилоксиметилокси)этил]-триметиламмоний, CLIP9: rac-[2(2,3-дигексадецилоксипропилоксисукцинилокси)этил]-триметиламмоний, полимеры бета-аминокислот или обращенные полиамиды, PVP (поли(N-этил-4-винилпиридиния бромид)), pDMAEMA (поли(диметиламиноэтилметилакрилат)), pAMAM (поли(амидоамин)), модифицированный диамином концевой полимер 1,4-бутандиолдиакрилат-со-5-амино-1-пентанол, полипропиламиновые дендримеры или дендримеры на основе pAMAM, полиимин(ы), PEI: поли(этиленимин), поли(пропиленимин), полиаллиламин, полимеры на основе циклодекстрина, полимеры на основе декстрана, хитозан и сополимеры PMOXA-PDMS.

В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в настоящем документе, наночастицу и необязательно нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая описанный в настоящем документе препарат РНК, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

В некоторых вариантах реализации наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка, биоразлагаемую наночастицу, биоразлагаемую липидную наночастицу, полимерную наночастицу или биоразлагаемую полимерную наночастицу. В некоторых вариантах реализации наночастица содержит один или более 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.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует опосредованный рецептором эндоцитоз или прямое слияние с выбранными клетками выбранной клеточной популяции или ткани в отсутствие выделения или очистки клеток. В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело,

полинуклеотидный аптамер, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или их фрагмент. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК или препарат РНК находится в количестве, эффективном для лечения инфекции (например, вирусной инфекции) у человека, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция имеет повышенный профиль безопасности по сравнению с фармацевтической композицией, содержащей векторы, содержащие экзогенную ДНК, кодирующую антигены. В некоторых вариантах реализации менее 1% по массе полинуклеотидов в композиции представляют собой двухцепочечную РНК, фрагменты ДНК или трифосфорилированную РНК. В некоторых вариантах реализации менее 1% по массе полинуклеотидов и белков в фармацевтической композиции представляют собой двухцепочечную РНК, фрагменты ДНК, трифосфорилированную РНК, белки-фосфатазы, протеинлигазы и кэпирующие ферменты.

В одном из аспектов в настоящем документе предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в настоящем документе, наночастицу и необязательно нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей. В одном из аспектов в настоящем документе предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей описанный в настоящем документе препарат РНК, наночастицу и необязательно нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

В некоторых вариантах реализации субъект имеет инфекцию (например, вирусную инфекцию). В некоторых вариантах реализации способ лечения нуждающегося субъекта дополнительно включает совместное введение противовоспалительного средства.

Некоторых вариантах реализации композиция содержит нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует опосредованный рецептором эндоцитоз в выбранных клетках выбранной клеточной популяции в отсутствие выделения или очистки клеток. В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или их фрагмент. В некоторых вариантах реализации композиция содержит нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует опосредованный рецептором эндоцитоз в выбранных клетках выбранной клеточной популяции в отсутствие выделения или очистки клеток.

В некоторых вариантах реализации наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка или биоразлагаемую наночастицу. В некоторых вариантах реализации наночастица содержит один или более катионных липидов, ионизируемых липидов или сложных поли-β-аминоэфиров. В некоторых вариантах реализации наночастица содержит один или более некатионных липидов. В некоторых вариантах реализации наночастица содержит один или более липидов, модифицированных ПЭГ, липидов полиглутаминовой кислоты или липидов гиалуроновой кислоты. В

некоторых вариантах реализации наночастица содержит холестерин. В некоторых вариантах реализации наночастица содержит арахидоновую кислоту или олеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации наночастица инкапсулирует более одного полинуклеотида кольцевой РНК.

В одном аспекте в настоящем документе предложен вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке 5'-дуплексобразующую область, фрагмент интрона 3' группы I, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экспрессионную последовательность, кодирующие один или более адъювантов, антигенов или адъювантоподобных или антигенподобных полипептидов или их фрагментов, фрагмент интрона 5' группы I и 3'-дуплексобразующую область.

В одном аспекте в настоящем документе предложен вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке 5'-дуплекс образующую область, фрагмент 3'-интрона группы I после сплайсинга, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), некодирующую последовательность, фрагмент 5'-интрона группы I и 3'-дуплекс образующую область.

В некоторых вариантах реализации вектор содержит первый спейсер между 5'-дуплексобразующей областью и фрагментом интрона 3' группы I и второй спейсер между фрагментом интрона 5' группы I и 3'-дуплексобразующей областью. В некоторых вариантах реализации каждый из первого и второго спейсеров имеет длину от около 20 до около 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации каждый из первого и второго спейсеров содержит неструктурированный участок длиной по меньшей мере 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации каждый из первого и второго спейсеров содержит структурированную область длиной по меньшей мере 7 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации каждая из первой и второй образующих дуплекс областей имеет длину от около 9 до 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации вектор оптимизирован по кодонам. В некоторых вариантах реализации в векторе отсутствует по меньшей мере один сайт связывания микроРНК, присутствующий в эквивалентном полинуклеотиде до оптимизации.

В одном аспекте в настоящем документе представлена прокариотическая клетка, содержащая вектор, описанный в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе представлена эукариотическая клетка, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации эукариотическая клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах реализации эукариотическая клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку.

В одном из аспектов в настоящем документе предложена вакцина, содержащая: по меньшей мере один полинуклеотид кольцевой РНК, имеющий экспрессионную последовательность, кодирующую по меньшей мере один вирусный антигенный полипептид, адъювант или адъювантоподобный полипептид, или его иммуногенный фрагмент, в составе липидной наночастицы. В некоторых вариантах реализации адъювант или адъювантоподобный полипептид выбран из таблицы 10. В некоторых вариантах

реализации антигенный полипептид представляет собой вирусный полипептид аденовируса; простой герпес, тип 1; простой герпес, тип 2; вирус энцефалита, папилломавирус, вирус ветряной оспы; вирус Эпштейна-Барра; цитомегаловирус человека; вирус герпеса человека, тип 8; вирус папилломы человека; вирус БК; вирус JC; оспу; вирус полиомиелита; вирус гепатита B; бокавирус человека; парвовирус B19; астровирус человека; вирус Норуолк; коксакивирус; вирус гепатита A; полиовирус; риновирус; вирус тяжелого острого респираторного синдрома; вирус гепатита C; вирус желтой лихорадки; вирус денге; вирус Западного Нила; вирус краснухи; вирус гепатита E; вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); вирус гриппа; вирус гуанарито; вирус Хунин; вирус Ласса; вирус Мачупо; вирус Сабиа; вирус конго-крымской геморрагической лихорадки; вирус Эбола; вирус Марбург; вирус кори; вирус эпидемического паротита; вирус парагриппа; респираторно-синцитиальный вирус; вирус метапневмо человека; вирус Хендра; вирус Нипах; вирус бешенства; гепатит Д; ротавирус; орбивирус; кольтивирус; вирус Банна; энтеровирус человека; Ханта вирус; вирус Западного Нила; ближневосточный респираторный синдром Коронавирус; вирус японского энцефалита; везикулярный экзантернавирус; SARS-CoV-2; восточный лошадиный энцефалит или сочетание любых двух или более из вышеперечисленных. В некоторых вариантах реализации вирусный антигенный полипептид или его иммуногенный фрагмент выбран или получен из любой из SEQ ID NO: 325-336 В некоторых вариантах реализации вирусный антигенный полипептид или его иммуногенный фрагмент имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 325-336, и причем антигенный полипептид или его иммуногенный фрагмент обладает активностью слияния мембран, присоединяется к клеточным рецепторам, вызывает слияние клеточных мембран вируса и млекопитающих и/или отвечает за связывание вируса с инфицированной клеткой.

В одном из аспектов в настоящем документе предложена вакцина против SARS-CoV2, содержащая: по меньшей мере один полинуклеотид кольцевой РНК, имеющий экспрессионную последовательность, кодирующую по меньшей мере один вирусный антигенный полипептид SARS-CoV2 или его иммуногенный фрагмент, в составе липидной наночастицы. В некоторых вариантах реализации вирусный антигенный полипептид SARS-CoV2 выбран из: шиповидного белка SARS-CoV2, Nsp1-Nsp16, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORFb, ORF8, ORF10, белка оболочки SARS-CoV2, мембранного белка SARS-CoV2, нуклеокапсидного белка SARS-CoV2 или любого антигенного пептида SARS-CoV2 или фрагмента пептида SARS-CoV2. В некоторых вариантах реализации вирусный антигенный полипептид SARS-CoV2 получают из штамма G вируса SARS-CoV2, штамма GR, штамма GH, штамма L, штамма V или их комбинации.

В некоторых вариантах реализации экспрессионная последовательность, содержащаяся в вакцине, описанной в настоящем документе (например, вакцине против SARS-CoV2), оптимизирована по кодонам. В некоторых вариантах реализации вакцина (например, вакцина против SARS-CoV2) является поливалентной. В некоторых вариантах

реализации вакцина (например, вакцина против SARS-CoV2) составлена в количестве, эффективном для получения антиген-специфического иммунного ответа.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК содержит первую экспрессионную последовательность, кодирующую первый вирусный антигенный полипептид, и вторую экспрессионную последовательность, кодирующую второй вирусный антигенный полипептид.

В одном аспекте в настоящем документе предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту вакцины, раскрытой в настоящем документе, в количестве, эффективном для индукции антиген-специфического иммунного ответа у субъекта. В одном аспекте в настоящем документе предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту SARS-CoV2, раскрытого в настоящем документе, в количестве, эффективном для индукции антиген-специфического иммунного ответа у субъекта.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический иммунный ответ включает Т-клеточный ответ или В-клеточный ответ. В некоторых вариантах реализации субъекту вводят одну дозу вакцины. В некоторых вариантах реализации субъекту вводят бустерную дозу вакцины. В некоторых вариантах вакцину вводят субъекту интраназально, внутрикожно или внутримышечно. В некоторых вариантах реализации титр антител к антигенному полипептиду, продуцируемых у субъекта, увеличивается по меньшей мере на 1 log относительно предварительно определенного порогового уровня. В некоторых вариантах реализации титр антител к антигенному полипептиду, продуцируемых у субъекта, увеличивается на 1-3 log относительно предварительно определенного порогового уровня. В некоторых вариантах реализации титр антител к антигенному полипептиду, продуцируемых у субъекта, увеличивается по меньшей мере в 2 раза относительно предварительно определенного порогового уровня. В некоторых вариантах реализации титр антител к антигенному полипептиду, продуцируемых у субъекта, увеличивается в 2-10 раз относительно предварительно определенного порогового уровня. В некоторых вариантах реализации предварительно определенный пороговый уровень представляет собой титр антител против антигенного полипептида, вырабатываемых у субъекта, которому не вводили вакцину, содержащую антигенный полипептид. В некоторых вариантах реализации предварительно определенный пороговый уровень представляет собой титр антител против антигенного полипептида, вырабатываемых у субъекта, которому вводили живую аттенуированную вакцину или инактивированную вакцину, содержащую антигенный полипептид. В некоторых вариантах реализации предварительно определенный пороговый уровень представляет собой титр антител против антигенного полипептида, вырабатываемых у субъекта, которому вводили рекомбинантную белковую вакцину или очищенную белковую вакцину, содержащую антигенный полипептид.

В одном из аспектов в настоящем документе предложен полинуклеотид кольцевой РНК, имеющий экспрессионную последовательность, кодирующую по меньшей мере один

вирусный антигенный полипептид, адъювант или адъювантоподобный полипептид, или его иммуногенный фрагмент. В одном аспекте в настоящем документе предложен вектор экспрессии, содержащий сконструированную нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в настоящем документе.

В одном аспекте в настоящем документе предложена вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК, описанный в настоящем документе, в составе липидной наночастицы. В некоторых вариантах реализации наночастица имеет средний диаметр 50-200 нм. В некоторых вариантах реализации липидная наночастица содержит катионный липид, ПЭГ-модифицированный липид, стерол и некатионный липид. В некоторых вариантах реализации переносчик липидных наночастиц содержит около 20-60% катионного липида, 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида, 25-55% стерола и 25% некатионного липида. В некоторых вариантах реализации катионный липид представляет собой ионизируемый катионный липид, а некатионный липид представляет собой нейтральный липид, а стерол представляет собой холестерин. В некоторых вариантах реализации катионный липид выбран из 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA), и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)-9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат (L319). В некоторых вариантах реализации наночастица имеет значение полидисперсности менее 0,4. В некоторых вариантах реализации наночастица имеет суммарный нейтральный заряд при нейтральном значении pH.

В некоторых вариантах реализации раскрытой вакцины полинуклеотид кольцевой РНК входит в состав одной и той же наночастицы вместе с адъювантом. В некоторых вариантах реализации адъювант представляет собой CpG, имихимод, алюминий или адъювант Фрейнда.

В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция для применения при вакцинации субъекта, содержащая эффективную дозу полинуклеотида кольцевой РНК, кодирующего по меньшей мере один вирусный антиген или адъювант, или адъювантоподобный полипептид, или его иммуногенный фрагмент, при этом эффективная доза достаточно для получения нейтрализующего титра 1000-10000, продуцируемого нейтрализующим антителом против указанного антигена, или адъюванта, или адъювантоподобного полипептида, или его иммуногенного фрагмента, при измерении в сыворотке субъекта через 1-72 часа после введения. В одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция для применения при вакцинации субъекта, содержащая эффективную дозу кольцевой мРНК, кодирующей по меньшей мере один вирусный антиген, или адъювант, или адъювантоподобный полипептид, или его иммуногенный фрагмент, причем эффективная доза достаточна для получения обнаруживаемых уровней антигена или адъюванта или адъювантоподобного полипептида, или его иммуногенного фрагмента, измеренного в сыворотке субъекта через 1-72 часа после введения. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция

предназначена для применения в способе индукции антигенспецифического иммунного ответа у субъекта, причем способ включает введение субъекту вакцины или фармацевтической композиции в количестве, эффективном для получения антигенспецифического иммунного ответа у субъекта.

В одном аспекте в настоящем документе предложен способ индукции, продуцирования или усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе, в количестве, эффективном для индукции, продуцирования или усиления антиген-специфического иммунного ответа у субъекта. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция иммунизирует субъекта против вируса на срок до 2 лет. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция иммунизирует субъекта против вируса на срок более 2 лет. В некоторых вариантах реализации субъект подвергался воздействию вируса, при этом субъект инфицирован вирусом или при этом субъект подвергается риску заражения вирусом. В некоторых вариантах реализации субъект имеет ослабленный иммунитет.

В одном аспекте в настоящем документе предусмотрено применение вакцины или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для применения в способе индукции антиген-специфического иммунного ответа у субъекта, причем способ включает введение субъекту вакцины в количество, эффективное для получения антигенспецифического иммунного ответа у субъекта.

В одном аспекте в настоящем документе предложен способ индукции перекрестной реактивности против множества вирусов или штаммов вируса у млекопитающего, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, вакцины по любому из предшествующих пунктов или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов. В некоторых вариантах реализации способ включает введение млекопитающему отдельно по меньшей мере двух полинуклеотидов кольцевой РНК, имеющих экспрессионную последовательность, каждый из которых кодирует консенсусный вирусный антиген. В некоторых вариантах реализации способ включает введение млекопитающему одновременно по меньшей мере двух полинуклеотидов кольцевой РНК, имеющих экспрессионную последовательность, каждый из которых кодирует консенсусный вирусный антиген. В некоторых вариантах реализации способ включает.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1** представлена люминесценция в супернатантах HEK293 (**фиг. 1A, 1D** и **1E**), HepG2 (**Фиг. 1B**) или 1C1C7 (**Фиг. 1C**) через 24 часа после трансфекции кольцевой РНК, содержащей экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и различные последовательности IRES.

На **Фиг. 2** представлена люминесценция в супернатантах HEK293 (**Фиг. 2A**), HepG2 (**Фиг. 2B**) или 1C1C7 (**Фиг. 2C**) через 24 часа после трансфекции кольцевой РНК,

содержащей экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и различные последовательности IRES, имеющие разную длину.

На **Фиг. 3** представлена стабильность выбранных конструкций IRES в клетках HepG2 (**Фиг. 3A**) или 1C1C7 (**Фиг. 3B**) в течение 3 дней, измеренная по люминесценции.

На **Фиг. 4A** и **4B** проиллюстрирована экспрессия белка из выбранных конструкций IRES в клетках Jurkat, измеренная по люминесценции секретируемой люциферазы Gaussia в супернатантах клеток.

На **Фиг. 5A** и **5B** проиллюстрирована стабильность выбранных конструкций IRES в клетках Jurkat в течение 3 дней, измеренная по люминесценции.

На **Фиг. 6** изображено сравнение 24-часовой люминесценции (**Фиг. 6A**) или относительная люминесценция в течение 3 дней (**Фиг. 6B**) модифицированной линейной, неочищенной кольцевой или очищенной кольцевой РНК, кодирующей люциферазу Gaussia.

На **Фиг.** 7 проиллюстрирована индукция транскрипта IFNγ (**Фиг. 7A**) , IL-6 (**Фиг. 7B**), IL-2 (**Фиг. 7C**), RIG-I (**Фиг. 7D**), IFN-β1 (**Фиг. 7E**) и TNFα (**Фиг. 7F**) после электропорации клеток Jurkat с модифицированной линейной, неочищенной кольцевой или очищенной кольцевой РНК.

На **Фиг. 8** представлено сравнение люминесценции кольцевой РНК и модифицированной линейной РНК, кодирующей люциферазу Gaussia, в первичных моноцитах человека (**Фиг. 8A**) и макрофагах человека (**Фиг. 8B** и **Фиг. 8C**).

На **Фиг. 9** изображена относительная люминесценция в течение 3 дней (**Фиг. 9A**) в супернатанте первичных Т-клеток после трансдукции кольцевой РНК, содержащей экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и различные последовательности IRES, или 24-часовая люминесценция (**Фиг. 9B**).

На **Фиг. 10** изображена 24-часовая люминесценция в супернатанте первичных Т-клеток (**Фиг. 10A**) после трансдукции кольцевой РНК или модифицированной линейной РНК, содержащей экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia, или относительная люминесценция в течение 3 дней (**Фиг. 10B**) и 24-часовая люминесценция в МКПК (**Фиг. 10C**).

На **Фиг. 11** представлены хроматограммы ВЭЖХ (**Фиг. 11A**) и эффективности циркуляризации (**Фиг. 11B**) РНК-конструкций, имеющих разные сайты пермутации.

На **Фиг. 12** представлены хроматограммы ВЭЖХ (**Фиг. 12A**) и эффективности циркуляризации (**Фиг. 12B**) РНК-конструкций, имеющих разные интроны и/или сайты пермутации.

На **Фиг. 13** представлены хроматограммы ВЭЖХ (**Фиг. 13A**) и эффективности циркуляризации (**Фиг. 13B**) 3 конструкций РНК с плечами гомологии или без них.

На **Фиг. 14** продемонстрирована эффективность циркуляризации 3 конструкций РНК без плеч гомологии или с плечами гомологии, имеющими различную длину и содержание GC.

На **Фиг.** 15A и 15B продемонстрированы хроматограммы ВЭЖХ, демонстрирующие

вклад плеч сильной гомологии в улучшенную эффективность сплайсинга, взаимосвязь между эффективностью циркуляризации и образованием разрывов в выбранных конструкциях, а также гипотетические комбинации сайтов перестановок и плеч гомологии для демонстрации улучшенной эффективности циркуляризации.

На **Фиг. 16** продемонстрированы флуоресцентные изображения Т-клеток, имитирующих электропорацию (слева) или электропорацию с кольцевой РНК, кодирующей CAR (справа), и совместно культивируемых с клетками Раджи, экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка.

На **Фиг. 17** продемонстрированы светлопольные (слева), флуоресцентные (в центре) и наложенные (справа) изображения Т-клеток, имитация электропорации (вверху) или электропорация с кольцевой РНК, кодирующей CAR (внизу), и совместное культивирование с клетками Раджи, экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка.

На **Фиг. 18** продемонстрирован специфический лизис клеток-мишеней Раджи с помощью Т-клеток, имитирующих электропорацию или электропорацию с кольцевой РНК, кодирующей различные последовательности CAR.

На **Фиг. 19** продемонстрирована люминесценция в супернатантах клеток Юркат (слева) или покоящихся первичных CD3+ Т-клетках человека (справа) через 24 часа после трансдукции линейной или кольцевой РНК, содержащей экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и различные последовательности IRES (фиг. 19A) и относительная люминесценция в течение 3 дней (**Фиг. 19B**).

На **Фиг. 20** проиллюстрирована индукция транскрипта IFN-β1 (**Фиг. 20A**), RIG-I (**Фиг. 20B**), IL-2 (**Фиг. 20C**), IL-6 (**Фиг. 20D**), IFNγ (**Фиг. 20E**) и TNFα (**Фиг. 20F**) после электропорации CD3+ Т-клеток человека с модифицированной линейной, неочищенной кольцевой или очищенной кольцевой РНК.

На **Фиг. 21** продемонстрирован специфический лизис клеток-мишеней Раджи с помощью первичных CD3+ Т-клеток человека, подвергнутых электропорации с кольцевой РНК, кодирующей CAR, как определено путем обнаружения люминесценции светлячка (**Фиг. 21A**) и индукции транскрипта IFNγ через 24 часа после электропорации с различными количествами кольцевой или линейной РНК, кодирующей последовательность CAR (**Фиг. 21B**).

На **Фиг. 22** продемонстрирован специфический лизис клеток-мишеней или клеток, не являющихся мишенями, первичными CD3+ Т-клетками человека, подвергнутыми электропорации кольцевой или линейной РНК, кодирующей CAR, при различных соотношений E:T (**Фиг. 22A** и **Фиг. 22B**), как определено путем обнаружения люминесценции светлячка.

На **Фиг. 23** продемонстрирован специфический лизис клеток-мишеней CD3+ Т-клетками человека, подвергнутыми электропорации с РНК, кодирующей CAR, через 1, 3, 5 и 7 дней после электропорации.

На **Фиг. 24** продемонстрирован специфический лизис клеток-мишеней CD3+ Т-клетками человека, подвергнутыми электропорации кольцевой РНК, кодирующей CAR,

нацеленный на CD19 или BCMA.

На **Фиг. 25** продемонстрирован общий поток органов, взятых у мышей CD-1, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и в состав которой входили 50% липида 10b-15, 10% DSPC, 1,5% PEG-DMG и 38,5% холестерина.

На **Фиг. 26** продемонстрированы изображения, иллюстрирующие люминесценцию органов, взятых у мышей CD-1, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и в состав которой входит 50% липида 10b-15, 10% DSPC, 1,5% PEG-DMG и 38,5% холестерина.

На **Фиг. 27** представлена молекулярная характеристика липидов 10a-26 и 10a-27. На **Фиг. 27A** продемонстрирован спектр протонного ядерного магнитного резонанса (ЯМР) липида 10a-26. На **Фиг. 27B** продемонстрировано время удерживания липида 10a-26, измеренное с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС). На **Фиг. 27C** представлен масс-спектр липида 10a-26. На **Фиг. 27D** представлен спектр протонного ЯМР липида 10a-27. На **Фиг. 27E** представлено время удерживания липида 10a-27, измеренное с помощью ЖХ-МС. На **Фиг. 27F** представлен масс-спектр липида 10a-27.

На **Фиг. 28** представлена молекулярная характеристика липида 22-S14 и его синтетических промежуточных соединений. На **Фиг. 28A** представлен спектр ЯМР 2-(тетрадецилтио)этан-1-ола. На **Фиг. 28B** представлен спектр ЯМР 2-(тетрадецилтио)этилакрилата. На **Фиг. 28C** представлен спектр ЯМР бис(2-(тетрадецилтио)этил)-3,3'-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (липид 22-S14).

На **Фиг. 29** представлен спектр ЯМР бис(2-(тетрадецилтио)этил)-3,3'-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (липид 93-S14).

На **Фиг. 30** представлена молекулярная характеристика гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (липид 10a-54). На **Фиг. 30A** представлен спектр протонного ЯМР липида 10a-54. На **Фиг. 30B** представлено время удерживания липида 10a-54, измеренное с помощью ЖХ-МС. На **Фиг. 30C** представлен масс-спектр липида 10a-54.

На **Фиг. 31** представлена молекулярная характеристика гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (липид 10a-53). На **Фиг. 31A** представлен спектр протонного ЯМР липида 10a-53. На **Фиг. 31B** представлено время удерживания липида 10a-53, измеренное с помощью ЖХ-МС. На **Фиг. 31C** представлен масс-спектр липида 10a-53.

На **Фиг. 32A** продемонстрирован общий поток селезенки и печени, взятых у мышей CD-1, которым ввели кольцевую РНК, кодирующую люциферазу светлячка (FLuc), и в состав которой вошли интересующий ионизируемый липид, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или молярном соотношении 62:4:33:1. На **Фиг. 32B** продемонстрировано среднее значение яркости для биораспределения экспрессии белка.

На **Фиг. 33A** представлены изображения, иллюстрирующие свечение органов,

взятых у мышей CD-1, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и в состав которых входили ионизируемый липид 22-S14, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или молярном соотношении 62:4:33:1. На **Фиг. 33B** представлены изображения IVIS всего тела мышей CD-1, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и в состав которых входят ионизируемый липид 22-S14, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или молярном соотношении 62:4:33:1.

На **Фиг. 34A** представлены изображения, иллюстрирующие свечение органов, взятых у мышей CD-1, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и в состав которых входили ионизируемый липид 93-S14, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или молярном соотношении 62:4:33:1. На **Фиг. 34B** представлены изображения IVIS всего тела мышей CD-1, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и в состав которых входят ионизируемый липид 93-S14, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или молярном соотношении 62:4:33:1.

На **Фиг. 35A** представлены изображения, иллюстрирующие свечение органов, взятых у мышей CD-1, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и в состав которых входили ионизируемый липид 10a-26, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или молярном соотношении 62:4:33:1. На **Фиг. 35B** представлены изображения IVIS всего тела мышей CD-1, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и в состав которых входят ионизируемый липид 10a-26, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или молярном соотношении 62:4:33:1.

На **Фиг. 36** представлены изображения, иллюстрирующие люминесценцию органов, взятых у мышей c57BL/6J, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую FLuc, и инкапсулированные в липидные наночастицы, образованные липидом 10b-15 (**фиг. 36A**), липидом 10a-53 (**Фиг. 36B**) или липидом 10a-54 (**Фиг. 36C**). В качестве контроля использовали ФСБ (**Фиг. 36D**).

На **Фиг. 37A** и **37B** продемонстрирована относительная люминесценция в лизатах МКПК человека после 24-часовой инкубации с тестируемыми липидными наночастицами, содержащими кольцевую РНК, кодирующую люциферазу светлячка.

На **Фиг. 38** продемонстрирована экспрессия GFP (**Фиг. 37A**) и CAR CD19 (**Фиг. 37B**) в МКПК человека после инкубации с тестируемой липидной наночастицей, содержащей кольцевую РНК, кодирующую либо GFP, либо CD19 CAR.

На **Фиг. 39** продемонстрирована экспрессия CAR против мышиного CD19 в клетках 1C1C7, липотрансфицированных кольцевой РНК, содержащей экспрессионную последовательность против мышиного CD19 CAR и различные последовательности IRES.

На **Фиг. 40** продемонстрирована цитотоксичность анти-мышиного CD19 CAR по отношению к мышиным Т-клеткам. CD19 CAR кодируется и экспрессируется кольцевой РНК, которую электропорируют в мышиные Т-клетки.

На **Фиг. 41** продемонстрировано количество B-клеток в периферической крови (**Фиг. 40A** и **40B**) или селезенки (**Фиг. 40C**) в C57BL/6J мышах, которым через день вводили тестовые липидные наночастицы, инкапсулирующие кольцевую РНК, кодирующую анти-мышиный CD19 CAR.

На **Фиг. 42A** и **42B** сравнивается уровень экспрессии CAR против CD19 человека, экспрессируемого кольцевой РНК, с уровнем экспрессии линейной мРНК.

На **Фиг. 43A** и **43B** сравнивается цитотоксическое действие CAR против CD19 человека, экспрессируемого кольцевой РНК, с эффектом, экспрессируемым линейной мРНК.

На **Фиг. 44** продемонстрирована цитотоксичность двух CAR (анти-человеческий CD19 CAR и анти-человеческий BCMA CAR), экспрессируемых с одной кольцевой РНК в Т-клетках.

На **Фиг. 45A** продемонстрированы репрезентативные графики FACS с частотами экспрессии tdTomato в различных субпопуляциях иммунных клеток селезенки после обработки LNP, образованными липидом 10a-27 или 10a-26, или липидом 10b-15. На **Фиг. 45B** продемонстрирована количественная оценка доли миелоидных клеток, B-клеток и T-клеток, экспрессирующих tdTomato (среднее значение+стандартное отклонение, n=3), что эквивалентно доле каждой клеточной популяции, успешно трансфицированной кольцевой РНК Cre. На **Фиг. 45C** проиллюстрирована доля дополнительных популяций иммунных клеток селезенки, включая NK-клетки, классические моноциты, неклассические моноциты, нейтрофилы и дендритные клетки, экспрессирующие tdTomato после обработки липидами 27 и 26 (среднее+ станд. откл., n=3).

На **Фиг. 46A** изображен типичный дизайн конструкции РНК со встроенными последовательностями полиА в интронах. На **Фиг. 46B** изображена хроматографическая кривая неочищенной кольцевой РНК. На **Фиг. 46C** изображена хроматографическая кривая аффинно очищенной кольцевой РНК. На **Фиг. 46D** продемонстрирована иммуногенность кольцевых РНК, полученных при различных условиях IVT и способах очистки. (Коммерческий=коммерческая смесь IVT; обычный=индивидуальная смесь IVT; Афф=аффинная очистка; Энц=очистка ферментов; соотношение GMP:GTP=8, 12,5 или 13,75).

На **Фиг. 47A** изображен типичный дизайн конструкции РНК со специальной связывающей последовательностью в качестве альтернативы полиА для гибридизационной очистки. На **Фиг. 47B** изображена хроматографическая кривая неочищенной кольцевой РНК. На **Фиг. 46C** изображена хроматографическая кривая аффинно очищенной кольцевой РНК.

На **Фиг. 48A** изображена хроматографическая кривая неочищенной кольцевой РНК, кодирующей дистрофин. На **Фиг. 48B** изображена хроматографическая кривая очищенной ферментом кольцевой РНК, кодирующей дистрофин.

На **Фиг. 49** сравнивается экспрессия (**Фиг. 49A**) и стабильность (**Фиг. 49B**) очищенных кольцевых РНК с различными 5'-спейсерами между 3'-интронным

фрагментом/5’ областью внутреннего дуплекса и IRES в клетках Юркат. (AC=в спейсерной последовательности использовались только A и C; UC=в спейсерной последовательности использовались только U и C.)

На **Фиг. 50** продемонстрированы уровни экспрессии люминесценции и стабильность экспрессии в первичных Т-клетках из кольцевых РНК, содержащих указанные исходные или модифицированные элементы IRES.

На **Фиг. 51** продемонстрированы уровни экспрессии люминесценции и стабильность экспрессии в HepG2 клетках из кольцевых РНК, содержащих указанные исходные или модифицированные элементы IRES.

На **Фиг. 52** продемонстрированы уровни экспрессии люминесценции и стабильность экспрессии в 1C1C7 клеткахиз кольцевых РНК, содержащих указанные исходные или модифицированные элементы IRES.

На **Фиг. 53** продемонстрированы уровни экспрессии люминесценции и стабильность экспрессии в клетках HepG2 из кольцевых РНК, содержащих элементы IRES со вставленными нетранслируемыми областями (UTR) или гибридными элементами IRES. «Scr» означает «скремблированный», который использовался в качестве контроля.

На **Фиг. 54** продемонстрированы уровни экспрессии люминесценции и стабильность экспрессии в клетках 1C1C7 из кольцевых РНК, содержащих IRES и кассеты вариабельного стоп-кодона, функционально связанные с последовательностью, кодирующей люциферазу Gaussia.

На **Фиг. 55** продемонстрированы уровни экспрессии люминесценции и стабильность экспрессии в клетках 1C1C7 из кольцевых РНК, содержащих IRES и вариабельные нетранслируемые области (UTR), встроенные перед стартовым кодоном последовательности, кодирующей гауссову люциферазу.

На **Фиг. 56** продемонстрированы уровни экспрессии эритропоэтина человека (hEPO) в клетках Huh7 из кольцевых РНК, содержащих два сайта-мишени миR-122 ниже кодирующей последовательности hEPO.

На **Фиг. 57** продемонстрированы уровни экспрессии люминесценции в клетках SupT1 (из линии Т-клеток опухоли человека) и клетках MV4-11 (из линии макрофагов человека) из LNP, трансфицированных кольцевыми РНК, кодирующими люциферазу светлячка in vitro.

На **Фиг. 58** продемонстрировано сравнение LNP трансфицированных первичных Т-клеток человека, содержащих кольцевые РНК, в зависимости от ApoE на основе различных композиций с хелперным липидом, ПЭГ-липидом и ионизируемым соотношением липид:фосфат.

На **Фиг. 59** продемонстрировано поглощение LNP, содержащих кольцевые РНК, кодирующие eGFP, активированными первичными Т-клетками человека с помощью или без помощи ApoE3.

На **Фиг. 60** продемонстрирована экспрессия иммунных клеток из LNP, содержащей кольцевую РНК, кодирующую флуоресцентный белок Cre, в модели Cre-репортерных

мышей.

На **Фиг. 61** продемонстрирована экспрессия mOX40L иммунными клетками у мышей дикого типа после внутривенной инъекции LNP, которые были трансфицированы кольцевыми РНК, кодирующими mOX40L.

На **Фиг. 62** продемонстрирована однократная доза mOX40L в LNP, трансфицированных кольцевыми РНК, способными экспрессировать mOX40L. На **Фиг. 62A** и **62B** представлен процент экспрессии mOX40L в Т-клетках селезенки, Т-клетках CD4+, Т-клетках CD8+, В-клетках, NK-клетках, дендритных клетках и других милоидных клетках. На **Фиг. 62C** представлено изменение массы мыши через 24 часа после трансфекции.

На **Фиг. 63** представлено истощение В-клеток LNP, трансфицированных внутривенно кольцевыми РНК у мышей. На **Фиг. 63A** количественно оценивает разрушение Be-клеток за счет живых B220+ В-клеток, CD45+ иммунных клеток, а на **Фиг. 63B** сравнивается истощение В-клеток B220+ В-клеток живых CD45+ иммунных клеток по сравнению с циклическими РНК, экспрессирующими люциферазу. На **Фиг. 63C** представлено увеличение массы В-клеток трансфицированных клеток.

На **Фиг. 64** проиллюстрированы уровни экспрессии CAR в периферической крови (**Фиг. 64A**) или селезенки (**Фиг. 64B**) при обработке LNP, инкапсулирующим кольцевую РНК, которая экспрессирует анти-CD19 CAR. Для сравнения использовали анти-CD20 (aCD20) и кольцевую РНК, кодирующую люциферазу (oLuc).

На **Фиг. 65** продемонстрирована общая частота экспрессии анти-CD19 CAR, частота экспрессии анти-CD19 CAR на поверхности клеток и влияние на противоопухолевый ответ IRES-специфической кольцевой РНК, кодирующей анти-CD19 CAR, на Т-клетках. На **Фиг. 65A** продемонстрирована средняя геометрическая интенсивность флуоресценции анти-CD19 CAR, на **Фиг. 65B** продемонстрирован процент экспрессии анти-CD19 CAR, а на **Фиг. 65C** продемонстрирован процент лизиса клеток-мишеней, осуществляемого анти-CD19 CAR. (CK=кобувирус козы; АП=пикорнавирус аподемуса; CK*=кобувирус козы с оптимизацией кодонов; PV=парабовирус; CB=саливирус.)

На **Фиг. 66** продемонстрированы уровни экспрессии CAR в клетках-мишенях A20 FLuc при обработке конструкциями кольцевой РНК, специфичными для IRES.

На **Фиг. 67** продемонстрированы уровни экспрессии люминесценции для цитозоля (**Фиг. 67A**) и поверхности (**Фиг. 67B**) белков кольцевой РНК в первичных Т-клетках человека.

На **Фиг. 68** продемонстрирована экспрессия люминесценции в Т-клетках человека при обработке специфичными кольцевыми конструкциями IRES. Экспрессию в конструкциях кольцевой РНК сравнивали с линейной мРНК. На **Фиг. 68A**, **Фиг. 68B** и **Фиг. 68G** продемонстрирована экспрессия люциферазы Gaussia во многих донорских клетках. На **Фиг. 68C**, **Фиг. 68D**, **Фиг. 68E** и **Фиг. 68F** продемонстрирована экспрессия люциферазы светлячка в нескольких донорских клетках.

На **Фиг. 69** продемонстрирован анти-CD19 CAR (**Фиг. 69A** и **Фиг. 69B**) и анти-

BCMA CAR (**Фиг. 68B**) в Т-клетках человека после обработки липидной наночастицей, содержащей кольцевую РНК, которая кодирует либо анти-CD19, либо анти-BCMA CAR к клетке K562, экспрессирующей люциферазу светлячка.

На **Фиг. 70** продемонстрированы уровни экспрессии анти-CD19 CAR, полученные в результате доставки посредством электропорации in vitro кольцевой РНК, кодирующей анти-CD19 CAR, специфическим антиген-зависимым образом. На **Фиг.** 70A продемонстрирован лизис клеток Nalm6 с помощью анти-CD19 CAR. На **Фиг.** 70B продемонстрирован лизис клеток K562 с помощью анти-CD19 CAR.

На **Фиг. 71** продемонстрирована трансфекция LNP, опосредованная использованием ApoE3 в растворах, содержащих LNP и кольцевую РНК, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP). На **Фиг. 71A** продемонстрированы результаты живых мертвых. На **Фиг. 71B**, **Фиг. 71C**, **Фиг. 71D** и **фиг. 71E** продемонстрирована частота экспрессии для нескольких доноров.

На **Фиг. 72A, Фиг. 72B, Фиг. 72C, Фиг. 72D, Фиг. 72E, Фиг. 72F, Фиг. 72G, Фиг. 72H, Фиг. 72I, Фиг. 72J, Фиг. 72K** и на **Фиг. 72L** продемонстрирован общий поток и процентное выражение для различных составов липидов. См. пример 74.

На **Фиг. 73** продемонстрирована эффективность циркуляризации молекулы РНК, кодирующей стабилизированный (двойной мутантный пролин) шиповидный белок SARS-CoV2. На **Фиг. 73A** продемонстрирован продукт транскрипции in vitro кольцРНК, кодирующей спайк SARS-CoV2 размером ~4,5 т.п.н. На **Фиг. 73B** продемонстрирована гистограмма поверхностной экспрессии белка спайка с помощью проточной цитометрии после трансфекции кольцРНК, кодирующей спайк, в клетки 293. Трансфицированные клетки 293 окрашивали через 24 часа после трансфекции первичным антителом CR3022 и вторичным антителом, меченным APC. На **Фиг. 73C** продемонстрирован график проточной цитометрии поверхностной экспрессии белка спайка на клетках 293 после трансфекции кольцРНК, кодирующей спайк. Трансфицированные клетки 293 окрашивали через 24 часа после трансфекции первичным антителом CR3022 и вторичным антителом, меченным APC.

На **Фиг. 74** приведены несколько контролируемых адъювантных стратегий. КольцРНК, как проиллюстриовано на фигуре, влечет за собой реакцию сплайсинга неочищенной смысловой кольцевой РНК с использованием GTP в качестве индикаторной молекулы in vitro. 3p-кольцРНК включает очищенную смысловую кольцевую РНК, а также очищенную антисмысловую кольцевую РНК, смешанную с трифосфорилированными 5'-концами. На **Фиг. 74A** продемоснтрирована индукция IFN-β in vitro в клетках дикого типа и клетках A549, нокаутированных по MAVS, а на **Фиг. 74B** продемоснтрирован цитокиновый ответ in vivo на композицию кольцРНК, полученную с использованием указанной стратегии.

На **Фиг. 75** проиллюстрирована внутримышечная доставка LNP, содержащих конструкции кольцевой РНК. На **Фиг. 75A** приведен живой поток всего тела через 6 часов, а на **Фиг. 75B** приведен IVIS всего тела через 6 часов после дозы 1 мкг конструкции LNP-кольцевой РНК. На **Фиг. 75C** приведено распределение экспрессии ex vivo в течение 24-

часового периода.

На **Фиг. 76** проиллюстрирована экспрессия множества кольцевых РНК из одного липидного состава. На **Фиг. 76A** представлены титры hEPO из одного и смешанного набора конструкций LNP, содержащих кольцевые РНК, тогда как на **Фиг. 76B** представлен общий поток экспрессии биолюминесценции из одного или смешанного набора конструкций LNP, содержащих кольцевые РНК.

На **Фиг. 77** проиллюстрирована экспрессия шиповидного белка SARS-CoV2 кольцевой РНК, кодирующей шиповидные белки SARS-CoV2. На **Фиг. 77A** проиллюстрирована частота пиковой экспрессии CoV2; на **Фиг. 77B** проиллюстрирована средняя геометрическая интенсивность флуоресценции (gMFI) пиковой экспрессии CoV2; и на **Фиг. 77C** сравнивается экспрессия gMFI конструкции с частотой экспрессии.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе описаны композиции, способы, процессы, наборы и устройства для выбора, разработки, получения, производства, составления и/или применения вакцин, содержащих кольцевую РНК. Настоящее изобретение дополнительно относится к композициям, например, фармацевтическим композициям, содержащим одну или более вакцин, содержащих кольцевую РНК.

Вакцины, содержащие кольцевую РНК по данном изобретению, содержат один или более полинуклеотидов кольцевой РНК, которые кодируют один или более белков дикого типа или сконструированных белков, пептидов или полипептидов (например, адъювант и антигены). В некоторых вариантах реализации инфекционный агент, из которого получают или конструируют адъювант, адъювантоподобный белок и антиген, включает, помимо прочего, вирусы, бактерии, грибки, простейшие и/или паразиты.

В некоторых вариантах реализации предложены способы индукции, вызывания, стимуляции или запуска иммунного ответа в клетке, ткани или организме, включающие приведение в контакт указанной клетки, ткани или организма с любой из вакцин, содержащих кольцевую РНК или линейную мРНК, описанных или описанных в настоящем документе.

В аспектах данного изобретения предложены вакцины, содержащие кольцевые РНК, содержащие один или более полинуклеотидов РНК, имеющих экспрессионную последовательность, кодирующую первый антигенный полипептид. В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды кольцевой РНК входят в состав переносчика (например, липидной наночастицы).

В некоторых вариантах реализации экспрессионная последовательность оптимизирована по кодонам. В некоторых вариантах реализации первый антигенный полипептид получен из инфекционного агента. В некоторых вариантах реализации инфекционный агент выбран из группы, состоящей из штаммов вирусов и штаммов бактерий. В некоторых вариантах реализации один или более полинуклеотидов РНК кодируют дополнительный антигенный полипептид. В некоторых вариантах реализации дополнительный антигенный полипептид кодируется полинуклеотидом РНК, имеющим

кодон-оптимизированную экспрессионную последовательность.

В некоторых вариантах реализации один или более антигенных полипептидов выбраны из белков, перечисленных в Таблице 9, или их антигенных фрагментов. В некоторых вариантах реализации экспрессионная последовательность одного или более полинуклеотидов РНК и/или экспрессионная последовательность второго полинуклеотида РНК, каждая независимо, кодирует антигенный полипептид, выбранный из Таблицы 9, или его антигенный фрагмент. В некоторых вариантах реализации каждая экспрессионная последовательность одного или более полинуклеотидов РНК выбрана из любой из последовательностей РНК, перечисленных в Таблице 9, или их антигенных фрагментов.

В некоторых вариантах реализации, представленных в настоящем документе, инфекционный агент представляет собой штамм вируса, выбранный из группы, состоящей из аденовируса; простого герпеса, типа 1; простого герпеса, типа 2; вируса энцефалита, папилломавируса, вируса ветряной оспы; вируса Эпштейна-Барра; цитомегаловируса человека; вируса герпеса человека, типа 8; вируса папилломы человека; вируса БК; вируса JC; оспы; вируса полиомиелита; вируса гепатита В; бокавируса человека; парвовируса В19; астровируса человека; вируса Норуолк; коксакивируса; вируса гепатита А; полиовируса; риновируса; вируса тяжелого острого респираторного синдрома; вируса гепатита С; вируса желтой лихорадки; вируса денге; вируса Западного Нила; вируса краснухи; вируса гепатита Е; вируса иммунодефицита человека (ВИЧ); вируса гриппа; вируса гуанарито; вируса Хунин; вируса Ласса; вируса Мачупо; вируса Сабиа; вируса конго-крымской геморрагической лихорадки; вируса Эбола; вируса Марбург; вируса кори; вируса эпидемического паротита; вируса парагриппа; респираторно-синцитиального вируса; вируса метапневмо человека; вируса Хендра; вируса Нипах; вируса бешенства; гепатита Д; ротавируса; орбивируса; кольтивируса; вируса Банна; энтеровируса человека; Ханта вируса; вируса Западного Нила; ближневосточного респираторного синдрома Коронавируса; вируса японского энцефалита; везикулярного экзантернавируса; и восточного лошадиного энцефалита.

В некоторых вариантах реализации вирус представляет собой штамм гриппа А или гриппа В или их комбинации. В некоторых вариантах реализации штамм гриппа А или гриппа В связан с птицами, свиньями, лошадьми, собаками, людьми или приматами, отличными от человека. В некоторых вариантах реализации антигенный полипептид кодирует белок гемагглютинин или его фрагмент. В некоторых вариантах реализации белок гемагглютинин представляет собой HI, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18 или его фрагмент. В некоторых вариантах реализации белок гемагглютинин не содержит головной домен (HA1). В некоторых вариантах реализации белок гемагглютинин содержит часть головного домена (HA1). В некоторых вариантах реализации белок гемагглютинин не содержит цитоплазматический домен. В некоторых вариантах реализации белок гемагглютинин содержит часть цитоплазматического домена. В некоторых вариантах реализации белок гемагглютинин представляет собой укороченный белок гемагглютинин. В некоторых вариантах реализации укороченный белок

гемагглютинин содержит часть трансмембранного домена. В некоторых вариантах реализации аминокислотная последовательность белка гемагглютинина или его фрагмента имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей гемагглютинина, представленных в Таблице 9. В некоторых вариантах реализации вирус выбран из группы, состоящей из H1N1, H3N2, H7N9 и H10N8.

В некоторых вариантах реализации инфекционный агент представляет собой штамм бактерий, выбранный из Mycobacterium tuberculosis, Clostridium difficile, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa и Acinetobacter baumannii. В некоторых вариантах реализации бактерия устойчива к одному или более антибиотикам. В некоторых вариантах реализации бактерия представляет собой Clostridium difficile. В некоторых вариантах реализации C. difficile является устойчивым к клиндамицину и/или устойчивым к фторхинолонам. В некоторых вариантах реализации бактерия представляет собой S. Aureus. В некоторых вариантах реализации S. aureus является устойчивым к метициллину и/или устойчивым к ванкомицину.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК содержит более одной последовательности экспрессии. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность может кодировать более одного антигенного полипептида. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность одного или более полинуклеотидов РНК кодирует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 антигенных полипептидов. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность одного или более полинуклеотидов РНК кодирует по меньшей мере 10, 15, 20 или 50 антигенных полипептидов. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность одного или более полинуклеотидов РНК кодирует по меньшей мере 2-10, 10-15, 15-20, 20-50, 50-100 или 100-200 антигенных полипептидов.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК содержит только встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты.

Дополнительные аспекты относятся к способу индукции антигенспецифического иммунного ответа у субъекта, включающему введение субъекту любой из вакцин, описанных в настоящем документе, в количестве, эффективном для получения антигенспецифического иммунного ответа. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический иммунный ответ включает Т-клеточный ответ. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический иммунный ответ включает В-клеточный ответ. В некоторых вариантах реализации способ получения антигенспецифического иммунного ответа включает однократное введение вакцины. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает введение одной или более бустерных доз вакцины. В некоторых вариантах реализации вакцину вводят субъекту путем внутрикожной или внутримышечной инъекции.

В аспектах также предлагается любая из вакцин, описанных в настоящем документе, для применения в способе индукции антиген-специфического иммунного ответа у

субъекта. В некоторых вариантах реализации способ включает введение вакцины субъекту в количестве, эффективном для получения антигенспецифического иммунного ответа. В некоторых вариантах реализации вакцины, содержащие кольцевые РНК, вводят в эффективной дозе и с применением схемы введения, так что по меньшей мере один симптом или признак инфекционного заболевания снижается по интенсивности, тяжести или частоте, или проявляется с задержкой в развитии.

В других аспектах предложено применение любой из вакцин, описанных в настоящем документе, в производстве лекарственного средства для применения в способе индукции антигенспецифического иммунного ответа у субъекта, причем способ включает введение вакцины субъекту в количестве, эффективном для получения антигенспецифического иммунного ответа.

В некоторых вариантах реализации адъювантный полипептид содержит лиганд толл-подобного рецептора, цитокин, FLt3-лиганд, антитело, хемокины, химерный белок, эндогенный адъювант, высвобождаемый из умирающей опухоли, и белки ингибирования контрольной точки. В некоторых вариантах реализации адъювантный полипептид представляет собой белок, который прямо или косвенно стимулирует Т-клетки, В-клетки, NK-клетки или миелоидные клетки. В некоторых вариантах реализации адъювантный полипептид увеличивает поглощение, процессинг, презентацию экспрессии антигенного пептида или комплексов МНС на антигенпрезентирующих клетках. В некоторых вариантах реализации адъювантный полипептид способен блокировать МСН посредством понижающей модуляции.

В некоторых вариантах реализации один или более адъювантных полипептидов выбраны из белков, перечисленных в Таблице 10, или их адъювантных фрагментов. В некоторых вариантах реализации экспрессионная последовательность одного или более полинуклеотидов РНК и/или экспрессионная последовательность второго полинуклеотида РНК, каждая независимо, кодирует адъювантный полипептид, выбранный из Таблицы 10, или его адъювантный фрагмент. В некоторых вариантах реализации каждая экспрессионная последовательность одного или более полинуклеотидов РНК выбрана из любой из последовательностей РНК, перечисленных в Таблице 10, или их адъювантных фрагментов.

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе предложен вектор для получения кольцевой РНК, вектор, содержащий необязательную 5'-дуплексобразующую область, фрагмент интрона 3' группы I, необязательно первый спейсер, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экспрессионную последовательность, необязательно второй спейсер, фрагмент интрона 5' группы I и 3'-дуплексобразующую область. В некоторых вариантах реализации эти элементы расположены в векторе в указанном выше порядке. В некоторых вариантах реализации вектор дополнительно содержит внутреннюю 5'-дуплексобразующую область между фрагментом интрона 3' группы I и IRES, и внутреннюю 3'-дуплексобразующую область между экспрессионной последовательностью и фрагментом интрона 5' I группы. В некоторых вариантах реализации внутренние образующие дуплекс области способны образовывать дуплекс друг с другом, но не с

внешними дуплексообразующими областями. В некоторых вариантах реализации внутренние области, образующие дуплекс, являются частью первой и второй прокладок. Дополнительные варианты осуществления включают полинуклеотиды кольцевой РНК, включая полинуклеотиды кольцевой РНК, полученные с использованием векторов, представленных в настоящем документе, композиции, содержащие такую кольцевую РНК, клетки, содержащие такую кольцевую РНК, способы применения и получения таких векторов, кольцевую РНК, композиции и клетки.

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе представлены способы, включающие введение полинуклеотидов кольцевой РНК, представленных в настоящем документе, в клетки для терапии или продукции полезных белков. В некоторых вариантах реализации способ выгоден тем, что обеспечивает продукцию желаемого полипептида внутри эукариотических клеток с более длительным периодом полужизни, чем у линейной РНК, из-за устойчивости кольцевой РНК к рибонуклеазам.

Полинуклеотиды кольцевой РНК не имеют свободных концов, необходимых для опосредованной экзонуклеазой деградации, что делает их устойчивыми к нескольким механизмам деградации РНК и обеспечивает более длительный период полураспада по сравнению с эквивалентной линейной РНК. Циркуляризация может позволить стабилизировать полинуклеотиды РНК, которые обычно имеют короткий период полураспада, и может улучшить общую эффективность экзогенной мРНК в различных приложениях. В одном варианте реализации функциональное время полужизни полинуклеотидов кольцевой РНК, представленных в настоящем документе, в эукариотических клетках (например, клетках млекопитающих, таких как клетки человека), оцениваемое по синтезу белка, составляет по меньшей мере 20 часов (например, по меньшей мере 80 часов).

Определения

В контексте данного документа термины «кольцРНК», или «кольцевой полирибонуклеотид», или «кольцевая РНК» используются взаимозаменяемо и относятся к полирибонуклеотиду, который образует кольцевую структуру посредством ковалентных связей.

В контексте данного документа термин «фрагмент интрона 3' группы I» относится к последовательности с 75% или более сходством с 3'-проксимальным концом природного интрона группы I, включая динуклеотид сайта сплайсинга и необязательно участок последовательности природного экзона.

В контексте данного документа термин «фрагмент интрона 5’ группы I» относится к последовательности с 75% или более сходством с 5'-проксимальным концом природного интрона группы I, включая динуклеотид сайта сплайсинга и необязательно участок последовательности природного экзона.

В контексте данного документа термин «сайт перестановки» относится к участку в интроне группы I, в котором перед перестановкой интрона сделан разрез. Этот разрез генерирует фрагменты интронов 3' и 5' группы I, которые переставляются по обе стороны

от участка РНК-предшественника, подлежащего циркуляризации.

В контексте данного документа термин «сайт сплайсинга» относится к динуклеотиду, который частично или полностью включен в интрон группы I и между которым расщепляется фосфодиэфирная связь во время циркуляризации РНК.

Последовательности экспрессии в полинуклеотидной конструкции могут быть разделены последовательностью «сайта расщепления», которая позволяет полипептидам, кодируемым последовательностями экспрессии, после трансляции экспрессироваться в клетке в виде отдельных и дискретных отдельных полипептидов.

«Саморасщепляющийся пептид» относится к пептиду, который транслируется без пептидной связи между двумя соседними аминокислотами или действует так, что при получении полипептида, содержащего белки и саморасщепляющийся пептид, он немедленно расщепляется или разделяется на отдельные и дискретные первый и второй полипептиды без необходимости какой-либо внешней активности расщепления (например, ферментативного расщепления).

В контексте данного документа термин «терапевтический белок» относится к любому белку, который при введении субъекту прямо или косвенно в форме транслируемой нуклеиновой кислоты оказывает терапевтический, диагностический, и/или профилактический эффект и/или вызывает желаемый биологический и/или фармакологический эффект.

Обычно считается, что каждая α- и β-цепи αβ-TCR имеют два домена или области, а именно вариабельные и константные домены/области. Вариабельный домен состоит из конкатенации вариабельных областей и соединяющихся областей. Таким образом, в настоящем описании и формуле изобретения термин «вариабельный домен TCR-альфа» относится к конкатенации вариабельной области TCR-альфа (TRAV) и соединительной области TCR-альфа (TRAJ), а термин «константный домен TCR-альфа» относится к внеклеточной TCR-альфа константной области (TRAC) или укороченной на С-конце последовательности TRAC. Аналогичным образом, термин «вариабельный домен TCR-бета» относится к конкатенации вариабельных бета-областей TCR (TRBV), областей разнообразия TCR-бета (TRBD) и соединительных областей TCR-бета (TRBJ), а термин «константный домен TCR-бета» относится к внеклеточной TCR-бета константной области (TRBC) или укороченной на С-конце последовательности TRBC.

В контексте данного документа термин «иммуногенный» относится к способности индуцировать иммунный ответ на вещество. Иммунный ответ может быть индуцирован, когда иммунная система организма или определенный тип иммунных клеток подвергается воздействию иммуногенного вещества. Термин «неиммуногенный» относится к отсутствию или отсутствию иммунного ответа выше определяемого порога на вещество. Иммунный ответ не обнаруживается, когда иммунная система организма или определенный тип иммунных клеток подвергается воздействию неиммуногенного вещества. В некоторых вариантах реализации неиммуногенный кольцевой полирибонуклеотид, представленный в настоящем документе, не вызывает иммунный

ответ выше предварительно определенного порога при измерении с помощью анализа иммуногенности. В некоторых вариантах реализации врожденный иммунный ответ не обнаруживается, когда иммунная система организма или определенный тип иммунных клеток подвергается воздействию неиммуногенного кольцевого полирибонуклеотида, как представлено в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации адаптивный иммунный ответ не обнаруживается, когда иммунная система организма или определенный тип иммунных клеток подвергается воздействию неиммуногенного кольцевого полирибонуклеотида, как представлено в настоящем документе.

В контексте данного документа термин «эффективность циркуляризации» относится к измерению результирующего кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с его линейным исходным материалом.

В контексте данного документа термин «эффективность трансляции» относится к скорости или количеству продукции белка или пептида из рибонуклеотидного транскрипта. В некоторых вариантах реализации эффективность трансляции может быть выражена как количество белка или пептида, продуцируемого на заданное количество транскрипта, который кодирует белок или пептид.

Термин «нуклеотид» относится к рибонуклеотиду, дезоксирибонуклеотиду, его модифицированной форме или его аналогу. Нуклеотиды включают виды, которые содержат пурины, например, аденин, гипоксантин, гуанин и их производные, и аналоги, а также пиримидины, т.е., цитозин, урацил, тимин и их производные, и аналоги. Аналоги нуклеотидов включают нуклеотиды, имеющие модификации химической структуры основания, сахара и/или фосфата, включая, но не ограничиваясь ими, пиримидиновые модификации в 5'-положении, пуриновые модификации в 8'-положении, модификации цитозиновых экзоциклических аминов и замену 5-бромурацила; и модификации сахара в положении 2', включая, но не ограничиваясь ими, рибонуклеотиды с модифицированным сахаром, в которых 2'-OH заменен такой группой, как H, OR, R, галоген, SH, SR, NH2, NHR, NR2 или CN, где R представляет собой алкильный фрагмент, как определено в данном документе. Аналоги нуклеотидов также включают нуклеотиды с такими основаниями, как инозин, кевозин, ксантин; сахара, такие как 2'-метилрибоза; неприродные фосфодиэфирные связи, такие как метилфосфонатные, фосфоротиоатные и пептидные связи. Аналоги нуклеотидов включают 5-метоксиуридин, 1-метилпсевдоуридин и 6-метиладенозин.

Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» используются в данном документе взаимозаменяемо для описания полимера любой длины, например, более около 2 оснований, более около 10 оснований, более около 100 оснований, более около 500 оснований, более 1000 оснований или до около 10.000 или более оснований, состоящих из нуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, и могут быть получены ферментативным или синтетическим путем (например, как описано в патенте США № 5948902 и ссылках, цитируемых в нем), которые могут гибридизоваться со встречающимися в природе нуклеиновыми кислотами специфическим для последовательности способом, аналогичным таковому двух встречающихся в природе

нуклеиновых кислот, например, может участвовать во взаимодействиях спаривания оснований Уотсона-Крика. Встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты состоят из нуклеотидов, включая гуанин, цитозин, аденин, тимин и урацил (G, C, A, T и U соответственно).

Термины «рибонуклеиновая кислота» и «РНК», в контексте данного документа, означают полимер, состоящий из рибонуклеотидов.

Термины «дезоксирибонуклеиновая кислота» и «ДНК», в контексте данного документа, означают полимер, состоящий из дезоксирибонуклеотидов.

«Выделенный» или «очищенный» обычно относится к выделению вещества (например, в некоторых вариантах реализации соединения, полинуклеотида, белка, полипептида, полинуклеотидной композиции или полипептидной композиции), так что вещество содержит значительное процентное содержание (например, более чем 1%, более чем 2%, более чем 5%, более чем 10%, более чем 20%, более чем 50% или более, обычно до около 90%-100%) образца, в котором он находится. В некоторых вариантах реализации существенно очищенный компонент содержит по меньшей мере 50%, 80%-85% или 90%-95% образца. Способы очистки представляющих интерес полинуклеотидов и полипептидов хорошо известны в данной области техники и включают, например, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию и седиментацию по плотности. Как правило, вещество считается очищенным, если оно присутствует в образце в количестве по отношению к другим компонентам образца, превышающем количество, присутствующее в нем в природе.

В контексте данного документа термины «дуплексный», «двухцепочечный» или «гибридный» 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.

В контексте данного документа термин «неструктурированный» в отношении РНК относится к последовательности РНК, которая не предсказывается программным обеспечением RNAFold или аналогичными инструментами прогнозирования для формирования структуры (например, шпильки) с самой собой или другими последовательностями в той же молекуле РНК. В некоторых вариантах реализации неструктурированная РНК может быть функционально охарактеризована с использованием анализов защиты от нуклеаз.

В контексте данного документа термин «структурированный» в отношении РНК относится к последовательности РНК, которая не предсказывается программным обеспечением RNAFold или аналогичными инструментами прогнозирования для формирования структуры (например, шпильки) с самой собой или другими последовательностями в той же молекуле РНК.

В контексте данного документа две «области, образующие дуплекс», «плеча

гомологии» или «области гомологии» комплементарны или являются комплементарными друг другу, когда две области имеют достаточный уровень идентичности последовательностей с обратной комплементарностью друг друга, чтобы действовать как субстраты для реакции гибридизации. В контексте данного документа полинуклеотидные последовательности имеют «гомологию», когда они либо идентичны, либо обладают идентичностью последовательности с обратной комплементарностью или «комплементарной» последовательностью. Процент идентичности последовательности между областью, образующей дуплекс, и областью, образующей противоположный дуплекс, с обратным комплементом может быть любым процентом идентичности последовательности, который допускает возможность гибридизации. В некоторых вариантах реализации внутренний дуплексобразующий участок полинуклеотида по данному изобретению способен образовывать дуплекс с другим внутренним дуплексобразующим участком и не образует дуплекс с внешним дуплексобразующим участком.

Говорят, что линейные молекулы нуклеиновых кислот имеют «5'-конец» (5'-конец) и «3'-конец» (3'-конец), поскольку фосфодиэфирные связи нуклеиновой кислоты возникают на 5'- и 3'-углероде сахарных фрагментов замещающих мононуклеотидов. Концевой нуклеотид полинуклеотида, у которого новая связь должна быть с 5'-углеродом, является его 5'-концевым нуклеотидом. Концевой нуклеотид полинуклеотида, у которого новая связь должна быть с 3'-углеродом, является его 3'-концевым нуклеотидом. Терминальный нуклеотид, используемый в данном документе, представляет собой нуклеотид в конце положения 3'- или 5'-конца.

«Транскрипция» означает образование или синтез молекулы РНК РНК-полимеразой с использованием молекулы ДНК в качестве матрицы. Данное изобретение не ограничивается РНК-полимеразой, используемой для транскрипции. Например, в некоторых вариантах реализации можно использовать РНК-полимеразу типа Т7.

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

Следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предоставляется исключительно с целью описания конкретных вариантов реализации изобретения и не подразумевает ограничения изобретения. При использовании в данном описании и прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа, они включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает комбинации двух или более клеток, или целые культуры клеток; ссылка на «полинуклеотид» включает, на практике, множество копий этого полинуклеотида. Если специально не указано или не очевидно из контекста, в контексте данного документа термин «или» понимается как включающий. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение.

Если специально не указано или не очевидно из контекста, используемый в настоящем документе термин «около» понимается как находящийся в диапазоне нормального допуска в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. «Около» можно понимать, как 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 изменены термином «около».

В контексте данного документа термин «кодировать» в широком смысле относится к любому процессу, посредством которого информация в полимерной макромолекуле используется для управления образованием второй молекулы, отличной от первой. Вторая молекула может иметь химическую структуру, отличную от химической природы первой молекулы.

Под «совместным введением» подразумевается введение терапевтического средства, предусмотренного в настоящем документе, в сочетании с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, достаточно близкими по времени, так что терапевтическое средство, предусмотренное в настоящем документе, может усиливать действие одного или более дополнительных терапевтических средств, или наоборот.

Термины «лечить» и «предотвращать», а также слова, вытекающие из них, в том виде, в каком они используются в данном документе, не обязательно подразумевают 100% или полное лечение или профилактику. Скорее, существуют различные степени лечения или профилактики, которые специалист в данной области техники признает имеющими потенциальную пользу или терапевтический эффект. Лечение или профилактика, обеспечиваемые раскрытым в данном документе способом, могут включать лечение или профилактику одного, или более состояний или симптомов заболевания. Кроме того, для целей настоящего документа «профилактика» может включать отсрочку начала заболевания или его симптома, или состояния.

В контексте данного документа термин «аутоиммунитет» определяется как стойкие и прогрессирующие иммунные реакции на неинфекционные аутоантигены, в отличие от инфекционных неаутоантигенов бактериальных, вирусных, грибковых или паразитарных организмов, которые вторгаются и сохраняются внутри млекопитающих и человека. Аутоиммунные состояния включают склеродермию, болезнь Грейвса, болезнь Крона, болезнь Сьергена, рассеянный склероз, болезнь Хашимото, псориаз, тяжелую миастению, синдромы аутоиммунной полиэндокринопатии, сахарный диабет I типа (TIDM), аутоиммунный гастрит, аутоиммунный увеоретинит, полимиозит, колит и тиреоидит, а также генерализованные аутоиммунные заболевания, типичным примером которых служит волчанка человека. «Аутоантиген» или «аутоантиген» в данном контексте относится к антигену или эпитопу, который является нативным для млекопитающего и является иммуногенным для указанного млекопитающего.

В контексте данного документа термин «экспрессионная последовательность»

может относиться к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует продукт, например, пептид или полипептид, регуляторную нуклеиновую кислоту или некодирующую нуклеиновую кислоту. Примерная экспрессионная последовательность, которая кодирует пептид или полипептид, может содержать множество нуклеотидных триад, каждая из которых может кодировать аминокислоту и называется «кодоном».

В контексте данного документа термин «спейсер» относится к области полинуклеотидной последовательности в диапазоне от 1 нуклеотида до сотен или тысяч нуклеотидов, разделяющей два других элемента в полинуклеотидной последовательности. Последовательности могут быть заданы или могут быть случайными. Спейсер обычно не является кодирующим. В некоторых вариантах реализации спейсеры включают области, образующие дуплекс.

В контексте данного документа термин «участок внутренней посадки рибосомы» или «IRES» относится к последовательности РНК или структурному элементу размером от 10 нуклеотидов до 1000 нуклеотидов или более, способному инициировать трансляцию полипептида в отсутствие типичной структуры кэпа РНК. Длина IRES обычно составляет от около 500 до около 700 нуклеотидов.

В контексте данного документа термин «участок миРНК» относится к участку нуклеотидов в полинуклеотиде, который способен образовывать дуплекс по меньшей мере с 8 нуклеотидами природной последовательности миРНК.

В контексте данного документа термин «эндонуклеазный сайт» относится к участку нуклеотидов в полинуклеотиде, который способен распознаваться и расщепляться белком-эндонуклеазой.

В контексте данного документа термин «бицистронная РНК» относится к полинуклеотиду, который включает две последовательности экспрессии, кодирующие два разных белка. Эти последовательности экспрессии часто разделены расщепляемым пептидом, таким как сайт 2A или последовательность IRES.

В контексте данного документа термин «совместная композиция» относится к составу наночастиц, содержащему две или более нуклеиновых кислот, или нуклеиновую кислоту и другое активное лекарственное вещество. Как правило, соотношения являются эквимолярными или определяются в логометрическом количестве двух или более нуклеиновых кислот, или нуклеиновой кислоты и другого активного лекарственного вещества.

В контексте данного документа термин «переносчик» включает любые стандартные фармацевтические носители, разбавители, вспомогательные вещества и т.п., которые обычно предназначены для применения в связи с введением биологически активных агентов, включая нуклеиновые кислоты.

В данном контексте словосочетание «липидная наночастица» относится к переносчику, содержащему один или более липидов (например, в некоторых вариантах реализации катионные липиды, некатионные липиды и липиды, модифицированные ПЭГ).

В контексте данного документа словосочетание «катионный липид» относится к

любому из ряда видов липидов, которые имеют суммарный положительный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH.

В контексте данного документа словосочетание «некатионный липид» относится к любому нейтральному, цвиттерионному или анионному липиду.

В контексте данного документа словосочетание «анионный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный отрицательный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH.

В контексте данного документа словосочетание «ионизируемый липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд при выбранном значении pH, таком как физиологический pH 4, и нейтральный заряд при других значениях pH, таких как физиологический pH 7.

Термин «антитело» (Ab) включает, без ограничения, гликопротеиновый иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном. В общем, антитело может содержать по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающей молекулой. Каждая H-цепь может содержать вариабельную область тяжелой цепи (обозначаемую в данном документе сокращенно 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 вариабельную область легкой цепи (обозначаемую в данном документе сокращенно как VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи может содержать один константный домен, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены 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, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий 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, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), антитела человека, сконструированные антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две тяжелые цепи и две молекулы легкой цепи, 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 обозначаемые в настоящем документе как «конъюгаты антител»), гетероконъюгированные антитела, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или

одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), камелизированные антитела, аффитело, Fab-фрагменты, $F(ab')_2$-фрагменты, дисульфид-связанные вариабельные 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 реализации антитела, описанные в настоящем документе, относятся к популяциям поликлональных антител.

Иммуноглобулин может быть получен из любого широко известного изотипа, включая, но не ограничиваясь этим, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. «Изотип» относится к классу или подклассу Ab (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Термин «антитело» включает, например, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные Ab; Ab человека или не принадлежащие человеку; полностью синтетическое Ab; и одноцепочечное Ab. Ab нечеловеческого происхождения может быть гуманизировано рекомбинантными способами для снижения его иммуногенности у человека. Если прямо не указано и в контексте не указано иное, термин «антитело» также включает антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающую часть любого из вышеупомянутых иммуноглобулинов, а также одновалентный и двухвалентный фрагмент или часть, а также одиночную цепь Ab.

«Антигенсвязывающая молекула», «антигенсвязывающая часть» или «фрагмент антитела» относится к любой молекуле, которая содержит антигенсвязывающие части (например, CDR) антитела, из которого получена молекула. Антигенсвязывающая молекула может включать области, определяющие антигенную комплементарность (CDR). Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, dAb, линейные антитела, антитела scFv и мультиспецифические антитела, образованные из антигенсвязывающих молекул. Пептитела (т.е. Fc-слитые молекулы, содержащие пептидсвязывающие домены) являются еще одним примером подходящих антигенсвязывающих молекул. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на опухолевой клетке. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на клетке, пораженной гиперпролиферативным заболеванием, или с вирусным или бактериальным антигеном. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула связывается с BCMA. В дополнительных вариантах реализации антигенсвязывающая молекула представляет собой фрагмент антитела, включающий одну или более его областей, определяющих комплементарность (CDR), которые специфически связываются с антигеном. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула содержит авимеры или состоит из них.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен», в контексте данного документа, используется взаимозаменяемо и является общепринятым в данной области техники. Вариабельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой или тяжелой цепи, как правило, к амино-концу от 110 до 120 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и около 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. Вариабельность последовательности сосредоточена в тех областях, которые называются областями, определяющими комплементарность (CDR), в то время как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Без ограничений каким-либо конкретным механизмом или теорией полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей главным образом ответственны за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В некоторых вариантах реализации вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. В некоторых вариантах реализации вариабельная область содержит CDR грызунов или мышей, и каркасные области человека (FR). В частных вариантах реализации вариабельная область представляет собой вариабельную область примата (например, человека или примата, отличных от человека). В некоторых вариантах реализации вариабельная область содержит CDR грызунов или мышей, и каркасные области (FR) приматов (например, приматов, отличных от человека).

Термины «VL» и «домен VL» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы.

Термины «VH» и «домен VH» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы.

Обычно используется ряд определений CDR: Нумерация по Kabat, нумерация по 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. Определение контакта основано на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. Термин «нумерация по Kabat» и подобные термины признаны в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы. В некоторых аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации Kabat (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 and 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). Согласно нумерации по Kabat CDR в составе молекулы тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот с 31 по 35, что необязательно может включать одну или две дополнительные аминокислоты после 35 (обозначаемые в системе нумерации по Kabat как 35A и 35B) (CDR1), в положениях аминокислот с 50 по 65 (CDR2) и в положениях аминокислот с 95 по 102 (CDR3). Согласно нумерации по Kabat CDR в составе молекулы легкой цепи антитела обычно присутствуют

в положениях аминокислот с 24 по 34 (CDR1), в положениях аминокислот с 50 по 56 (CDR2) и в положениях аминокислот с 89 по 97 (CDR3). В конкретном варианте реализации CDR описанных в данном документе антител определяли в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В некоторых аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации Chothia, которая относится к расположению 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). Как правило, при использовании нумерации по методу Kabat петля CDR-H1 Chothia присутствует на аминокислотах тяжелой цепи с 26 по 32, 33 или 34, петля CDR-H2 Chothia присутствует на аминокислотах тяжелой цепи с 52 по 56, и петля CDR-H3 Chothia присутствует в аминокислотах тяжелой цепи с 95 по 102, в то время как петля CDR-L1 Chothia присутствует в аминокислотах легкой цепи с 24 по 34, петля CDR-L2 Chothia присутствует в аминокислотах легкой цепи с 50 по 56, а петля Chothia CDR-L3 присутствует в аминокислотах легкой цепи с 89 по 97. Конец петли Chothia CDR-HI при нумерации с использованием соглашения о нумерации Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствует, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют и 35A, и 35B, петля заканчивается на 34). В конкретном варианте реализации CDR описанных в данном документе антител определяли в соответствии со схемой нумерации по Chothia.

В контексте данного документа термины «константная область» и «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют значение, обычно понимаемое в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с рецептором Fc. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина.

Как правило, термин «аффинность связывания» относится к силе суммы нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящем документе термин «аффинность связывания» относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие между членами пары связывающихся компонентов (например, антителом и антигеном) при их соотношении 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно представить в виде константы диссоциации (KD или Kd). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, равновесную константу диссоциации (KD) и равновесную константу ассоциации (KA или Ka). KD рассчитывается как частное koff/kon, тогда как KA рассчитывается как частное

kon/koff. kon относится к константе скорости ассоциации, например, антитело к антигену, а koff относится к диссоциации, например, антитело к антигену. kon и koff могут быть определены способами, известными специалистам в данной области техники, такими как BIACORE® или KinExA.

В контексте данного документа термин «консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В некоторых вариантах реализации один или более аминокислотных остатков в CDR или в каркасной области (областях) антитела или его антигенсвязывающей молекулы могут быть заменены аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью.

В контексте данного документа термин «гетерологичная последовательность» означает экзогенную последовательность, которая не является нативной или не присутствует в природе в клетке или организме, экспрессирующем данную последовательность.

В контексте настоящего документа «эпитоп» представляет собой известный в данной области техники термин и относится к локализованной области антигена, с которой антитело может специфично связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или смежный эпитоп), или эпитоп может, например, объединяться из двух или более несмежных участков полипептида или полипептидов (конформационных, нелинейных, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах реализации эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа, анализов ELISA, обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (например, масс-спектрометрия с электрораспылением жидкостной хроматографии), анализов сканирования олигопептидов на основе матрицы и/или картирования мутагенеза (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществить с использованием любого из известных в данной области способов (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). Антитело: кристаллы антигена могут быть изучены с использованием хорошо известных способов дифракции рентгеновских лучей и могут быть уточнены с использованием компьютерного

программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; патентную публикацию США № 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).

В контексте данного документа, антигенсвязывающая молекула, антитело или его антигенсвязывающая молекула «перекрестно конкурируют» с эталонным антителом или его эталонным антигенсвязывающим фрагментом, если взаимодействие между антигеном и первой связывающей молекулой, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом блокирует, ограничивает, ингибирует или иным образом снижает способность эталонной связывающей молекулы, эталонного антитела или его эталонного антигенсвязывающего фрагмента взаимодействовать с антигеном. Перекрестная конкуренция может быть полной, например, связывание связывающей молекулы с антигеном полностью блокирует способность эталонной связывающей молекулы связывать антиген, или может быть частичной, например, связывание связывающей молекулы с антигеном снижает способность эталонной связывающей молекулы связывать антиген. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывает тот же или перекрывающийся эпитоп, что и эталонная антигенсвязывающая молекула. В других вариантах реализации антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывает эпитоп, отличный от эталонной антигенсвязывающей молекулы. Для определения того, конкурирует ли одна антигенсвязывающая молекула с другой, можно использовать многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА); твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА); сэндвич-конкурентный анализ (Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый ИФА (Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press); РИА с прямым мечением в твердой фазе с использованием метки 1-125 (Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); твердофазный прямой ИФА с биотином и авидином (смотрите, например, Cheung, et al., 1990, Virology 176:546-552); и прямой РИА с мечением (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82).

В контексте настоящего документа термины «иммуноспецифично связывается», «иммуноспецифично распознает», «специфично связывается» и «специфично распознает» являются равнозначными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, связывающимся с антигеном (например, эпитоп или иммунный комплекс), поскольку такое связывание понимается специалистом в данной области. Например, молекула, которая

специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, как определено, например, с помощью, иммуноанализами, прибором BIACORE®, KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или другими анализами, известными в данной области техники. В конкретном варианте реализации молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с антигеном с КА, который составляет по меньшей мере 2 log, 2,5 log, 3 log, 4 log или более чем КА, когда молекулы связываются с другим антигеном.

Как определено в данном документе, термин «антиген» относится к молекуле, которая связывается с антигенсвязывающей молекулой, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Например, антиген может вызывать в организме врожденный или адаптивный иммунный ответ. Антигены могут представлять собой любые иммуногенные вещества, включая, в частности, белки, полипептиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды и т.п. В некоторых вариантах реализации антигены получают из инфекционных агентов.

Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от того же индивидуума, которому этот материал затем повторно вводится. Например, описанный в настоящем документе метод генной аутологичной клеточной терапии (eACT™) включает сбор лимфоцитов у пациента, которые затем конструируют для экспрессии, например, конструкции CAR, а затем снова вводят тому же пациенту.

Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от одного индивидуума, который затем вводится другому индивидууму того же вида, например, при аллогенной трансплантации Т-клеток.

«Цитокин», используемый в данном документе, относится к белку, не являющемуся антителом, который высвобождается одной клеткой и может взаимодействовать со второй клеткой, опосредуя ответ во второй клетке. «Цитокин», используемый в данном документе, относится к белкам, высвобождаемым одной клеточной популяцией, которые действуют на другую клетку как межклеточные медиаторы. Цитокин может эндогенно экспрессироваться клеткой или вводиться субъекту. Цитокины могут высвобождаться иммунными клетками, включая, но не ограничиваясь ими, макрофаги, В-клетки, Т-клетки, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы и тучные клетки, для распространения иммунного ответа. Цитокины могут индуцировать различные клеточные ответы. Цитокины могут включать гомеостатические цитокины, хемокины, провоспалительные цитокины, эффекторные цитокины 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, но не ограничиваются ими, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15 и интерферон (IFN) гамма. Примеры провоспалительных цитокинов включают, но не ограничиваются ими, 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),

растворимый фактор межклеточной адгезии 1 (sICAM-1), растворимый фактор сосудистой адгезии 1 (sVCAM-1), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста (PLGF). Примеры эффекторных цитокинов включают, но не ограничиваются ими, гранзим A, гранзим B, растворимый лиганд Fas (sFasL), TGF-бета, IL-35 и перфорин. Примеры белков острой фазы включают, но не ограничиваются ими, C-реактивный белок (CRP) и сывороточный амилоид A (SAA).

В контексте данного документа термин «лимфоцит» включает естественные клетки-киллеры (NK), Т-клетки или В-клетки. NK-клетки представляют собой тип цитотоксических (клеточно-токсических) лимфоцитов, которые представляют собой основной компонент врожденной иммунной системы. NK-клетки могут индуцировать апоптоз опухолей и вирусно-инфицированных клеток. Их назвали «естественными киллерами», потому что они не требуют активации для уничтожения клеток-мишеней. Т-клетки играют важную роль в клеточно-опосредованном иммунитете (без участия антител). Рецепторы Т-клеток (TCR) отличают Т-клетки от других типов лимфоцитов. Тимус, специализированный орган иммунной системы, является основным местом созревания Т-клеток. Существует множество типов Т-клеток, в том числе: хелперные Т-клетки (например, CD4+ клетки), цитотоксические Т-клетки (также известные как ТС, цитотоксические Т-лимфоциты, ЦТЛ, Т-киллеры, цитолитические Т-клетки, CD8+ Т-клетки или Т-киллеры). клетки), Т-клетки памяти ((i) стволовые клетки памяти (TSCM), как и наивные клетки, являются 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 многочисленные функциональные признаки, характерные для клеток памяти); (ii) центральные клетки памяти (TCM) экспрессируют L-селектин и CCR7, они секретируют IL-2, но не IFNγ или IL-4, и (iii) эффекторные клетки памяти (TEM), однако, не экспрессируют L-селектин или CCR7, но продуцируют эффекторные цитокины, такие как IFNγ и IL-4), регуляторные Т-клетки (Treg, супрессорные Т-клетки или CD4+CD25+ или CD4+ FoxP3+ регуляторные Т-клетки), натуральные Т-киллеры (NKT) и гамма-дельта Т-клетки. В-клетки, с другой стороны, играют основную роль в гуморальном иммунитете (с участием антител). В-клетки вырабатывающие антитела, способны действовать как антигенпрезентирующие клетки (АПК) и превращаться в В-клетки памяти и плазматические клетки, как короткоживущие, так и долгоживущие, после активации взаимодействием с антигеном. У млекопитающих в костном мозге образуются незрелые В-клетки.

Термин «генно-инженерный» или «сконструированный» относится к способу модификации генома клетки, включая, помимо прочего, удаление кодирующей или некодирующей области, или ее части, или вставку кодирующей области или ее части. В некоторых вариантах реализации модифицированная клетка представляет собой лимфоцит, например, Т-клетку, которая может быть получена 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.

«Иммунный ответ» относится к действию клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных киллеров (NK-клеток), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых молекул, продуцируемых любой из этих клеток или печени (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или элиминации из организма позвоночных вторгшихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

Термин «идентичность последовательности», в контексте данного документа, относятся к степени, в которой последовательности идентичны по принципу «нуклеотид за нуклеотидом» или по принципу «аминокислота за аминокислотой» в окне сравнения. Таким образом, «процент идентичности 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, 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 последовательностях, чтобы получить количество совпадающих позиций, разделив количество совпавших позиций на общее количество позиций в окне сравнения (т.е. размер окна) и умножив результат на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. Включены нуклеотиды и полипептиды, содержащие по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности любой из эталонных последовательностей, описанных в настоящем документе, обычно, когда в случае полипептидов вариант полипептида сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность полипептида, кодируемого эталонной последовательностью.

В контексте данного документа термин «адъювант» относится к лекарственному средству или веществу, которое модулирует иммуногенность антигена.

В контексте данного документа термин «вакцина» относится к композиции, например, веществу или препарату, который стимулирует, индуцирует, вызывает или улучшает иммунитет в организме, например, в организме животного, например, в организме млекопитающего (например, в организме человека). В некоторых вариантах реализации вакцина обеспечивает иммунитет против одного или более заболеваний, или расстройств в организме, включая профилактический и/или терапевтический иммунитет. В некоторых вариантах реализации вакцины могут быть изготовлены, например, из живых, аттенуированных, модифицированных, ослабленных или убитых форм болезнетворных микроорганизмов или полученных из них антигенов, включая комбинации антигенных компонентов. В некоторых вариантах реализации вакцина стимулирует, индуцирует, вызывает или улучшает иммунитет в организме или вызывает, или имитирует иммунный

ответ в организме, не вызывая какого-либо заболевания или расстройства. В некоторых вариантах реализации вакцина вызывает иммунный ответ после введения в ткани, внеклеточное пространство или клетки субъекта. В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды по данному изобретению могут кодировать антиген, и когда полинуклеотиды экспрессируются в клетках, экспрессируемый антиген вызывает желаемый иммунный ответ.

Векторы, РНК-предшественник и кольцевая РНК

В некоторых аспектах в настоящем документе предусмотрены полинуклеотиды кольцевой РНК, содержащие постсплайсинговый фрагмент интрона 3' группы I, необязательно первый спейсер, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экспрессионную последовательность, необязательно второй спейсер и фрагментом интрона 5' группы I после сплайсинга. В некоторых вариантах реализации эти области расположены в таком порядке. В некоторых вариантах реализации кольцевую РНК получают способом, представленным в настоящем документе, или из вектора, представленного в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации транскрипция вектора, представленного в настоящем документе (например, содержащего 5'-дуплексобразующую область, фрагмент интрона 3' группы I, необязательно первый спейсер, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), первую экспрессионную последовательность, полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, вторую экспрессионную последовательность, необязательно второй спейсер, фрагмент интрона 5' группы I и 3'-дуплексобразующую область), приводит к образованию полинуклеотида-предшественника линейной РНК, способного к циркуляризации. В некоторых вариантах реализации этот полинуклеотид-предшественник линейной РНК циркулирует при инкубации в присутствии гуанозинового нуклеотида или нуклеозида (например, GTP) и двухвалентного катиона (например, Mg2+).

В некоторых вариантах реализации векторы и полинуклеотиды РНК-предшественники, предложенные в настоящем документе, содержат первую (5') образующую дуплекс область и вторую (3') образующую дуплекс область. В некоторых вариантах реализации первая и вторая области, образующие дуплекс, могут образовывать идеальные или несовершенные дуплексы. Таким образом, в некоторых вариантах реализации по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% первой и второй области, образующие дуплекс, могут быть образованы парами оснований друг с другом. В некоторых вариантах реализации предсказано, что области, образующие дуплекс, содержат менее 50% (например, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%) спаривания оснований с непреднамеренными последовательностями в РНК (например, с последовательностями, не образующими дуплекс). В некоторых вариантах реализации, включая такие дуплексобразующие области на концах цепи РНК-предшественника и смежные или очень близкие к фрагменту интрона группы I, сближают фрагменты интрона группы I друг с другом, повышая эффективность

сплайсинга. В некоторых вариантах реализации образующие дуплекс области имеют длину от 3 до 100 нуклеотидов (например, 3-75 нуклеотидов в длину, 3-50 нуклеотидов в длину, 20-50 нуклеотидов в длину, 35-50 нуклеотидов в длину, 5-25 нуклеотидов в длину, 9-19 нуклеотидов в длину). В некоторых вариантах реализации дуплексобразующие области составляют около 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 длину. В некоторых вариантах реализации образующие дуплекс области имеют длину от около 9 до около 50 нуклеотидов. В одном варианте реализации образующие дуплекс области имеют длину от около 9 до около 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации образующие дуплекс области имеют длину от около 20 до около 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации образующие дуплекс области имеют длину около 30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах реализации векторы, РНК-предшественник и кольцевая РНК, предложенные в настоящем документе, содержат первый (5') и/или второй (3') спейсеры. В некоторых вариантах реализации включение спейсера между фрагментом интрона 3’ группы I и IRES может сохранять вторичные структуры в этих областях, предотвращая их взаимодействие, тем самым повышая эффективность сплайсинга. В некоторых вариантах реализации первый (между фрагментом интрона 3' группы I и IRES) и второй (между последовательностями экспрессии и фрагментом интрона 5' группы I) спейсеры содержат дополнительные области спаривания оснований, которые, по прогнозам, образуют пары оснований друг с другом, а не первую и вторую области формирования дуплекса. В некоторых вариантах реализации такое спаривание оснований спейсера приводит фрагменты интрона группы I в непосредственную близость друг к другу, дополнительно повышая эффективность сплайсинга. Кроме того, в некоторых вариантах реализации комбинация спаривания оснований между первой и второй формирующими дуплекс областями и отдельно спаривания оснований между первым и вторым спейсерами способствует образованию сплайсингового пузыря, содержащего фрагменты интронов группы I, фланкированные соседними областями базовое спаривание. Типовые спейсеры представляют собой непрерывные последовательности, обладающие одним или более из следующих качеств: Типовые спейсеры представляют собой непрерывные последовательности с одним или более 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 н.; 3) расположен после и рядом с 3'-интронным фрагментом и/или до и рядом с 5'-интронным фрагментом; и 4) содержит один или более из следующих компонентов: а) неструктурированный участок длиной не менее 5 нуклеотидов, б) участок спаривания оснований длиной не менее 5 нуклеотидов с дистальной последовательностью, включая другой спейсер, и в) структурированный участок в конце длиной по меньшей мере 7 нуклеотидов ограничена последовательностью спейсера. Спейсеры могут иметь несколько областей, включая неструктурированную область, область спаривания оснований,

шпильку/структурированную область и их комбинации. В варианте реализации спейсер имеет структурированную область с высоким содержанием GC. В одном варианте реализации область в основании спейсера соединяется с другой областью в том же спейсере. В одном варианте реализации область в основании спейсера соединяется с областью внутри другого спейсера. В одном варианте реализации спейсер содержит одну или более структур в виде шпилек. В одном варианте реализации спейсер содержит одну или более шпилечных структур со стеблем из 4-12 нуклеотидов и петлей из 2-10 нуклеотидов. В одном варианте реализации имеется дополнительный спейсер между фрагментом интрона 3' группы I и IRES. В одном варианте реализации этот дополнительный спейсер предотвращает вмешательство структурированных областей IRES в складку фрагмента интрона 3' группы I или уменьшает степень, в которой это происходит. В некоторых вариантах реализации длина 5'-спейсерной последовательности составляет по меньшей мере 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации 5'-спейсерная последовательность имеет длину не более 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации длина 5'-спейсерной последовательности 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 реализации 5'-спейсерная последовательность представляет собой 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 длину. В одном варианте реализации 5'-спейсерная последовательность представляет собой полиА-последовательность. В другом варианте осуществления последовательность 5'-спейсера представляет собой последовательность полиАС. В одном варианте осуществления спейсер содержит около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% полиАС. В одном варианте осуществления спейсер содержит около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% полипиримидина (C/T или C/U).

В некоторых вариантах реализации фрагмент интрона 3' группы I представляет собой непрерывную 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%) проксимальному фрагменту природного интрона 3' группы I, включая динуклеотид сайта сплайсинга 3' и необязательно соседнюю экзонную последовательность длиной не менее 1 нуклеотида (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов в длину) и не более длины экзона. Как правило, фрагмент интрона 5' группы I представляет собой непрерывную 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%) проксимальному фрагменту 5' природного интрона группы I, включая динуклеотид сайта сплайсинга 5’ и необязательно соседнюю экзонную последовательность длиной не менее 1 нуклеотида (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов в длину) и не более длины экзона. Как описано Umekage et al., (2012), внешние части фрагмента

интрона 3' группы I и фрагмента интрона 5' группы I удаляются при циркуляризации, в результате чего представленная в данном документе кольцевая РНК содержит только часть фрагмента интрона 3' группы I, образованного необязательной экзонной последовательностью длиной по меньшей мере 1 нуклеотид и фрагмент интрона 5' группы I, образованный факультативной экзонной последовательностью длиной по меньшей мере 1 нуклеотид, если такие последовательности присутствовали на нециклизованной РНК-предшественнике. Часть фрагмента интрона 3' группы I, которая сохраняется кольцевой РНК, упоминается в данном документе как «фрагмент интрона 3' группы I после сплайсинга». Часть фрагмента интрона 5' группы I, которая сохраняется кольцевой РНК, упоминается в данном документе как «фрагментом интрона 5' группы I после сплайсинга».

В некоторых вариантах реализации векторы, РНК-предшественник и кольцевая РНК, предложенные в настоящем документе, содержат участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение IRES делает возможной трансляцию одной или более открытых рамок считывания из кольцевой РНК (например, открытых рамок считывания, формирующих экспрессионные последовательности). Элемент IRES привлекает 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; и Mosser et al., BioTechniques 1997 22 150-161.

Доступно множество последовательностей IRES, в том числе последовательности, полученные из широкого спектра вирусов, например, из лидерных последовательностей пикорнавирусов, таких как UTR вируса энцефаломиокардита (EMCV) (Jang et al., J. Virol. (1989) 63: 1651-1660), лидерная последовательность полиомиелита, лидерная последовательность вируса гепатита A, IRES вируса гепатита C, IRES риновируса человека типа 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), гиардиавирус IRES (Garlapati et al., J. Biol. Chem. (2004) 279(5):3389-3397) и т.п.

В некоторых вариантах реализации IRES в последовательности IRES представляет собой последовательность вируса синдрома Таура, вируса триатомы, вируса энцефаломиелита Тейлера, обезьяньего вируса 40, вируса Solenopsis invicta 1, вируса Rhopalosiphum padi, вируса ретикулоэндотелиоза, полиовируса человека 1, кишечного вируса Plautia stali, кашмир вируса пчелы, риновируса человека 2, вируса Homalodisca coagulata-1, вируса иммунодефицита человека типа 1, вируса Himetobi P, вируса гепатита C, вируса гепатита A, вируса гепатита GB, вируса ящура, энтеровируса человека 71, вируса ринита лошадей, Ectropis obliqua picorna-подобного вируса, вируса энцефаломиокардита, вируса дрозофилы C, вируса Коксаки человека B3, тобамовируса крестоцветных, вируса паралича сверчков, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 1, вируса черного маточника, 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, антеннапедии дрозофилы, 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, n.myc человека, Gtx мыши, p27kipl человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, жнеца дрозофилы, Canine Scamper, Ubx дрозофилы, UNR человека, UtrA мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, безволосой дрозофилы, S. cerevisiae TFIID, S. cerevisiae YAP1, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, пикобирнавируса, HCV QC64, козавируса человека E/D, козавируса человека F, козавируса человека JMY, риновируса NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, саливируса A SH1, саливируса FHB, саливируса NG-J1, пареховируса человека 1, крохивируса B, Yc-3, розавируса M-7, шанбавируса A, пасивируса A, пасивируса A 2, эховируса E14, парэховируса человека 5, айчивируса, гепатита A HA16, фопивируса, CVA10, энтеровируса C, энтеровируса D, энтеровируса J, пегивируса человека 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, пегивируса A 1220, пасивируса A 3, сапеловируса, розавируса B, вируса Бакунса, тремовируса A, пазивируса свиней 1, PLV-CHN, пасивируса A, сицинивируса, гепацивируса K, гепацивируса A, BVDV1, вируса пограничной болезни овец, BVDV2, CSFV-PK15C, дицистровируса SF573, пикорноподобного вируса Хубэй, CRPV, саливируса A BN5, саливируса A BN2, саливируса A 02394, саливируса A GUT, саливируса A CH, саливируса A SZ1, саливируса FHB, CVB3, CVB1, эховируса 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 или аптамера к eIF4G.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, представленные в данном документе, содержат более одной последовательности экспрессии.

В некоторых вариантах реализации векторы, предложенные в настоящем документе, содержат 3'-UTR. В некоторых вариантах реализации 3'-UTR происходит от бета-глобина человека, альфа-глобина человека xenopus beta globin, альфа-глобина xenopus, пролактина человека, GAP-43 человека, eEF1al человека, тау-белка человека, TNFα человека, вируса денге, малой мРНК хантавируса, малой мРНК буньявируса, вируса желтой мозаики репы, вируса гепатита C, 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 синдбис, репа вируса складчатости, вируса травления табака или вируса венесуэльского лошадиного энцефалита.

В некоторых вариантах реализации векторы, представленные в настоящем документе, содержат 5’-UTR. В некоторых вариантах реализации 5'-UTR происходит от бета-глобина человека, бета-глобина Xenopus laevis, альфа-глобина человека, альфа-глобина Xenopus laevis, вируса краснухи, вируса табачной мозаики, мышиного Gtx, вируса денге, белка теплового шока 70 кДа, белка 1A, алкогольдегидрогеназы, вируса травления табака, вируса морщинистости репы или тройного лидера аденовируса.

В некоторых вариантах реализации векторы, представленный в данном документе,

вектор содержит полиА-область. В некоторых вариантах реализации участок полиА имеет длину по меньшей мере 12 нуклеотидов, по меньшей мере 30 нуклеотидов или по меньшей мере 60 нуклеотидов.

В некоторых вариантах реализации ДНК (например, вектор), линейная РНК (например, РНК-предшественник) и/или полинуклеотид колцевой РНК, представленный в данном документе, имеет длину от 300 до 15000, от 300 до 14000, от 300 до 13000, от 300 до 12000, от 300 до 11000, от 300 до 10000, от 400 до 9000, от 500 до 8000, от 600 до 7000, от 700 до 6000, от 800 до 5000, от 900 до 5000, от 1000 до 5000, от 1100 до 5000, от 1200 до 5000, от 1300 до 5000, от 1400 до 5000 и/или 1500, и 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид имеет 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 длину. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид имеет 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 длину. В некоторых вариантах реализации длина полинуклеотида ДНК, линейной РНК и/или кольцевой РНК, представленного в настоящем документе, составляет около 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 реализации в настоящем документе представлен вектор. В некоторых вариантах реализации вектор содержит в следующем порядке: a) 5'-дуплексобразующую область, b) фрагмент интрона 3' группы I, c) необязательно первую спейсерную последовательность, d) IRES, e) первую экспрессионную последовательность, f) полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, g) вторую экспрессионную последовательность, h) необязательно вторую спейсерную последовательность, i) фрагмент интрона 5' группы I и j) 3'-дуплексобразующую область. В некоторых вариантах реализации вектор содержит промотор транскрипции выше 5'-дуплексобразующей области.

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе представлен вектор. В

некоторых вариантах реализации вектор содержит в следующем порядке: a) 5'-дуплексобразующую область, b) фрагмент интрона 3' группы I, c) необязательно первую спейсерную последовательность, d) первый IRES, e) первую экспрессионную последовательность, f) второй IRES, g) вторую экспрессионную последовательность, h) необязательно вторую спейсерную последовательность, i) фрагмент интрона 5' группы I и j) 3'-дуплексобразующую область. В некоторых вариантах реализации вектор содержит промотор транскрипции выше 5'-дуплексобразующей области.

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе предусмотрена РНК-предшественник. В некоторых вариантах реализации РНК-предшественник представляет собой линейную РНК, полученную путем транскрипции in vitro вектора, предложенного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации РНК-предшественник содержит в следующем порядке: a) необязательно 5'-дуплексобразующую область, b) фрагмент интрона 3' группы I, c) необязательно первую спейсерную последовательность, d) IRES, e) первую экспрессионную последовательность, f) полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, g) вторую экспрессионную последовательность, h) необязательно вторую спейсерную последовательность, i) фрагмент интрона 5' группы I и j) необязательно 3'-дуплексобразующую область. В некоторых вариантах реализации РНК-предшественник содержит в следующем порядке: a) 5'-дуплексобразующую область, b) фрагмент интрона 3' группы I, c) необязательно первую спейсерную последовательность, d) первый IRES, e) первую экспрессионную последовательность, f) второй IRES, g) вторую экспрессионную последовательность, h) необязательно вторую спейсерную последовательность, i) фрагмент интрона 5' группы I и j) 3'-дуплексобразующую область. РНК-предшественник может быть немодифицированной, частично модифицированной или полностью модифицированной.

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе представлена кольцевая РНК. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК представляет собой кольцевую РНК, продуцируемую вектором, представленным в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК представляет собой кольцевую РНК, полученную путем циркуляризации РНК-предшественника, представленной в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК содержит в следующей последовательности: a) первую спейсерную последовательность, b) IRES, c) первую экспрессионную последовательность, d) полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, e) вторую экспрессионную последовательность, и f) вторую спейсерную последовательность. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК содержит в следующей последовательности: a) фрагмент интрона 3' группы I после сплайсинга, b) первую спейсерную последовательность, c) IRES, d) первую экспрессионную последовательность, e) полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, f) вторую экспрессионную последовательность и g) вторую спейсерную последовательность, h) фрагмент интрона 5' группы I после сплайсинга. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК содержит в следующей

последовательности: a) первую спейсерную последовательность, b) первый IRES, c) первую экспрессионную последовательность, d) второй IRES, e) вторую экспрессионную последовательность, и f) вторую спейсерную последовательность. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК дополнительно содержит часть фрагмента интрона 3' группы I, которая находится на 3'-конце сайта сплайсинга 3'. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК дополнительно содержит часть фрагмента интрона 5' группы I, которая находится на 5'-конце сайта сплайсинга 5'. В некоторых вариантах реализации 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 модифицированной или полностью модифицированной.

В некоторых вариантах реализации предложенная в данном документе кольцевая РНК обладает более высокой функциональной стабильностью, чем мРНК, содержащая такую же экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах реализации предложенная в данном документе кольцевая РНК обладает более высокой функциональной стабильностью, чем мРНК, содержащая ту же экспрессионную последовательность, модификации 5 мЕд, оптимизированную UTR, кэп, и/или полиА-хвост.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в настоящем документе, имеет функциональный период полураспада 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 реализации полинуклеотид кольцевой РНК, предложенный в настоящем документе, имеет функциональный период полувыведения 5-80, 10-70, 15-60 и/или 20-50 часов. В некоторых вариантах реализации циклический РНК-полинуклеотид, представленный в настоящем документе, имеет функциональный период полураспада, превышающий (например, по меньшей мере в 1,5 раза больше, по меньшей мере в 2 раза больше) период полувыведения эквивалентного линейного РНК-полинуклеотида, кодирующего тот же белок. В некоторых вариантах реализации функциональное время полужизни можно оценить путем обнаружения синтеза функционального белка.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК, представленный в настоящем документе, имеет период полураспада 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 реализации полинуклеотид кольцевой РНК, предложенный в настоящем документе, имеет период полувыведения 5-80, 10-70, 15-60 и/или 20-50 часов. В некоторых вариантах реализации циклический РНК-полинуклеотид, представленный в настоящем документе, имеет период полураспада, превышающий (например, по меньшей мере в 1,5 раза больше, по меньшей мере в 2 раза больше) период полувыведения эквивалентного линейного РНК-полинуклеотида, кодирующего тот же белок.

В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК, предложенная в настоящем документе, может иметь более высокую степень экспрессии, чем эквивалентная линейная

мРНК, например, более высокую величину экспрессии через 24 часа после введения РНК в клетки. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК, представленная в настоящем документе, имеет более высокую степень экспрессии, чем мРНК, содержащая ту же экспрессионную последовательность, модификации 5 moU, оптимизированную UTR, кэп и/или полиА-хвост.

В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК, представленная в настоящем документе, может быть менее иммуногенной, чем эквивалентная мРНК, при воздействии на иммунную систему организма или определенный тип иммунных клеток. В некоторых вариантах реализации предложенная в данном документе кольцевая РНК связана с модулированной продукцией цитокинов при воздействии на иммунную систему организма или определенный тип иммунных клеток. Например, в некоторых вариантах реализации предложенная в данном документе кольцевая РНК связана со сниженной продукцией TNFα, RIG-I, IL-2, IL-6, IFNγ и/или интерферона типа 1, например, IFN-β1 при воздействии на иммунную систему организма или определенный тип иммунных клеток по сравнению с мРНК, содержащей ту же экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах реализации предложенная в данном документе кольцевая РНК связана с меньшим количеством TNFα, RIG-I, IL-2, IL-6, IFNγ и/или интерферона типа 1, например, IFN-β1, индукцией транскриптов при воздействии на иммунную систему организма или определенный тип иммунных клеток по сравнению с мРНК, содержащей ту же экспрессионную последовательность. В некоторых вариантах реализации предложенная в данном документе кольцевая РНК менее иммуногенна, чем мРНК, содержащая такие же последовательности экспрессии. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК, представленная в настоящем документе, менее иммуногенна, чем мРНК, содержащая те же последовательности экспрессии, модификации 5 moU, оптимизированную UTR, кэп и/или полиА-хвост.

В некоторых вариантах реализации композиции и способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают РНК (например, кольцРНК) с более высокой стабильностью или функциональной стабильностью, чем эквивалентная линейная РНК, без необходимости модификаций нуклеозидов. В некоторых вариантах реализации способы получения РНК без нуклеозидных модификаций дают более высокий процент полноразмерных транскриптов, чем способы получения РНК, содержащие нуклеозидные модификации, из-за снижения абортивной транскрипции. В некоторых вариантах реализации композиции и способы, описанные в настоящем документе, способны продуцировать большие (например, от 5 т.п.н. до 15 т.п.н., от 6 т.п.н. до 15 т.п.н., от 7 т.п.н. до 15 т.п.н., от 8 т.п.н. до 15 т.п.н., от 9 т.п.н. до 15 т.п.н., от 10 т.п.н. до 15 т.п.н., от 11 т.п.н. до 15 т.п.н., от 12 т.п.н. до 15 т.п.н., от 13 т.п.н. до 15 т.п.н., от 14 т.п.н. до 15 т.п.н., от 5 т.п.н. до 10 т.п.н., от 6 т.п.н. до 10 т.п.н., от 7 т.п.н. до 10 т.п.н., от 8 т.п.н. до 10 т.п.н., от 9 т.п.н. до 10 т.п.н., 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 добавленной абортивной транскрипции, связанной с РНК, содержащей нуклеозидные модификации.

В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК, предложенная в настоящем документе, может быть трансфицирована в клетку как есть или может быть трансфицирована в форме ДНК-вектора и транскрибирована в клетке. Транскрипция кольцевой РНК из трансфицированного ДНК-вектора может осуществляться с помощью добавленных полимераз или полимераз, кодируемых нуклеиновыми кислотами, трансфицированными в клетку, или предпочтительно с помощью эндогенных полимераз.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК, предложенный в настоящем документе, содержит модифицированные нуклеотиды РНК и/или модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах реализации модифицированный нуклеозид представляет собой m^5C (5-метилцитидин). В другом варианте модифицированный нуклеозид представляет собой m^5U (5-метилуридин). В другом варианте модифицированный нуклеозид представляет собой m^6A (N^6-метиладенозин). В другом варианте модифицированный нуклеозид представляет собой s^2U (2-метилуридин). В другом варианте модифицированный нуклеозид представляет собой Ψ (псевдоуридин). В другом варианте модифицированный нуклеозид представляет собой Um (2'-O-метилуридин). В других вариантах реализации модифицированный нуклеозид представляет собой m^1A (1-метиладенозин); m^2A (2-метиладенозин); Am (2'-O-метиладенозин); ms^2 m^6A (2-метилтио-N^6-метиладенозин); i^6A (N^6-изопентениладенозина); ms^2i6A (2-метилтио-N^6 изопентениладенозина); io^6A (N^6--(цис-гидроксиизопентенил)аденозин); ms^2io^6A (2-метилтио-N^6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин); g^6A (N^6-глицинилкарбамоиладенозин); t^6A (N^6-треонилкарбамоиладенозин); ms^2t^6A (2-метилтио-N^6-треонилкарбамоиладенозин); m^6t^6A (N^6-метил-N^6-треонилкарбамоиладенозин); hn^6A(N^6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин); ms^2hn^6A (2-метилтио-N^6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин); Ar(p) (2'-O-рибозиладенозин (фосфат)); I (инозин); m^1I (1-метилинозин); m^1Im (1,2'-O-диметилинозин); m^3C (3-метилцитидин); Cm (2'-O-метилцитидин); s^2C (2-тиоцитидин); ac^4C (N^4-ацетилцитидин); f^5C (5-формилцитидин); m^5Cm (5,2'-O-диметилцитидин); ac^4Cm (N^4-ацетил-2'-O-метилцитидин); k^2C (лизидин); m^1G (1-метилгуанозин); m^2G (N^2-метилгуанозин); m^7G (7-метилгуанозин); Gm (2'-O-метилгуанозин); $m^2{}_2G$ (N^2,N^2-диметилгуанозин); m^2Gm (N^2,2'-O-диметилгуанозин); $m^2{}_2Gm$ (N^2,N^2,2'-O-триметилгуанозин); Gr(p) (2'-O-рибозилгуанозин(фосфат)); yW (вибутозин); o_2yW (пероксивибутозин); OHyW (гидроксивибутозин); OHyW* (недомодифицированный гидроксивибутозин); imG (висозин); mimG (метилвиозин); Q (кевозин); oQ (эпоксикевозин); galQ (галактозилкевозин); manQ (маннозилкевозин); $preQ_0$ (7-циано-7-деазагуанозин); $preQ_1$ (7-аминометил-7-деазагуанозин); G^+ (археозин); D (дигидроуридин); m^5Um (5,2'-O-диметилуридин); s^4U (4-тиуридин); m^5s^2U (5-метил-2-тиуридин); s^2Um (2-тио-2'-O-метилуридин); acp^3U (3-(3-амино-3-карбоксипропил)уридин); ho^5U (5-гидроксиуридин); mo^5U (5-метоксиуридин); cmo^5U (уридин-5-оксиуксусная кислота); $mcmo^5U$ (метиловый эфир уридина 5-оксиуксусной кислоты); chm^5U (5-(карбоксигидроксиметил)уридин)); $mchm^5U$ (метиловый эфир 5-

(карбоксигидроксиметил)уридина); mcm^{5}U (5-метоксикарбонилметилуридин); mcm^{5}Um (5-метоксикарбонилметил-2'-O-метилуридин); mcm^{5}s^{2}U (5-метоксикарбонилметил-2-тиуридин); nm^{5}S^{2}U (5-аминометил-2-тиуридин); mnm^{5}U (5-метиламинометилуридин); mnm^{5}s^{2}U (5-метиламинометил-2-тиуридин); mnm^{5}se^{2}U (5-метиламинометил-2-селенуридин); ncm^{5}U (5-карбамоилметилуридин); ncm^{5}Um (5-карбамоилметил-2'-O-метилуридин); cmnm^{5}U (5-карбоксиметиламинометилуридин); cmnm^{5}Um (5-карбоксиметиламинометил-2'-O-метилуридин); cmnm^{5}s^{2}U (5-карбоксиметиламинометил-2-тиуридин); m^6 $_2$A (N^6,N^6-диметиладенозин); Im (2'-O-метилинозин); m^{4}C (N^4-метилцитидин); m^{4}Cm (N^4,2'-O-диметилцитидин); hm^{5}C (5-гидроксиметилцитидин); m^{3}U (3-метилуридин); cm^{5}U (5-карбоксиметилуридин); m^{6}Am (N^6,2'-O-диметиладенозин); m^6 $_2$Am (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^{3}Um (3,2'-O-диметилуридин); m^{5}D (5-метилдигидроуридин); f^{5}Cm (5-формил-2'-O-метилцитидин); m^{1}Gm (1,2'-O-диметилгуанозин); m^{1}Am (1,2'-O-диметиладенозин); τm ^{5}U (5-тауринометилуридин); τm^{5}s^{2}U (5-тауринометил-2-тиуридин)); imG-14 (4-деметилвиозин); imG2 (изовиозин); или ac^{6}A (N^6-ацетиладенозин).

В некоторых вариантах реализации модифицированный нуклеозид может включать соединение, выбранное из группы из: пиридин-4-онрибонуклеозида, 5-азауридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиуридина, 4-тио-псевдоуридина, 2-тио-псевдоуридина, 5-гидроксиуридина, 3-метилуридина, 5-карбоксиметил-уридина, 1-карбоксиметил-псевдоуридина, 5-пропинил-уридина, 1-пропинил-псевдоуридина, 5-тауринометилуридина, 1-тауринометил-псевдоуридина, 5- тауринометил-2-тиоуридина, 1-тауринометил-4-тиоуридина, 5-метилуридина, 1-метилпсевдоуридина, 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 1-метил-1-деаза-псевдоуридина, 2-тио-1-метил-1-деаза-псевдоуридина, дигидроуридина, дигидропсевдоуридина, 2-тио-дигидроуридина, 2-тио-дигидропсевдоуридина, 2-метоксиуридина, 2-метокси-4- тиоуридина, 4-метоксипсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 5-азацитидина, псевдоизоцитидина, 3-метилцитидина, N4-ацетилцитидина, 5-формилцитидина, N4-метилцитидина, 5-гидроксиметилцитидина, 1-метил-псевдоизоци тидина, пирроло-цитидина, пирроло-псевдоизоцитидина, 2-тио-цитидина, 2-тио-5-метил-цитидина, 4-тио-псевдоизоцитидина, 4-тио-1-метил-псевдоизоцитидина, 4-тио-1-метил- 1-деаза-псевдоизоцитидина, 1-метил-1-деаза-псевдоизоцитидина, зебуларина, 5-аза-зебуларина, 5-метил-зебуларина, 5-аза-2-тио-зебуларина, 2-тио-зебуларина, 2-метокси-цитидина, 2-метокси-5-метил-цитидина, 4-метокси-псевдоизоцитидина, 4-метокси-1-метил-псевдоизоцитидина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина, 7-деаза-аденина, 7-деаза-8-аза-аденина, 7-деаза-2-аминопурина, 7-деаза-8-аза-2-аминопурина, 7-деаза-2,6-диаминопурина, 7-деаза-8-аза-2,6-диаминопурина, 1- метиладенозина, N6-метиладенозина, N6-изопентениладенозина, N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозина, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозина, N6-глицинилкарбамоиладенозина, N6-треонилкарбамоиладенозина, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозина, N6,N6-диметиладенозина, 7-метиладенина, 2-метилтиоаденина, 2-метоксиаденина, инозина, 1-

метил-иноина, виозина, вибутозина, 7-деаза-гуанозина, 7-деаза-8-аза-гуанозина, 6-тио-гуанозина, 6-тио-7-деаза-гуанозина, 6-тио-7-деаза-8-аза-гуанозина, 7-метилгуанозина, 6-тио-7-метилгуанозина, 7-метилинозина, 6-метоксигуанозина, 1-метилгуанозина, N2-метилгуанозина, N2,N2-диметилгуанозина, 8-оксогуанозина, 7- метил-8-оксогуанозина, 1-метил-6-тиогуанозина, N2-метил-6-тиогуанозина и N2,N2-диметил-6-тиогуанозина. В другом варианте модификации независимо выбираны из группы, состоящей из 5-метилцитозина, псевдоуридина и 1-метилпсевдоуридина.

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

В конкретных вариантах реализации полинуклеотиды могут быть оптимизированы по кодонам. 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, помимо прочего, один или более 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 набор генов, (iii) систематические вариации кодонов, включая контекст, (iv) вариация кодонов в соответствии с их декодированием тРНК, (v) вариация кодонов в соответствии с GC %, либо в целом, либо в одном положении триплета, (vi) изменение степени сходства с эталонной последовательностью, например, встречающейся в природе последовательностью, (vii) изменение частоты отсечки кодонов, (viii) структурные свойства мРНК, транскрибированные из последовательности ДНК, (ix) предварительные знания о функции последовательностей ДНК, на которых должен основываться дизайн набора кодоновых замен, и/или (x) систематическое изменение наборов кодонов для каждой аминокислоты. В некоторых вариантах реализации кодон-оптимизированный полинуклеотид может свести к минимуму коллизии рибозимов и/или ограничить структурную интерференцию между экспрессионной последовательностью и IRES.

В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК, представленная в настоящем документе, продуцируется внутри клетки. В некоторых вариантах реализации РНК-предшественник транскрибируется с использованием ДНК-матрицы (например, в некоторых вариантах реализации с использованием вектора, представленного в настоящем документе) в цитоплазме с помощью РНК-полимеразы бактериофага или в ядре с помощью РНК-полимеразы II хозяина, а затем циркулирует.

В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК по настоящему изобретению вводится животному (например, человеку) таким образом, что внутри животного экспрессируется полипептид, кодируемый кольцевой молекулой РНК.

Полезная нагрузка

Вакцины, содержащие кольцевую РНК по данному изобретению содержат один или более полинуклеотидов кольцевой РНК, которые кодируют один или более белков дикого типа или сконструированных белков, пептидов или полипептидов (например, антигены, адъюванты или адъювантоподобные белки). В некоторых вариантах реализации один или более полинуклеотидов кольцевой РНК кодируют антиген или адъювант, полученные из инфекционного агента. В некоторых вариантах реализации инфекционный агент, из которого получен или сконструирован антиген, или адъювант, включает, но не ограничивается ими, вирус, бактерию, грибок, простейшее и/или паразита. В некоторых вариантах реализации антиген представляет собой вирусный антиген. В одном варианте реализации антиген представляет собой антиген SARS-CoV-2. В одном варианте реализации антиген представляет собой спайковый белок SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК содержит более одной последовательности экспрессии. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность может кодировать более одного антигенного полипептида. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность одного или более полинуклеотидов РНК кодирует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 антигенных полипептидов. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность одного или более полинуклеотидов РНК кодирует по меньшей мере 10, 15, 20 или 50 антигенных полипептидов. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность одного или более полинуклеотидов РНК кодирует по меньшей мере 2-10, 10-15, 15-20, 20-50, 50-100 или 100-200 антигенных полипептидов.

В одном варианте реализации антиген выбран или получен из группы, состоящей из ротавируса, вируса ящура, вируса гриппа А, вируса гриппа В, вируса гриппа С, H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7, парагриппа человека типа 2, вируса простого герпеса, вируса Эпштейна-Барр, вируса ветряной оспы, свиного герпесвируса 1, цитомегаловируса, лиссавируса, Bacillus anthracis, сибирской язвы PA и производных, полиовируса, гепатита А, гепатита В, гепатита С, гепатита Е, вируса чумы крупного рогатого скота, вируса венесуэльского конского энцефаломиелита, вируса лейкемии кошек, реовируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса лихорадки Ласса, вируса полиомы, парвовируса собак, вируса папилломы, вируса клещевого энцефалита, вируса чумы крупного рогатого скота, видов риновирусов человека, видов энтеровирусов, менговирусов, парамиксовируса, вируса инфекционного бронхита птиц, вируса Т-клеточного лейкоза-лимфомы человека 1, вируса иммунодефицита человека-1, вируса иммунодефицита человека-2, вируса лимфоцитарного хориоменингита, парвовируса В19, аденовируса, вируса краснухи, вируса желтой лихорадки, вируса денге, респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота, вируса короны, Bordetella pertussis, Bordetella bronchiseptica, Bordetella parapertussis, Brucella abortis, Brucella melitensis, Brucella suis, Brucella ovis, виды Brucella, Escherichia coli, видов Salmonella, Salmonella typhi, Streptococci, Vibrio cholera, Vibrio parahaemolyticus, Shigella, Pseudomonas,

туберкулез, avium, Bacille Calmette Guerin, Mycobacterium leprae, пневмококков, Staphlylococci, видов Enterobacter, Rochalimaia henselae, Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida, Chlamydia trachomatis, Chtalypsi, Lymphogranuloma venereum, Treponema pallidum, видов Haemophilus, Mycoplasma bovigenitalium, Mycoplasma pulmonis, видов Mycoplasma, Borrelia burgdorferi, Legionalla pneumophila, Colstridium botulinum, Corynebacterium diphtheriae, Yersinia entercolitica, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Rickettsiahraffeenphachiis, ocytophilum, Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, шистосом, трипаносом, видов Leishmania, филяриальных нематод, трихомониаз, саркоспоридиаз, Taenia saginata, Taenia solium, Leishmania, Toxoplasma gondii, Trichinella Spiralis, кокцидиоз, Eimeria Canbicida, Cryptococcus neoformans Aspergillus fumigatus, кокцидиоидомикоз, Neisseria gonorrhoeae, белка циркумспорозоита малярии, белка мерозоита малярии, белка поверхностного антигена трипаносомы, коклюша, альфавирусов, аденовируса, дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, белка наружной мембраны менингококка, белка М стрептококка, гемагглютинин гриппа, ракового антигена, опухолевого антигена, токсинов, клостридого перфрингенс эпсилон токсина, токсина рицина, экзотоксин синегнойной палочки, экзотоксинов, нейротоксинов, цитокинов, цитокиновых рецепторов, монокинов, монокиновых рецепторов, пыльцы растений, перхоти животных и пылевых клещей.

В некоторых вариантах реализации адъювант выбран или получен из группы, состоящей из BCSP31, MOMP, FomA, MymA, ESAT6, PorB, PVL, порина, OmpA, PepO, OmpU, лумазинсинтазы, Omp16, Omp19, CobT, RpfE, Rv0652, HBHA, NhhA, DnaJ, пневмолизина, фалгелина, IFN-альфа, IFN-gamma, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF, IL-1b, IL-6, TNF-a, IL-7, IL-17, бета IL-1, анти-CTLA4, анти-PD1, анти-41BB, PD-L1, Tim-3, Lag-3, TIGIT, GITR и анти-CD3.

Иммуногенные векторы и препараты РНК

В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК-вакцина по данному изобретению содержит один или более полинуклеотидов кольцевой РНК или аналогов полинуклеотидов линейной РНК, способных вызывать иммунный ответ в клетке. Модификации или конструирование неиммуногенного кольцевого полинуклеотида РНК могут обеспечить свойства, подобные адъювантам (Wesselhoeft, 2019). Точно так же линейные полинуклеотиды РНК могут быть сконструированы для запуска усиленного иммунного ответа, чем немодифицированные линейные полинуклеотиды РНК. Примеры повышенной иммуногенности линейных полинуклеотидов РНК включают различные стратегии кэпирования (Pardi, 2018). Стратегии кэпирования включают, но не ограничиваются этим, включение монофосфорилированного или трифосфорилированного на концевом 5'-конце путем добавления монофосфата нуклеотида в реакцию транскрипции in vivo. В некоторых вариантах реализации изменение соотношений трифосфорилированных:монофосфорилированных 5'-концевых кэпов в препарате РНК можно контролировать на основе изменения соотношения GMP: GTP во время транскрипции in vivo. В других вариантах реализации фермент (например, RppH) можно

использовать для контроля соотношения трифосфорилированных: монофосфорилированных 5'-концевых кэпов в препарате РНК. Соотношение монофосфорил:трифосфорил в любом препарате РНК может составлять 100:1, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 100:1 в зависимости от предпочтительных уровней иммуногенности. Более высокие соотношения трифосфорилирования:монофосфорилирования обеспечивают большую активацию иммунного ответа.

В некоторых вариантах реализации монофосфатный или трифосфатный кэп включения может быть получен с использованием способа синтеза, основанного на предоставлении молекул инициатора во время разработки полинуклеотида РНК. В некоторых вариантах реализации количество трифосфатов на 5'-конце молекулы РНК, продуцируемой транскрипцией in vitro, можно регулировать путем включения определенных нуклеотидов и/или нуклеозидов в реакцию транскрипции in vitro. Эти нуклеотиды затем будут использоваться с различной эффективностью в качестве инициирующих нуклеотидов/нуклеозидов для новых цепей РНК. В том же варианте реализации фермент РНК-полимераза (например, РНК-полимераза Т7) обладает способностью стохастически выбирать нуклеотид/нуклеозид-инициатор из доступных субстратов. В некоторых вариантах реализации включение в синтез нескольких различных инициирующих нуклеозидов/нуклеотидов (например, GTP и GMP) приведет к получению некоторых молекул РНК с 5'-монофосфатами, а некоторых - с 5'-трифосфатами. Соотношение используемых инициирующих нуклеотидов/нуклеозидов и скорость включения конкретного нуклеотида/нуклеозида будет определять долю молекул РНК со специфической 5'-концевой идентичностью. В предпочтительном варианте реализации для получения молекул РНК с монофосфатными 5'-концами GMP добавляют к реакциям транскрипции in vitro РНК-полимеразы Т7 в концентрации, превышающей или равной 1-кратной исходной концентрации GTP, наиболее предпочтительно 4-кратной. В некоторых вариантах реализации можно использовать альтернативную молекулу инициатора, такую как аденозиновый нуклеотид/нуклеозид, особенно при использовании альтернативного фермента РНК-полимеразы.

В другом варианте способ монофосфатного или трифосфатного включения кэпа может включать метод сплайсинга. Гуанозиновый нуклеотид/нуклеозид может быть включен перед динуклеотидом второго сайта сплайсинга 5'-сайта сплайсинга во время сплайсинга интрона группы I и пермутированного интрона группы I. Этот нуклеотид/нуклеозид может включать ноль или более фосфатных групп в 5'-положении. Включение нескольких различных нуклеозидов/нуклеотидов (например, GTP и GMP) приведет к получению некоторых интронных продуктов с 5'-монофосфатами, а некоторых - с 5'-трифосфатами. Соотношение используемых нуклеотидов/нуклеозидов и скорость использования определенного нуклеотида/нуклеозида интроном группы I будет определять долю молекул РНК со специфической 5'-концевой идентичностью. В предпочтительном варианте реализации используемое соотношение нуклеозидов/нуклеотидов идентично

соотношению, используемому для транскрипции молекул-предшественников in vitro, и сплайсинг происходит ко-транскрипционно. Соотношение можно независимо контролировать путем очистки молекул РНК-предшественников от реакции транскрипции in vitro и добавления необходимых кофакторов для сплайсинга вместе с желаемым соотношением нуклеозидов/нуклеотидов. Интроны группы I обычно принимают только гуанозиновые нуклеотиды/нуклеозиды в качестве кофакторов, но иногда могут принимать и другие нуклеотиды/нуклеозиды, такие как аденозиновые нуклеотиды/нуклеозиды.

В другом варианте реализации монофосфатный или трифосфатный кэп включения может быть получен ферментативным способом. Трифосфатные концы могут быть преобразованы в монофосфатные или гидроксильные концы посредством ферментативной обработки. Обработка трифосфорилированных молекул РНК РНК-5'-пирофосфогидролазой (RppH) или пирофосфатазой табачной кислоты (TAP) преобразует трифосфорилированный конец в монофосфорилированный конец, который затем можно использовать для лигирования лигазными ферментами, такими как T4 РНК-лигаза I, и не вызывает RIG-I. Другие ферменты фосфатазы, такие как кишечная фосфатаза телят (CIP/CIAP), щелочная фосфатаза креветок (SAP) и другие, удаляют концевые фосфаты, тем самым превращая концевые монофосфаты, дифосфаты или трифосфаты в концевые гидроксильные группы. Затем концевые гидроксильные группы могут быть преобразованы в монофосфатные группы с использованием фермента киназы, такого как полинуклеотидкиназа T4 (PNK).

В некоторых вариантах реализации препараты РНК можно сделать более иммуностимулирующими за счет использования различных структур или составов полинуклеотидов РНК в различных процентных соотношениях. В других вариантах реализации препараты РНК могут содержать как неиммуностимулирующие кольцевые полинуклеотиды РНК, так и линейные полинуклеотиды РНК, содержащие 5'-концевые кэпы, или иммуностимулирующие модифицированные кольцевые полинуклеотиды РНК. В некоторых вариантах реализации препараты РНК содержат кольцевые полинуклеотиды РНК, кодирующие адъювант, антиген или адъювантоподобный белок, наряду с линейными полинуклеотидами РНК или иммуностимулирующе-модифицированной кольцевой РНК для стимулирования иммунного ответа.

Дополнительные мишени и комбинации

В некоторых вариантах реализации предложены способы лечения или профилактики микробной инфекции (например, бактериальной или вирусной инфекции) и/или заболевания, расстройства или состояния, связанного с микробной или вирусной инфекцией, или их симптома у субъекта, путем введения кольцевой РНК-вакцины, содержащей один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более пептидов. Введение может осуществляться в комбинации с противомикробным средством, например, антибактериальным средством, противомикробным полипептидом или низкомолекулярным противомикробным соединением, описанным в настоящем документе. Антимикробные агенты могут включать, но не ограничиваться ими, антибактериальные

агенты, противовирусные агенты, противогрибковые агенты, антипротозойные агенты, антипаразитарные агенты и антиприонные агенты.

Состояния, связанные с бактериальной инфекцией

Заболевания, расстройства или состояния, которые могут быть связаны с бактериальными инфекциями, которые можно лечить с помощью кольцевой РНК-вакцины по данному изобретению, включают, но не ограничиваются одним или более из следующих: абсцессы, актиномикоз, острый простатит, aeromonas hydrophila, токсичность райграса многоцветкового, сибирская язва, бациллярный пелиоз, бактериемия, бактериальный гастроэнтерит, бактериальный менингит, бактериальная пневмония, бактериальный вагиноз, бактериальные кожные заболевания, бартонеллез, БЦЖ-ома, ботриомикоз, ботулизм, бразильская пурпурная лихорадка, абсцесс Броди, бруцеллез, язва Бурули, кампилобактериоз, кариес, болезнь Карриона, болезнь кошачьих царапин, флегмона, хламидийная инфекция, холера, хронический бактериальный простатит, хронический рецидивирующий многоочаговый остеомиелит, клостридиальный некротизирующий энтерит, сочетанные пародонто-эндодонтические поражения, контагиозная плевропневмония крупного рогатого скота, дифтерия, дифтерийный стоматит, эрлихиоз, рожистое воспаление, пиглоттит, рожистое воспаление, Фитц-Хью-Кертис синдром, блошиная пятнистая лихорадка, гниль стопы (инфекционный пододерматит), склерозирующий остеомиелит Гарре, гонорея, паховая гранулема, гранулоцитарный анаплазмоз человека, моноцитотропный эрлихиоз человека, стодневный кашель, импетиго, поздняя врожденная сифилитическая окулопатия, легионеллез, синдром Лемьера, лепра (болезнь Хансена), лептоспироз, листериоз, болезнь Лайма, лимфаденит, мелиоидоз, менингококковая инфекция, менингококковый септицемия, метициллин-резистентная инфекция Staphylococcus aureus (MRS A), Mycobacterium avium-intracellulare (MAI), микоплазменная пневмония, некротизирующий фасциит, нокардиоз, нома (cancrum oris или гангренозный стоматит), омфалит, орбитальный целлюлит, остеомиелит, распространенная постспленэктомическая инфекция (OPSI), бруцеллез овец, пастереллез, периорбитальный целлюлит, коклюш (коклюш), чума, пневмококковая пневмония, болезнь Потта, проктит, синегнойная инфекция орнитоз, пиемия, гнойный миозит, Ку-лихорадка, возвратный (тиф inia), ревматизм, пятнистая лихорадка Скалистых гор (RMSF), риккетсиоз, сальмонеллез, скарлатина, сепсис, серратиоз, шигеллез, сыпь, связанная с южным клещом, стафилококковый синдром ошпаренной кожи, стрептококковый фарингит, гранулема в бассейне, бруцеллез свиней, сифилис, сифилитический аортит, столбняк, синдром токсического шока (TSS), трахома, траншейная лихорадка, тропическая язва, туберкулез, туляремия, брюшной тиф, тиф, урогенитальный туберкулез, инфекции мочевыводящих путей, ванкомицин-резистентная инфекция Staphylococcus aureus, синдром Уотерхауза-Фридериксена, псевдотуберкулезная (иерсиниозная) болезнь и иерсиниоз.

Бактериальные патогены

Описанная в данном документе бактерия может быть грамположительной бактерией или грамотрицательной бактерией. Бактериальные патогены включают, но не

ограничиваются ими, Acinetobacter baumannii, Bacillus anthracis, Bacillus subtilis, Bordetella pertussis, Borrelia burgdorferi, Brucella abortus, Brucella canis, Brucella melitensis, Brucella suis, Campylobacter jejuni, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Chlamydophila psittaci, Clostridium. botulinum, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, коагулазонегативные стафилококки, Corynebacterium diphtheria, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, энтеротоксигенные кишечные палочки (ETEC), энтеропатогенные E. coli, E. coli 0157:H7, Enterobacter sp., Francisella tularensis, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Legionella pneumophila, Leptospira interrogans, Listeria monocytogenes, Moraxella catarralis, Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitides, Preteus mirabilis, Proteus sps., Pseudomonas aeruginosa, Rickettsia rickettsii, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Serratia marcesens, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus mutans, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Treponema pallidum, Vibrio cholerae и Yersinia pestis.

Бактериальные патогены могут также включать бактерии, вызывающие резистентные бактериальные инфекции, например, устойчивые к клиндамицину Clostridium difficile, устойчивые к фторхинолонам Clostridium difficile, устойчивые к метициллину Staphylococcus aureus (MRS A), полирезистентные Enterococcus faecalis, полирезистентные Enterococcus faecium, полирезистентные Pseudomonas aeruginosa, полирезистентный Acinetobacter baumannii и устойчивый к ванкомицину Staphylococcus aureus (VRSA).

Комбинации антибиотиков

В некоторых вариантах реализации вакцину с кольцевой РНК по данному изобретению, например, вакцину с кольцевой РНК, содержащую один или более полинуклеотидов, кодирующих антиген по данному изобретению, можно вводить в сочетании с одним или более антибактериальными агентами.

Антибактериальные агенты

Антибактериальные агенты включают, но не ограничиваются ими, аминогликозиды (например, амикацин (AMIKIN®), гентамицин (GARAMYCIN®), канамицин (KANTREX®), неомицин (MYCIFRADIN®), нетилмицин (NETROMYCIN®), тобрамицин (NEBCIN®), паромомицин (HUMATIN®)), ансамицины (например, гельданамицин, гербимицин), карбацефем (например, лоракарбеф (LORABID®), карбапенемы (например, эртапенем (INVANZ®), дорипенем (DORIBAX®), имипенем/циластатин (PRIMAXIN®), меропенем (MERREM®), цефалоспорины (первое поколение) (например, цефадроксил (DURICEF®), цефазолин (ANCEF®), цефалотин или цефалотин (KEFLIN®), цефалексин (KEFLEX®), цефалоспорины (второе поколение) (например, цефаклор (CECLOR®), цефамандол (MANDOL®), цефокситин (MEFOXIN®), цефпрозил (CEFZIL®), цефуроксим (CEFTIN®, ZINNAT®)), цефалоспорины (третье поколение) (например, цефиксим (SUPRAX®), цефдинир (OMNICEF®), CEFDIEL®), цефдиторен (SPECTRACEF®),

цефоперазон (CEFOBID®), цефотаксим (CLAFORAN®), цефподоксим (VANTIN®), цефтазидим (FORTAZ®), цефтибутен (CEDAX®), цефтизоксим (CEFIZOX®), цефтриаксон (ROCEPHIN®)), цефалоспорины (четвертое поколение) (например, цефепим (MAXIPIME®)), цефалоспорины (пятое поколение) (например, цефтобипрол (ZEFTERA®)), гликопептиды (например, тейкопланин (TARGOCID®), ванкомицин (VANCOCIN®), телаванцин (VIBATIV®)), линкозамиды (например, клиндамицин (CLEOCIN®), линкомицин (LINCOCIN®)), липопептиды (например, даптомицин (CUBICIN®)), макролиды (например, азитромицин (ZITHROMAX®, SUMAMED®, ZITROCIN®), кларитромицин (BIAXIN®), диритромицин (DYNABAC®), эритромицин (ERYTHOCIN®, ERYTHROPED®), рокситромицин, тролеандомицин (TAO®), телитромицин (KETEK®), спектиномицин (TROBICIN®)), монобактамы (например, азтреонам (AZACTAM®)), нитрофураны (например, фуразолидон (FUROXONE®), нитрофурантоин (MACRODANTIN®, MACROBID®)), пенициллины (например, амоксициллин (NOVAMOX®, AMOXIL®), ампициллин (PRINCIPEN®), азлоциллин, карбенициллин (GEOCILLIN®), клоксациллин (TEGOPEN®), диклоксациллин (DYNAPEN®), флуклоксациллин (FLOXAPEN®), мезлоциллин (MEZLIN®), метициллин (STAPHCILLIN®), нафциллин (UNIPEN®), оксациллин (PROSTAPHLIN®), пенициллин G (PENTIDS®), пенициллин V (PEN-VEE-K®), пиперациллин (PIPRACIL®), темоциллин (NEGABAN®), тикарциллин (TICAR®)), комбинации с пенициллином (например, амоксициллин/клавуланат (AUGMENTIN®), ампициллин/сульбактам (UNASYN®), пиперациллин/тазобактам (ZOSYN®), тикарциллин/клавуланат (TIMENTIN®)), полипептиды (например, бацитрацин, колистин (COLY-MYCIN-S®), полимиксин B, хинолоны (например, ципрофлоксацин (CIPRO®, CIPROXIN®, CIPROBAY®), эноксацин (PENETREX®), гатифлоксацин (TEQUIN®), левофлоксацин (LEVAQUIN®), ломефлоксацин (MAXAQUIN®), моксифлоксацин (AVELOX®), налидиксовая кислота (NEGGRAM®), норфлоксацин (NOROXIN®), офлоксацин (FLOXIN®, OCUFLOX®), тровафлоксацин (TROVAN®), грепафлоксацин (RAXAR®), спарфлоксацин (ZAGAM®), темафлоксацин (OMNIFLOX®)), сульфаниламиды (например, мафенид (SULFAMYLON®), сульфамидохризоидин (PRONTOSIL®), сульфацетамид (SULAMYD®, BLEPH-10®), сульфадиазин (MICRO-SULFON®), сульфадиазин серебра (SILVADENE®), сульфаметизол (THIOSULFIL FORTE®), сульфаметоксазол (GANTANOL®), сульфанилимид, сульфасалазин (AZULFIDINE®), сульфизоксазол (GANTRISIN®), триметоприм (PROLOPREVI®), TRIMPEX®), триметоприм-сульфаметоксазол (ко-тримоксазол) (TMP-SMX) (BACTRIM®, SEPTRA®)), тетрациклины (например, демеклоциклин (DECLOMYCIN®), доксициклин (VIBRAMYCIN®), миноциклин (MINOCIN®), окситетрациклин (TERRAMYCIN®), тетрациклин циклин (SUMYCIN®, ACHROMYCIN® V, STECLIN®)), препараты против микобактерий (например, клофазимин (LAMPRENE®), дапсон (AVLOSULFON®), капреомицин (CAPASTAT®), циклосерин (SEROMYCIN®), этамбутол (MYAMBUTOL®), этионамид (TRECATOR®), изониазид (I.N.H.®), пиразинамид (ALDIN AMIDE®), рифампин (RIFADIN®,

RIMACTAN®), рифабутин (MYCOBUTIN®), рифапентин (PRIFTIN®), стрептомицин) и другие (например, арсфенамин (SALVARSAN®), хлорамфеникол (CHLOROMYCETIN®), фосфомицин (MONUROL®), фузидовая кислота (FUCIDIN®), линезолид (ZYVOX®), метронидазол (FLAGYL®), мупироцин (BACTROBAN®), платенсимицин, хинупристин/дальфопристин (SYNERCID®), рифаксимин (XIFAXAN®), тиамфеникол, тигециклин (TIGACYL®), тинидазол (TINDAMAX®, FASIGYN®)).

Состояния, связанные с вирусной инфекцией

В некоторых вариантах реализации предложены способы лечения или профилактики вирусной инфекции и/или заболевания, расстройства или состояния, связанного с вирусной инфекцией, или ее симптома у субъекта путем введения кольцевой РНК-вакцины, содержащей один или более полинуклеотидов, кодирующих антивирусный полипептид, например, антивирусный полипептид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах реализации вакцину с кольцевой РНК вводят в комбинации с противовирусным средством, например, противовирусным полипептидом или низкомолекулярным противовирусным средством, описанным в настоящем документе.

Заболевания, расстройства или состояния, связанные с вирусными инфекциями, которые можно лечить с помощью кольцевых РНК-вакцин по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, острый фебрильный фарингит, фарингоконъюнктивальную лихорадку, эпидемический кератоконъюнктивит, детский гастроэнтерит, инфекции Коксаки, инфекционный мононуклеоз, инфекцию Беркитта, острый гепатит, хронический гепатит, цирроз печени, гепатоцеллюлярную карциному, первичную инфекцию ВПГ-1 (например, гингивостоматит у детей, тонзиллит и фарингит у взрослых, кератоконъюнктивит), латентную инфекцию ВПГ-1 (например, лабиальный герпес и герпес на губах), первичную инфекцию ВПГ-2, латентную инфекцию ВПГ-2, асептический менингит, инфекционный мононуклеоз, цитомегалическую болезнь включения, саркому Капоши, мультицентрическую болезнь Кастлемана, первичную выпотную лимфому, СПИД, грипп, синдром Рея, корь, постинфекционный энцефаломиелит, эпидемический паротит, гиперпластические поражения эпителия (например, обыкновенные, плоские, подошвенные и аногенитальные бородавки, папулы гортани omas, epidermodysplasia verruciformis), рак шейки матки, плоскоклеточный рак, круп, пневмонию, бронхиолит, простуду, полиомиелит, бешенство, бронхиолит, пневмонию, гриппоподобный синдром, тяжелый бронхиолит с пневмонией, краснуху, врожденную краснуху, ветряную оспу, опоясывающий герпес и SARS-CoV-2.

Вирусные патогены

Примеры вирусных инфекционных агентов включают, но не ограничиваются ими, аденовирус; простой герпес, тип 1; простой герпес, тип 2; вирус энцефалита; папилломавирус; вирус ветряной оспы; вирус Эпштейна-Барра; цитомегаловирус человека; вирус герпеса человека, тип 8; вирус папилломы человека; вирус БК; вирус JC; оспу; вирус полиомиелита, вирус гепатита B; бокавирус человека; парвовирус B19; астровирус человека; вирус Норуолк; коксакивирус; вирус гепатита A; полиовирус; риновирус; вирус

тяжелого острого респираторного синдрома; вирус гепатита С; вирус желтой лихорадки; вирус денге; вирус Западного Нила; вирус краснухи; вирус гепатита Е; вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); вирус гриппа типа А или В; вирус гуанарито; вирус Хунин; вирус Ласса; вирус Мачупо; вирус Сабиа; вирус конго-крымской геморрагической лихорадки; вирус Эбола; вирус Марбург; вирус кори; вирус эпидемического паротита; вирус парагриппа; респираторно-синцитиальный вирус; метапневмовирус человека; вирус Хендра; вирус Нипах; вирус бешенства; гепатит D; ротавирус; орбивирус; кольтивирус; хантавирус, ближневосточный респираторный коронавирус; вирус чикунгунья, вирус Банна или SARS-CoV-2. Вирусные патогены могут также включать вирусы, вызывающие инфекции, устойчивые к противовирусным препаратам.

Противовирусные агенты

Примеры противовирусных агентов включают, но не ограничиваются ими, абакавир (ZIAGEN®), абакавир/ламивудин/зидовудин (trizivir®), ацикловир или ацикловир (CYCLOVIR®, HERPEX®, ACIVIR®, ACIVIRAX®, ZOVIRAX®, ZOVIR®), адефовир (Preveon®, Hepsera®), амантадин (SYMMETREL®), ампренавир (AGENERASE®), амплиген, арбидол, атазанавир (REYATAZ®), боцепревир, цидофовир, дарунавир (PREZISTA®), делавирдин (RESCRIPTOR®), диданозин (VIDEX®), докозанол (ABREVA®), эдокудин, эфавиренз (SUSTINA®, STOCRIN®), эмтрицитабин (EMTRIVA®), эмтрицитабин/тенофовир/эфавиренз (ATRIPLA®), энфувиртид (FUZEON®), энтекавир (BARACLUDE®, ENNAVIR®), фамцикловир (FAMVIR®), фомивирсен (VITRA VENE®), фосампренавир (LEXIVA®, TELZIR®), фоскарнет (FOSCAVIR®), фосфонет, ганцикловир (CYTOVENE®, CYMEVENE®, VITRASERT®), GS 9137 (ELVITEGRAVIR®), имиквимод (ALDARA®, ZYCLARA®, BESELNA®), индинавир (CRIXIVAN®), инозин, инозин пранобекс (IMUNOVIR®), интерферон I типа, интерферон II типа, интерферон III типа, кутапрессин (NEXAVIR®), лам ивудин (ZEFFIX®, HEPTOVIR®, EPIVIR®), ламивудин/зидовудин (COMBIVIR®), лопинавир, ловирид, маравирок (SELZENTRY®, CELSENTRI®), метисазон, МК-2048, мороксидин, нелфинавир (VIRACEPT®), невирапин (VIRAMUNE®), осельтамивир (TAMIFLU®), пегинтерферон альфа-2а (PEGASYS®), пенцикловир (DENAVIR®), перамивир, плеконарил, подофиллотоксин (CONDYLOX®), ралтегравир (ISENTRESS®), рибавирин (COPEGUs®, REBETOL®, RIBASPHERE®, VILONA® и VIRAZOLE®), римантадин (FLUMADINE®), ритонавир (NORVIR®), пирамидин, саквинавир (INVIRASE®, FORTOVASE®), ставудин, масло чайного дерева (масло мелалеуки), тенофовир (VIREAD®), тенофовир/эмтрицитабин (TRUVADA®), типранавир (APTIVUS®), трифлуридин (VIROPTIC®), тромантадин (VIRU-MERZ®), валацикловир (VALTREX®), валганцикловир (VALCYTE®), викривирок, видарабин, вирамидин, залцитабин, занамивир (RELENZA®) и зидовудин (азидотимидин (AZT), RETROVIR®, RETROVIS®).

Состояния, связанные с грибковыми инфекциями

Заболевания, расстройства или состояния, связанные с грибковыми инфекциями, которые можно лечить с помощью вакцин с кольцевой РНК по данному изобретению,

включают, но не ограничиваются ими, аспергиллез, бластомикоз, кандидоз, кокцидиоидомикоз, криптококкоз, гистоплазмоз, мицетомы, паракокцидиоидомикоз и микоз стоп. Кроме того, люди с иммунодефицитом особенно восприимчивы к заболеваниям, вызываемым такими родами грибов, как Aspergillus, Candida, Cryptoccocus, Histoplasma и Pneumocystis, которые можно лечить с помощью кольцевых РНК-вакцин по данному изобретению. Другие грибки, которые можно лечить с помощью кольцевых РНК-вакцин по данному изобретению, включают грибки, которые могут поражать глаза, ногти, волосы и особенно кожу, так называемые дерматофитные грибки и кератинофильные грибки, которые вызывают различные состояния, среди которых стригущий лишай, такой как эпидермофития стопы. Циркулярные РНК-вакцины по данному изобретению можно также использовать для лечения аллергии, вызванной грибковыми спорами и грибками из различных таксономических групп.

Грибковые патогены

Грибковые патогены включают, но не ограничиваются ими, Ascomycota (например, Fusarium oxysporum, Pneumocystis jirovecii, Aspergillus spp., Coccidioides immitis/posadasii, Candida albicans), Basidiomycota (например, Filobasidiella neoformans, Trichosporon), Microsporidia (например, Encephalitozoon cuniculi, Enterocytozoon bieneusi) и Mucoromycotina (например, Mucor circinelloides, Rhizopus oryzae, Lichtheimia corymbifera).

Противогрибковые агенты

Противогрибковые агенты, которые можно использовать в сочетании с кольцевыми РНК-вакцинами по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, полиеновые противогрибковые средства (например, натамицин, римоцидин, филипин, нистатин, амфотерицин B, кандицин, гамицин), имидазольные противогрибковые средства (например, миконазол (MICATIN®, DAKTARIN®), кетоконазол (NIZORAL®, FUNGORAL®, SEBIZOLE®), клотримазол (LOTRIMIN®, LOTRIMIN® AF, CANESTEN®), эконазол, омоконазол, бифоназол, бутоконазол, фентиконазол, изоконазол, оксиконазол, сертаконазол (ERTACZO®), сулконазол, тиоконазол), триазольные противогрибковые препараты (например, албаконазол, флуконазол, итраконазол, изавуконазол, равуконазол, позаконазол, вориконазол, терконазол), тиазольные противогрибковые препараты (например, абафунгин), аллиламины (например, тербинафин (LAMISIL®), нафтифин (NAFTIN®), бутенафин (LOTRIMIN® Ultra)), эхинокандины (например, анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) и другие (например, полигодиал, бензойная кислота, циклопирокс, толнафтат (TINACTIN®, DESENEX®, AFTATE®), ундециленовую кислоту, флуцитозин или 5-фторцитозин, гризеофульвин, галопрогин, бикарбонат натрия, аллицин).

Состояния, связанные с протозойной инфекцией

Заболевания, расстройства или состояния, связанные с протозойными инфекциями, которые можно лечить с помощью кольцевых РНК-вакцин по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, амебиаз, лямблиоз, трихомониаз, африканскую сонную болезнь, американскую сонную болезнь, лейшманиоз (кала-азар), балантидиаз,

токсоплазмоз, малярию, акантамебный кератит и бабезиоз.

Простейшие патогены

Простейшие патогены включают, но не ограничиваются ими, Entamoeba histolytica, Giardia lambila, Trichomonas vaginalis, Trypanosoma brucei, T. cruzi, Leishmania donovani, Balantidium coli, Toxoplasma gondii, Plasmodium spp. и Babesia microti.

Противопротозойные агенты

Примеры противопротозойных агентов включают, но не ограничиваются ими, эфлорнитин, фуразолидон (FUROXONE®, DEPEND AL-M®), меларсопрол, метронидазол ((FLAGYL®), орнидазол, паромомицина сульфат (HUMATIN®), пентамидин, пириметамин (DARAPRIM®) и тинидазол (TINDAMAX®, FASIGYN®).

Состояния, связанные с паразитарной инфекцией

Заболевания, расстройства или состояния, связанные с паразитарными инфекциями, которые можно лечить с помощью вакцин, содержащих кольцевые РНК по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, акантамебный кератит, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, балантидиаз, байлисаскаридоз, болезнь Шагаса, клонорхоз, кохлиомию, криптоспоридиоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, слоновость, энтеробиоз, фасциолез, фасциопсиоз, филяриатоз, лямблиоз, гнатостомоз, гименолепидоз, изоспориоз, лихорадку Катаяма, лейшманиоз, болезнь Лайма, малярию, метагонимоз, миаз, онхоцеркоз, сонный схомиоз, абпедикулез, стронгилоидоз, тениоз, токсокароз, токсоплазмоз, трихинеллез и трихоцефалез.

Паразитарные патогены

Паразитарные патогены включают, но не ограничиваются ими, Acanthamoeba, Anisakis, Ascaris lumbricoides, botfly, Balantidium coli, bedbug, Cestoda, chiggers, Cochliomyia hominivorax, Entamoeba histolytica, Fasciola hepatica, Giardia lamblia, hookworm, Leishmania, Linguatula serrata, liver fluke, Loa loa, Paragonimus, pinworm, Plasmodium falciparum, Schistosoma, Strongyloides stercoralis, mite, tapeworm, Toxoplasma gondii, Trypanosoma, whipworm и Wuchereria bancrofti.

Противопаразитарные агенты

Примеры противопаразитарных агентов включают, но не ограничиваются ими, антинематозы (например, мебендазол, пирантела памоат, тиабендазол, диэтилкарбамазин, ивермектин), антицестоды (например, никлозамид, празиквантел, альбендазол), антитрематоды (например, празиквантел), антиамебные препараты (например, рифампин, амфотерицин B) и антипротозойные препараты (например, меларсопрол, эфлорнитин, метронидазол, тинидазол).

Участок расщепления

В некоторых вариантах реализации две или более последовательностей экспрессии в полинуклеотидной конструкции могут быть разделены одной или более последовательностями сайта расщепления. 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.

В некоторых вариантах реализации сайт расщепления может представлять собой сайт расщепления фурином. Фурин представляет собой фермент, принадлежащий к семейству субтилизин-подобных пропротеинконвертаз. Членами этого семейства являются пропротеинконвертазы, которые превращают латентные белки-предшественники в их биологически активные продукты. Фурин представляет собой кальций-зависимую сериновую эндопротеазу, которая может эффективно расщеплять белки-предшественники в их парных сайтах процессинга основных аминокислот. Примеры фуриновых субстратов 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 непосредственно ниже целевой последовательности основных аминокислот (канонически Arg-X-(Arg/Lys)-Arg) и накапливается в аппарате Гольджи.

В некоторых вариантах реализации сайт расщепления может кодировать саморасщепляющийся пептид.

В некоторых вариантах реализации сайт расщепления может действовать за счет пропуска рибосомы, например, пропуска глицил-пропильной связи на С-конце саморасщепляющегося пептида 2А. В некоторых вариантах реализации стерические затруднения вызывают пропуск рибосом. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид 2А содержит последовательность GDVEXNPGP (SEQ ID NO: 324), где X представляет собой E или S. В некоторых вариантах реализации белок, кодируемый выше саморасщепляющегося пептида 2А, присоединен к саморасщепляющемуся пептиду 2А, кроме С-концевого посттрансляционного пролина. В некоторых вариантах реализации белок, кодируемый ниже саморасщепляющегося пептида 2А, присоединен к пролину на его N-конце после трансляции.

В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид может представлять собой саморасщепляющийся пептид 2А из апто- или кардиовируса. Первичное расщепление 2А/2В апто- и кардиовирусов опосредовано расщеплением 2А на его собственном С-конце. В аптовирусах, таких как вирусы ящура (FMDV) и вирус ринита лошадей А, участок 2А представляет собой короткий участок около 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 (Donelly et al. (2001)).

2А-подобные последовательности были обнаружены в пикорнавирусах, отличных от апто- или кардиовирусов, «пикорнавирусоподобных» вирусах насекомых, ротавирусах типа С и повторяющихся последовательностях в пределах Trypanosoma spp и бактериальной последовательности (Donnelly et al. (2001)). В некоторых вариантах реализации сайт расщепления может содержать одну из этих 2А-подобных

последовательностей, таких как перечисленные в Таблице 8.

В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид представляет собой F2A. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид получен из вируса ящура. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид представляет собой E2A. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид получают из вируса ринита А лошадей. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид представляет собой P2A. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид получают из свиного тешовируса-1. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид представляет собой T2A. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид получен из вируса асигна. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющийся пептид имеет последовательность, указанную в таблице 8.

В варианте реализации последовательности экспрессии, кодирующие пептиды, разделенные сайтом расщепления, имеют одинаковый уровень экспрессии белка.

В некоторых вариантах реализации 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).

Продуцирование полинуклеотидов

Предложенные в данном документе векторы могут быть получены с применением стандартных способов молекулярной биологии, известных специалистам в данной области техники. Например, различные элементы векторов, предусмотренных в настоящем документе, могут быть получены с использованием рекомбинантных методов, таких как скрининг кДНК и геномных библиотек из клеток, или путем получения полинуклеотидов из вектора, который, как известно, включает их.

Различные элементы предлагаемых в данном документе векторов также могут быть получены синтетически, а не клонированы, на основе известных последовательностей. Полная последовательность может быть собрана из перекрывающихся олигонуклеотидов, приготовленных 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.

Таким образом, определенные последовательности нуклеотидов могут быть получены из векторов, содержащих желаемые последовательности, или синтезированы полностью или частично с использованием различных методов синтеза олигонуклеотидов, известных в данной области техники, таких как методы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР), где это уместно. 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. See, e.g., Jayaraman et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA (1991) 88:4084-4088. Кроме того, могут быть использован синтез, направленный на олигонуклеотиды (Jones et al., Nature (1986) 54:75-82), олигонуклеотидный направленный мутагенез ранее существовавших нуклеотидных областей (Riechmann et al., Nature (1988) 332:323-327 и Verhoeyen et al., Science (1988) 239: 1534-1536) и ферментативное заполнение олигонуклеотидов с гэпами с использованием ДНК-полимеразы T4 (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 10029-10033).

РНК-предшественник, предложенная в настоящем документе, может быть получена путем инкубации вектора, представленного в настоящем документе, в условиях, допускающих транскрипцию РНК-предшественника, кодируемой вектором. Например, в некоторых вариантах реализации РНК-предшественник синтезируют путем инкубации вектора, представленного в настоящем документе, который содержит промотор РНК-полимеразы выше его 5'-дуплекс-образующей области и/или последовательности экспрессии с совместимым ферментом РНК-полимеразы в условиях, допускающих транскрипцию in vitro. В некоторых вариантах реализации вектор инкубируют внутри клетки с помощью РНК-полимеразы бактериофага или в ядре клетки с помощью РНК-полимеразы II хозяина.

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе предложен способ получения РНК-предшественника 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 выше 5'-дуплекс-образующей области).

В некоторых вариантах реализации полученную РНК-предшественник можно использовать для создания кольцевой РНК (например, полинуклеотида кольцевой РНК, представленного в настоящем документе) путем инкубации ее в присутствии ионов магния и гуанозинового нуклеотида или нуклеозида при температуре, при которой происходит кольцевая РНК (например, от 20 °C до 60 °C).

Таким образом, в некоторых вариантах реализации в настоящем документе представлен способ получения кольцевой РНК. В некоторых вариантах реализации способ включает синтез РНК-предшественника путем транскрипции (например, последовательной транскрипции) с использованием вектора, представленного в настоящем документе (например, вектора, содержащего в следующем порядке 5'-дуплексобразующую область, фрагмент интрона 3' группы I, первый спейсер, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), первую экспрессионную последовательность, полинуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления, вторую экспрессионную последовательность, второй спейсер, фрагмент интрона 5' группы I и 3'-дуплекс формирующую область) в качестве матрицы и инкубирование полученной РНК-предшественника в присутствии двухвалентных катионов (например, ионов магния) и GTP таким образом, чтобы она циркулировала с образованием кольцевой РНК. В некоторых вариантах реализации предшественник РНК по данному изобретению способен к циркуляризации в отсутствие ионов магния и GTP, и/или без стадии инкубации с ионами

магния и GTP. В некоторых вариантах реализации транскрипцию проводят в присутствии избытка GMP.

В некоторых вариантах реализации композиция, содержащая кольцевую РНК, была очищена. Кольцевая РНК может быть очищена любым известным методом, обычно используемым в данной области техники, таким как колоночная хроматография, гель-фильтрационная хроматография и эксклюзионная хроматография. В некоторых вариантах реализации очистка включает одну или более из следующих стадий: обработка фосфатазой, эксклюзионная очистка методом ВЭЖХ и расщепление РНКазой R. В некоторых вариантах реализации очистка включает следующие этапы по порядку: расщепление РНКазой R, обработка фосфатазой и очистка методом эксклюзионной ВЭЖХ. В некоторых вариантах реализации очистка включает ВЭЖХ с обращенной фазой. В некоторых вариантах реализации очищенная композиция содержит меньше двухцепочечной РНК, фрагментов ДНК, трифосфорилированной РНК, белков-фосфатаз, протеин-лигаз, кэпирующих ферментов и/или никированной РНК, чем неочищенная РНК. В некоторых вариантах реализации очищенная композиция менее иммуногенна, чем неочищенная композиция. В некоторых вариантах реализации иммунные клетки, подвергшиеся воздействию очищенной композиции, продуцируют менее TNFα, RIG-I, IL-2, IL-6, IFNγ и/или интерферон типа 1, например, IFN-β1, чем иммунные клетки, подвергающиеся воздействию неочищенной композиции.

Наночастицы

В некоторых аспектах в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие кольцевую РНК, представленную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации такие фармацевтические композиции содержат наночастицы для облегчения доставки.

В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК, представленная в настоящем документе, может быть доставлена и/или направляется в клетку в переносчике, например, в наночастице или в композиции, содержащей наночастицу. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК также может быть доставлена субъекту в переносчике или композиции, содержащей переносчик. В некоторых вариантах реализации переносчик представляет собой наночастицу. В некоторых вариантах реализации наночастица представляет собой липидную наночастицу, твердую липидную наночастицу, полимерную наночастицу ядро-оболочка или биоразлагаемую наночастицу. В некоторых вариантах реализации переносчик содержит или покрыт одним, или более катионными липидами, некатионными липидами, ионизируемыми липидами, ПЭГ-модифицированными липидами, полимерами полиглутаминовой кислоты, полимерами гиалуроновой кислоты, поли-β-аминоэфирами, поли-бета-аминопептидами или положительно заряженными пептидами.

В одном варианте реализации переносчик может быть выбрано и/или подготовлены для оптимизации доставки кольцевой РНК в клетку-мишень. Например, если клетка-мишень является антигенпрезентирующей клеткой, свойства переносчика (например,

размер, заряд и/или pH) может быть оптимизирован для эффективной доставки такого переносчика в клетку-мишень, снижения иммунного клиренса и/или способствовать удержанию в этой клетке-мишени.

Настоящее изобретение предусматривает использование переносчиков для облегчения доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени. Липосомы (например, липосомальные липидные наночастицы), как правило, применимы в различных применениях в исследованиях, промышленности и медицине, особенно для их использования в качестве переносчика 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 более двухслойных 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). Двухслойные мембраны липосом также могут быть образованы амфофильными полимерами и поверхностно-активными веществами (например, полимеросомами, ниосомами и т.д.).

В контексте настоящего изобретения переносчик обычно служит для транспорта кольцевой РНК в клетку-мишень. Для целей настоящего изобретения готовят переносчики, содержащие или инкапсулирующие желаемые нуклеиновые кислоты. Процесс включения желаемого объекта (например, нуклеиновой кислоты) в липосому часто называют загрузкой (Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Нуклеиновые кислоты, включенные в липосомы, могут быть полностью или частично расположены во внутреннем пространстве липосомы, в двухслойной мембране липосомы или связаны с внешней поверхностью липосомной мембраны. Зачастую, целью включения кольцевой РНК в переносчик, такой как липосома, является защита нуклеиновой кислоты от воздействия окружающей среды, которая может содержать ферменты или химические вещества, разрушающие нуклеиновые кислоты и/или системы, или рецепторы, которые вызывают быстрое выделение нуклеиновых кислот. Соответственно, в варианте реализации настоящего изобретения выбранный переносчик способен повышать стабильность содержащейся в нем кольцевой РНК. Липосома может позволить инкапсулированной кольцевой РНК достичь клетки-мишени или, альтернативно, ограничить доставку такой кольцевой РНК в другие участки или клетки, где присутствие введенной кольцевой РНК может быть бесполезным или нежелательным. Кроме того, включение кольцевой РНК в переносчик, такое как, например, катионная липосома, также облегчает доставку такой кольцевой РНК в клетку-мишень. В некоторых вариантах реализации переносчик, раскрытый в настоящем документе, может служить для стимуляции эндосомального или лизосомального высвобождения, например, содержимого, которое инкапсулировано в переносчике (например, липидных наночастиц).

В идеале переносчики подготавливают для инкапсуляции одной или более

желаемых кольцевых РНК, 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. (See N J. Caplen, et al., Gene Ther. 1995; 2: 603; S. Li, et al., Gene Ther. 1997; 4, 891.)

В некоторых вариантах реализации данного изобретения переносчик составлен в виде липидной наночастицы. В одном варианте реализации липидные наночастицы составлены таким образом, чтобы доставлять одну или более кольцРНК к одной или более клеткам-мишеням. Примеры подходящих липидов включают фосфатидильные соединения (например, PBAE, полиглутаминовая кислота, полиаспарагиновая кислота, фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды). Также предполагается использование полимеров в качестве переносчиков, отдельно или в комбинации с другими переносчиками. Подходящие полимеры могут включать, например, полиакрилаты, полиалкилцианоакрилаты, полилактид, сополимеры полилактида и полигликолида, поликапролактоны, декстран, альбумин, желатин, альгинат, коллаген, хитозан, циклодекстрины, дендримеры и полиэтиленимин. В некоторых вариантах реализации переносчик составлен в виде липида, как описано в заявке на патент США № US16/065067, которая полностью включена в настоящее описание. В некоторых вариантах реализации переносчик выбран на основании его способности облегчать трансфекцию кольцРНК в клетку-мишень.

В данном изобретении предполагает применение липидных наночастиц в качестве переносчиков, содержащих катионный липид, для загрузки и/или инкапсуляции, и/или усиления доставки кольцРНК в клетку-мишень, которая будет действовать как депо для продукции белка. Предполагаемые липидные наночастицы могут быть получены путем включения многокомпонентных смесей липидов в различных соотношениях с использованием одного или более катионных липидов, некатионных липидов и липидов, модифицированных ПЭГ. В литературе описано несколько катионных липидов, многие из которых коммерчески доступны.

Подходящие катионные липиды для применения в композициях и способах по данному изобретению включают липиды, описанные в международной патентной публикации № WO 2010/053572 и/или патентной заявке США № US 15/809680, например, C12-200. В некоторых вариантах реализации в композициях и способах по данному изобретению используются липидные наночастицы, содержащие ионизируемый катионный липид, описанный в предварительной заявке на патент США 61/617468, поданной 29 марта 2012 г. (включена в настоящий документ в качестве ссылки), 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).

В некоторых вариантах реализации катионный липид представляет собой 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 в комбинации с нейтральным липидом, диолеоилфосфатидилэтаноламином или «DOPE» или другими катионными или некатионными липидами в переносчике или липидной наночастице, и такие липосомы могут быть использованы для улучшения доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени. Другие подходящие катионные липиды включают, например, 5-карбоксиспермилглициндиоктадециламид или «DOGS», 2,3-диолеилокси-N-[2(спермин-карбоксамидо)этил]-N, N-диметил-1-пропанаминий или «DOSPA» (Behr et al., Proc. Nat.'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); патенты США № 5171678; 5334761), 1,2-диолеоил-3-диметиламмоний-пропан или «DODAP», 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан или «DOTAP». Рассматриваемые катионные липиды также включают 1,2-дистеарилокси-N, N-диметил-3-аминопропан или «DSDMA», 1,2-диолеилокси-N, N-диметил-3-аминопропан или «DODMA», 1,2-дилинолеилокси-N, N-диметил-3-аминопропан или «DLinDMA», 1,2-дилиноленилокси-N, N-диметил-3-аминопропан или «DLenDMA», N-диолеил-N, N-диметиламмония хлорид или «DODAC», N, N-дистеарил-N, N-диметиламмония бромид или «DDAB», N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N, N-диметил-N-гидроксиэтиламмония бромид или «DMRIE», 3-диметиламино -2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис, цис-9,12-октадекадиенокси)пропан или «CLinDMA», 2-[5'-(холест-5 -ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси)-3-диметил-1-1-(цис, цис-9',1-2'-октадекадиенокси)пропан или «CpLinDMA», N, N-диметил- 3,4-диолеилоксибензиламин или «DMOBA», 1,2-N, N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан или «DOcarbDAP», 2,3-дилинолеоилокси-N, N-диметилпропиламин или «DLinDAP», 1,2-N, N'-Дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан или «DLincarbDAP», 1,2-Дилинолеоилкарбамил-3-диметиламинопропан или «DLinCDAP», 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан или «DLin-K-DMA», 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан или «DLin-K-XTC2-DMA» и 2-(2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-4-ил)-N, N-диметилэтанамин (DLin-KC2-DMA)) (см. WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28:172-176 (2010)) 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); публикация PCT WO 2005/121348A1).

В данном документе также предусматривается применение катионных липидов на основе холестерина. Такие катионные липиды на основе холестерина могут применятся либо отдельно, либо в комбинации с другими катионными или некатионными липидами. Подходящие катионные липиды на основе холестерина включают, например, GL67, DC-Chol (N, N-диметил-N-этилкарбоксамидохолестерол), 1,4-бис(3-N-олеиламинопропил)пиперазин (Gao, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al., BioTechniques 23, 139 (1997); патент США № 5744335), или ICE.

Кроме того, несколько реагентов коммерчески доступны для повышения эффективности трансфекции. Подходящие примеры включают ЛИПОФЕКТИН (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, CA), ЛИПОФЕКТАМИН (DOSPA:DOPE) (Invitrogen), ЛИПОФЕКТАМИН2000. (Invitrogen), ФУГЕНЭ (Promega, Мэдисон, Висконсин), ТРАНСФЕКТАМ (DOGS) (Promega) и ЭФФЕКТЕН (Qiagen, Валенсия, Калифорния).

Также рассматриваются катионные липиды, такие как липиды на основе диалкиламино, имидазола и гуанидиния, такие как описанные в патенте США 10413618.

В других вариантах реализации композиции и способы, описанные в данном документе, направлены на липидные наночастицы, содержащие один или более расщепляемых липидов, таких как, например, один или более катионных липидов или соединений, которые содержат расщепляемую дисульфидную (S-S) функциональную группу (например, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 и HGT4005), как дополнительно описано в предварительной заявке США № 61/494745, все идеи которой полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Применение модифицированных полиэтиленгликолем (ПЭГ) фосфолипидов и производных липидов, таких как производные церамиды (ПЭГ-CER), включая N-октаноил-сфингозин-1-[сукцинил(метоксиполиэтиленгликоль)-2000] (керамид C8 PEG-2000) также рассматривается в данном изобретении либо отдельно, либо в комбинации с другими липидами, которые вместе составляют переносчик (например, липидную наночастицу). Предполагаемые ПЭГ-модифицированные липиды включают, без ограничения, полиэтиленгликолевую цепь длиной до 5 кДа, ковалентно связанную с липидом с помощью алкильной цепи (цепей) длиной C6-C20. Добавление таких компонентов может предотвратить агрегацию комплекса, а также может обеспечить средства для увеличения продолжительности циркуляции и увеличения доставки липидно-нуклеиновой кислоты в клетку-мишень (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 заменяемыми липидами являются ПЭГ-церамиды, имеющие короткие ациловые цепочки (например, C14 или C18). ПЭГ-модифицированный фосфолипид и дериватизированные липиды по данному изобретению могут иметь молярное соотношение с общими липидами, содержащимися в липосомальном средстве доставки, от около 0% до около 20%, от около 0,5% до около 20%, от около 1% до около 15%, от около 4% до около 10%, или около 2% от общего количества липидов, присутствующих в переносчике. В данном документе рассматриваются концевые группы ПЭГ. В некоторых вариантах реализации концевая группа ПЭГ представляет собой -OH, $-OCH_3$, кислоту, амин или гуанидин.

В некоторых вариантах реализации РНК-вакцина (например, кольцРНК) может быть связана с катионными или поликатионными соединениями, включая протамин, нуклеолин, спермин или спермидин, или другими катионными пептидами или белками, такими как поли-L-лизин (PLL), полиаргинин, основные полипептиды, пептиды, проникающие в

клетку (CPP), включая ВИЧ-связывающие пептиды, Tat ВИЧ-1 (ВИЧ), пептиды, производные Tat, пенетратин, пептиды, производные или аналоги VP22, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA или домены белковой трансдукции (PTD), PpT620, пептиды, богатые пролином, пептиды, богатые аргинином, пептиды, богатые лизином, MPG-пептид(ы), Pep-1, L-олигомеры, кальцитониновый пептид(ы), пептиды, полученные из Antennapedia (в частности, из Drosophila antennapedia), pAntp, pIsl, FGF, лактоферрин, транспортан, буфорин-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, пептиды, полученные из hCT, SAP, гистоны, катионные полисахариды, например хитозан, полибрен, катионные полимеры, т.е. полиэтиленимин (PEI), катионные липиды, т.е. DOTMA: [1-(2,3-сиолеилокси)пропил)]-N, N,N-триметиламмоний хлорид, DMRIE, ди-C14-амидин, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Диолеилфосфатидилэтаноламин, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Диоктадециламидоглицилспермин, DIMRI: Бромид димиристооксипропилдиметилгидроксиэтиламмония, DOTAP: диолеоилокси-3-(триметиламмонио)пропан, DC-6-14: O, O-дитетрадеканоил-N-альфа-триметиламмониоацетил)диэтаноламин хлорид, CLIP 1: rac-[(2,3-диоктадецилоксипропил)(2-гидроксиэтил)]-диметиламмоний хлорид, CLIP6: rac-[2(2,3 -дигексадецилоксипропилоксиметилокси)этил]-триметиламмоний, CLIP9: rac-[2(2,3-дигексадецилоксипропилоксисукцинилокси)этил]-триметиламмоний, олигофектамин или катионные или поликатионные полимеры, например, модифицированные полиаминокислоты, такие как полимеры бета-аминокислот или обращенные полиамиды и т. д., модифицированные полиэтилены, такие как PVP (поли(N-этил-4-винилпиридиний бромид)) и т.д., модифицированные акрилаты, такие как pDMAEMA (поли(диметиламиноэтил метилакрилат)) и т.д., модифицированные амидоамины, такие как pAMAM (поли(амидоамин)) и т.д., модифицированные полибетаминоэфиры (PBAE), такие как полимеры 1,4-бутандиол-диакрилат-со-5-амино-1-пентанола, модифицированные диамином по концам, и т.д., дендримеры, такие как дендримеры на основе полипропиламина или дендримеры на основе pAMAM, и т.д., полиимин(ы), такие как PEI: поли(этиленимин), поли(пропиленимин) и т.д., полиаллиламин, полимеры на основе сахарного остова, такие как полимеры на основе циклодекстрина, полимеры на основе декстрана, хитозан и т.д., полимеры на основе силанового остова, такие как сополимеры PMOXA-PDMS и т.д., блок-полимеры, состоящие из комбинации одного или более катионных блоков (например, выбранных из катионного полимера, как указано выше) и один или более гидрофильных или гидрофобных блоков (например, полиэтиленгликоль) и др.

Данное изобретение также предусматривает применение некатионных липидов, в том числе описанных в заявке на патент США № US 15/809680. Некатионные липиды включают, но не ограничиваются ими, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилфосфатидилэтаноламин (POPC),

пальмитоолеилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил ПЭ, 16-О-диметил ПЭ, 18-1-транс ПЭ, 1-стеароил-2-олеоилфосфатиддиэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь. Такие некатионные липиды можно использовать отдельно или в комбинации с другими вспомогательными веществами, например, катионными липидами. При применении в комбинации с катионным липидом некатионный липид может составлять молярное соотношение от 5% до около 90% или от около 10% до около 70% от общего количества липидов, присутствующих в переносчике.

Переносчик (например, липидная наночастица) может быть приготовлен путем объединения нескольких липидных и/или полимерных компонентов. Например, переносчик может быть приготовлен с применением C12-200, DOPE, холестерина, DMG-PEG2K в молярном соотношении 40:30:25:5 или DODAP, DOPE, холестерина, DMG-PEG2K в молярном соотношении 18:56:20:6, или HGT5000, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K при молярном соотношении 40:20:35:5, или HGT5001, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K при молярном соотношении 40:20:35:5. Выбор катионных липидов, некатионных липидов и/или липидов, модифицированных ПЭГ, которые содержат липидную наночастицу, а также относительное молярное соотношение таких липидов друг к другу основывается на характеристиках выбранного(ых) липида(ов), природы предполагаемых клеток-мишеней, характеристики доставляемой кольцРНК. Дополнительные соображения включают, например, насыщение алкильной цепи, а также размер, заряд, pH, pKa, фузогенность и токсичность выбранного(ых) липида(ов). Таким образом, молярные соотношения могут быть скорректированы соответствующим образом. Например, в некоторых вариантах реализации процентное содержание катионного липида в липидной наночастице может составлять более 10%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60% или более 70%. Процент некатионного липида в липидной наночастице может составлять более 5%, более 10%, более 20%, более 30% или более 40%. Процентное содержание холестерина в липидной наночастице может составлять более 10%, более 20%, более 30% или более 40%. Процент ПЭГ-модифицированного липида в липидной наночастице может составлять более 1%, более 2%, более 5%, более 10% или более 20%.

Переносчики для применения в композициях по данному изобретению могут быть приготовлены различными способами, которые в настоящее время известны в данной области техники. Многослойные везикулы (MLV) могут быть приготовлены с использованием обычных способов, например, путем нанесения выбранного липида на внутреннюю стенку подходящего контейнера или сосуда, растворения липида в подходящем растворителе и последующего выпаривания растворителя до образования тонкой пленки на внутренней стороне сосуда или распылительной сушкой. Затем водная фаза может быть добавлена в сосуд вихревым движением, что приводит к образованию MLV. Однослойные везикулы (ULV) затем могут быть образованы путем гомогенизации,

обработки ультразвуком или экструзии многослойных везикул. Кроме того, ULV может образовываться при использовании способов удаления детергентов.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения композиции по данному изобретению содержат переносчик, в котором кольцРНК связана как с поверхностью носителя, так и инкапсулирована в тот же носитель. Например, во время приготовления композиций по данному изобретению катионные переносчики могут связываться с кольцРНК посредством электростатических взаимодействий.

В некоторых вариантах реализации композиции по данному изобретению могут быть загружены диагностическим радионуклидом, флуоресцентными материалами или другими материалами, которые поддаются обнаружению как в применениях in vitro, так и in vivo. Например, подходящие диагностические материалы для применения в данном изобретении могут включать родамин-диолеоилфосфатидилэтаноламин (Rh-PE), кольцРНК зеленого флуоресцентного белка (кольцРНК GFP), кольцРНК люциферазы Renilla и кольцРНК люциферазы светлячка.

В некоторых вариантах реализации выбор подходящего размера переносчика принимает во внимание местонахождение клетки-мишени или ткани и, в некоторой степени, применение, для которого изготавливается липосома. В некоторых вариантах реализации может быть желательно ограничить трансфекцию кольцРНК определенными клетками или тканями. Например, для нацеливания на гепатоциты носитель может быть такого размера, чтобы его размеры были меньше, чем фенестрации эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды в печени. Соответственно, переносчик подходящего размера может легко проникать через такие эндотелиальные фенестрации и достигать гепатоцитов-мишеней. В качестве альтернативы переносчик может иметь такой размер, чтобы размеры липосомы имели достаточный диаметр для ограничения или явного предотвращения распространения в определенные клетки или ткани. Например, переносчик может быть такого размера, что его размеры превышают фенестрации эндотелиального слоя, выстилающего печеночные синусоиды, чтобы таким образом ограничить распространение переносчика в гепатоцитах. Как правило, размер переносчика находится в диапазоне от около 25 до 250 нм. В некоторых вариантах реализации размер переносчика составляет менее около 250 нм, 175 нм, 150 нм, 125 нм, 100 нм, 75 нм, 50 нм, 25 нм или 10 нм.

Существует множество альтернативных способов, известных в данной области техники, для определения размера совокупности переносчиков. Один из таких способов определения размеров описан в патенте США № 4737323, включенном в настоящее описание в качестве ссылки. Обработка липосомной суспензии либо в ультразвуковой бане, либо ультразвуковым зондом приводит к постепенному уменьшению размера до небольшого ULV диаметром менее около 0,05 микрон. Гомогенизация представляет собой еще один способ, основанный на энергии сдвига для фрагментации больших липосом на более мелкие. В типичной процедуре гомогенизации MLV рециркулируют через стандартный гомогенизатор эмульсии до тех пор, пока не будут наблюдаться выбранные

размеры липосом, обычно между около 0,1 и 0,5 микрон. Размер липосомальных везикул может быть определен с помощью квазиэлектрического светорассеяния (QELS), как описано в Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-450 (1981), включенной в данный документе в качестве ссылки. Средний диаметр липосомы может быть уменьшен путем обработки сформированных липосом ультразвуком. Периодические циклы обработки ультразвуком можно чередовать с оценкой QELS, чтобы обеспечить эффективный синтез липосом.

Кроме того, в некоторых вариантах реализации кольцевая РНК, представленная в данном документе, может быть составлена с использованием одной или более липосом, липоплексов или липидных наночастиц. В одном варианте реализации кольцевая РНК может быть составлена в виде липидных наночастиц, таких как те, которые описаны в международной публикации № WO2012170930, полностью включенной в данный документ посредством ссылки. В одном варианте реализации липид может быть расщепляемым липидом, таким как липид, описанный в международной публикации № WO2012170889, полностью включенной в данный документ посредством ссылки. В одном варианте реализации фармацевтические композиции кольцевой РНК могут включать по меньшей мере один из пегилированных липидов, описанных в международной публикации № WO2012099755, включенной в данный документ посредством ссылки. В одном варианте реализации состав липидных наночастиц может быть составлен способами, описанными в международных публикациях № WO 2011127255 или WO 2008103276, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. Липидная наночастица может быть покрыта или связана с сополимером, таким как, но не ограничиваясь этим, блок-сополимером, таким как блок-сополимер разветвленного простого полиэфира и полиамида, описанным в международной публикации № WO2013012476, включенной в данный документ посредством ссылки во всей ее полнота. Липосомы, липоплексы или липидные наночастицы могут быть использованы для повышения эффективности производства белка, направленного на кольцевую РНК, поскольку эти составы могут повышать трансфекцию клеток кольцевой РНК, увеличивать время полужизни кольцевой РНК in vivo или in vitro, и/или разрешить контролируемое высвобождение.

В других вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК, предложенный в данном документе, может быть составлен с применением одного или более полимеров. Полимер может быть включен и/или применен для инкапсуляции или частичной инкапсуляции РНК или липидной наночастицы. Полимер может быть биоразлагаемым и/или биосовместимым. Полимер может быть выбран из, но не ограничиваясь ими, полиаминов, простых полиэфиров, полиамидов, сложных полиэфиров, поликарбаматов, полимочевины, поликарбонатов, полистиролов, полиимидов, полисульфонов, полиуретанов, полиацетиленов, полиэтиленов, полиэтилениминов, полиизоцианатов, полиакрилатов, полиметакрилатов, полиакрилонитрилов и полиарилатов. Например, полимер может включать поли(капролактон) (PCL), полимер этиленвинилацетата (EVA), поли(молочную кислоту) (PLA), поли(L-молочную кислоту) (PLLA), поли(гликолевую

кислоту) (PGA), поли(молочную кислоту-со-гликолевую кислоту) (PLGA), поли(L-молочную кислоту-со-гликолевую кислоту) (PLLGA), поли(D, L-лактид) (PDLA), поли(L-лактид) (PLLA), поли(D, L-лактид-со-капролактон), поли(D, L-лактид-со-капролактон-согликолид), поли(D, L-лактид-со-PEO-со-D, L-лактид) , поли(D, L-лактид-со-PPO-со-D, L-лактид), полиалкилцианоакрилат, полиуретан, поли-L-лизин (PLL), гидроксипропилметакрилат (HPMA), полиэтиленгликоль, поли-L-глутаминовую кислоту, поли(оксикислоты), полиангидриды, полиортоэфиры, поли(эфирамиды), полиамиды, поли(эфирные эфиры), поликарбонаты, полиалкилены, такие как полиэтилен и полипропилен, полиалкиленгликоли, такие как поли(этиленгликоль) (ПЭГ), полиалкиленоксиды (ПАО), полиалкилентерефталаты, такие как поли(этилентерефталат), поливиниловые спирты (ПВС), поливиниловые эфиры, поливинилэфиры сложные эфиры, такие как поли(винилацетат), поливинилгалогениды, такие как поли(винилхлорид) (ПВХ), поливинилпирролидон (ПВП), полисилоксаны, полистирол, полиуретаны, производные целлюлозы, такие как алкилцеллюлозы, гидроксиалкилцеллюлозы, простые эфиры целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы, нитро целлюлозы, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, полимеры акриловых кислот, такие как поли(метил(мет)акрилат) (ПММА), поли(этил(мет)акрилат), поли(бутил(мет)акрилат), 363 5 10 15 20 25 30 35 WO 2021/076805 PCT/US2020/055844 поли(изобутил(мет)акрилат), поли(гексил(мет)акрилат), поли(изодецил(мет)акрилат), поли(лаурил(мет)акрилат), поли(фенил(мет)акрилат)метакрилат), поли(метилакрилат), поли(изопропилакрилат), поли(изобутилакрилат), поли(октадецилакрилат) и их сополимеры и смеси, полидиоксанон и его сополимеры, полигидроксиалканоаты, полипропиленфлимарат, полиоксиметилен, полоксамеры, полоксамины, поли(орто)эфиры, поли(масляная кислота), поли(валериановая кислота), поли(лактид-со-капро олактон), триметиленкарбонат, поли(N-акрилоилморфолин) (PAcM), поли(2-метил-2-оксазолин) (PMOX), поли(2-этил-2-оксазолин) (PEOZ) и полиглицерин.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует белок, состоящий из субъединиц, кодируемых более чем одним геном. Например, белок может быть гетеродимером, в котором каждая цепь или субъединица белка кодируется отдельным геном. Возможно, что в переносчик доставляется более одной молекулы кольцРНК, и каждая кольцРНК кодирует отдельную субъединицу белка. Альтернативно, может быть сконструирована одна кольцРНК, кодирующая более одной субъединицы (например, в случае одноцепочечного Fv-антитела). В некоторых вариантах реализации отдельные молекулы кольцРНК, кодирующие отдельные субъединицы, можно вводить в отдельных переносчиках.

Данное изобретение также предполагает селективное нацеливание на клетки и ткани-мишени с помощью как пассивных, так и активных средств нацеливания. Феномен пассивного нацеливания предусматривает использование природных закономерностей распределения средства доставки in vivo, не полагаясь на использование дополнительных вспомогательных веществ или средств для повышения распознавания переносчика

клетками-мишенями. Например, переносчики, которые подлежат фагоцитозу клетками ретикулоэндотелиальной системы, могут накапливаться в печени или селезенке, и, соответственно, могут обеспечивать средства для пассивного направления доставки композиций в такие клетки-мишени.

В качестве альтернативы, данное изобретение предланает активное нацеливание, которое включает использование нацеливающих фрагментов, которые могут быть связаны (либо ковалентно, либо нековалентно) с переносчиком, чтобы стимулировать локализацию такого переносчика в определенных клетках-мишенях или тканях-мишенях. Например, нацеливание может быть опосредовано включением одного или более эндогенных нацеливающих лигандов (например, аполипопротеина Е) в переносчики или на его поверхность, что способствует распространению в клетки-мишени или ткани-мишени. Распознавание нацеливающего лиганда тканью-мишенью активно способствует распространению переносчика в тканях и его клеточному поглощению и/или его содержания в клетках-мишенях и тканях-мишенях (например, включение нацеливающего лиганда аполипопротеина-Е в переносчик или на его поверхность способствует распознаванию и связыванию переносчика с эндогенными рецепторами липопротеинов низкой плотности, экспрессируемыми гепатоцитами). Композиция, предлагаемая в настоящем описании, может содержать лиганд, способный усиливать аффинность композиции к клетке-мишени. Нацеливающие лиганды могут быть связаны с внешним бислоем липидной частицы при составлении или после составления. Эти способы хорошо известны в данной области техники. Кроме того, в некоторых составах липидных частиц могут использоваться фузогенные полимеры, такие как PEAA, гемагглютинин, другие липопептиды (см. патентную заявку США № 08/835281 и 60/083294, которые включены в настоящее описание посредством ссылки) и другие особенности, полезные для внутриклеточной доставки и/или доставки in vivo. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению демонстрируют улучшенные трансфекторные характеристики и/или демонстрируют повышенную селективность по отношению к клеткам-мишеням или тканям-мишеням, представляющим интерес. Следовательно, предполагаемыми являются композиции, которые содержат один или более лигандов (например, пептиды, аптамеры, олигонуклеотиды, малые молекулы, витамин или другие молекулы), способных усиливать аффинность композиций и содержание нуклеиновых кислот в них для клеток-мишеней или тканей-мишеней. Пригодные лиганды могут быть необязательно связаны или соединены с поверхностью переносчика. В некоторых вариантах реализации изобретения нацеливающий лиганд может охватывать поверхность переносчика или быть инкапсулированым в переносчик. Пригодные лиганды выбираются, исходя из их физических, химических или биологических свойств (например, избирательной аффинности и/или распознавания поверхностных маркеров или характерных особенностей). Специфичные для клетки сайты-мишени и соответствующие им нацеливающие лиганды могут широко варьироваться. Пригодные нацеливающие лиганды выбираются так, чтобы использовать уникальные характеристики клетки-мишени,

тем самым позволяя композиции различать клетки-мишени от клеток-не мишеней. Например, композиции по данному изобретению могут включать поверхностные маркеры (например, аполипопротеин-В или аполипопротеин-Е), которые селективно повышают распознавание или аффинность к гепатоцитам (например, путем рецептор-опосредованного распознавания и связывания таких поверхностных маркеров). Кроме того, при использовании галактозы в качестве нацеливающего лиганда, можно было бы ожидать направления композиций по данному изобретению в паренхиматозные гепатоциты или, в альтернативном варианте, при использовании маннозы, содержащей остатки сахаров в качестве нацеливающего лиганда, можно было бы ожидать направления композиций по данному изобретению в эндотелиальные клетки печени (например, маннозы, содержащей остатки сахаров, которые могут связываться преимущественно с асиалогликопротеиновым рецептором или рецептором маннозы, присутствующих в гепатоцитах). (See Hillery A M, et al., "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc.) Наличие таких нацеливающих лигандов, которые конъюгированы с фрагментами, присутствующими в средстве доставки (например, липидной наночастицей) таким образом облегчает распознавание и поглощение композиций по данному изобретению в клетках-мишенях и тканях-мишенях. Примеры пригодных нацеливающих лигандов включают один или более пептидов, белков, малых молекул, аптамеров, витаминов и олигонуклеотидов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент избирательно опосредует опосредованный рецептором эндоцитоз в конкретной популяции клеток. В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент способен связываться с антигеном клеток печени. В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), нанотело, пептид, макроцикл на основе пептида, минитело, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или их фрагмент.

В некоторых вариантах реализации кольцевую РНК готовят в соответствии со способом, описанным в заявке на патент США 15/809680. В некоторых вариантах реализации в данном документе предлагается способ инкапсулирования кольцевой РНК в липидные наночастицы, включающий этапы формирования из липидов предварительно сформированных липидных наночастиц (т.е. сформированных в отсутствие РНК) и последующего объединения предварительно сформированных липидных наночастиц с РНК. В некоторых вариантах реализации новый способ составления приводит к получению состава РНК с более высокой активностью (экспрессия пептида или белка) и более высокой эффективностью (улучшение биологически значимого конечного результата) как in vitro, так и in vivo с потенциально лучшей переносимостью по сравнению с таким же составом РНК полученым без стадии предварительного формирования липидных наночастиц (например, путем объединения липидов непосредственно с РНК).

Для некоторых композиций катионных липидных наночастиц РНК для достижения высокой инкапсуляции РНК, РНК в буфере (например, цитратном буфере) необходимо

нагревать. В этих способах требуется нагревание до стадии составления (т.е. нагревание отдельных компонентов), поскольку нагревание после приготовления состава (постформирования наночастиц) не увеличивает эффективность инкапсуляции РНК в липидных наночастицах. Напротив, в некоторых вариантах реализации способов по данному изобретению порядок нагревания РНК, по-видимому, не влияет на процент инкапсуляции РНК. В некоторых вариантах реализации не требуется нагревания (т.е. поддержания при температуре окружающей среды) одного или более растворов, содержащих предварительно образованные липидные наночастицы, раствора, содержащего РНК, и смешанного раствора, содержащего РНК, инкапсулированную в липидные наночастицы, до или после стадии составления.

РНК может быть составлена 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 около или выше 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. В некоторых вариантах реализации подходящий раствор РНК может содержать РНК в концентрации в диапазоне от около 0,01 до 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.

Как правило, подходящий раствор РНК может также содержать буферный агент и/или соль. Как правило, буферные агенты могут включать Трис, HEPES, сульфат аммония, бикарбонат натрия, цитрат натрия, ацетат натрия, фосфат калия или фосфат натрия. В некоторых вариантах реализации подходящая концентрация буферного агента может находиться в диапазоне от около 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.

Примеры солей могут включать хлорид натрия, хлорид магния и хлорид калия. В некоторых вариантах реализации подходящая концентрация солей в растворе РНК может находиться в диапазоне от около 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.

В некоторых вариантах реализации подходящий раствор РНК может иметь pH в диапазоне около 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, 4,0-4,9, 4,0-4,8, 4,0-4,7, 4,0-4,6 или 4,0-4,5.

Для приготовления раствора РНК, подходящего для данного изобретения, можно использовать различные способы. В некоторых вариантах реализации РНК может быть непосредственно растворена в описанном в данном документе буферном растворе. В

некоторых вариантах реализации раствор РНК может быть получен путем смешивания исходного раствора РНК с буферным раствором перед смешиванием с липидным раствором для инкапсуляции. В некоторых вариантах реализации раствор РНК может быть получен путем смешивания исходного раствора РНК с буферным раствором непосредственно перед смешиванием с липидным раствором для инкапсуляции.

В соответствии с настоящим изобретением раствор липидов содержит смесь липидов, подходящих для образования липидных наночастиц для инкапсуляции РНК. В некоторых вариантах реализации подходящий липидный раствор основан на этаноле. Например, подходящий липидный раствор может содержать смесь желаемых липидов, растворенных в чистом этаноле (т.е. 100% этаноле). В другом варианте реализации подходящий липидный раствор основан на изопропиловом спирте. В другом варианте реализации подходящий липидный раствор представляет собой раствор на основе диметилсульфоксида. В другом варианте реализации подходящий липидный раствор представляет собой смесь подходящих растворителей, включая, но не ограничиваясь ими, этанол, изопропиловый спирт и диметилсульфоксид.

Подходящий липидный раствор может содержать смесь желаемых липидов в различных концентрациях. В некоторых вариантах реализации подходящий липидный раствор может содержать смесь желаемых липидов в общей концентрации в диапазоне от около 0,1 до 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.

Любые желаемые липиды можно смешивать в любых соотношениях, подходящих для инкапсулирования РНК. В некоторых вариантах реализации подходящий липидный раствор содержит смесь желаемых липидов, включая катионные липиды, вспомогательные липиды (например, некатионные липиды и/или холестериновые липиды) и/или пегилированные липиды. В некоторых вариантах реализации подходящий липидный раствор содержит смесь желаемых липидов, включая один или более катионных липидов, один или более вспомогательных липидов (например, некатионные липиды и/или холестериновые липиды) и/или один или более пегилированных липидов.

В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению трансфицируют или распределяются в клетки-мишени на избирательной основе (т.е. не трансфицируют клетки, не являющиеся мишенями). Композиции по изобретению могут быть получены для избирательного нацеливания на различные клетки-мишени, включая, но не ограничиваясь ими, гепатоциты, эпителиальные клетки, кроветворные клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, клетки легких, костные клетки, стволовые клетки, мезенхимальные клетки, нервные клетки (например, клетки мозговых оболочек, астроциты, моторные нейроны, клетки спинномозговых ганглиев и двигательные клетки переднего рога спинного мозга), клетки фоторецепторов (например, палочки и колбочки), пигментные эпителиальные клетки сетчатки, секреторные клетки, клетки сердца, адипоциты, клетки гладких мышц сосудов, кардиомиоциты, скелетные мышечные клетки, бета-клетки, клетки

гипофиза, синовиальные выстилающие клетки, клетки яичника, клетки яичек, фибробласты, В-клетки, Т-клетки, антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки), ретикулоциты, лейкоциты, гранулоциты и опухолевые клетки.

Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах реализации в данном документе предложены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие терапевтический агент, предложенный в данном документе. В некоторых вариантах реализации терапевтическое средство представляет собой полинуклеотид РНК, предложенный в данном документе. В некоторых вариантах реализации терапевтическое средство представляет собой полинуклеотид кольцевой РНК, предложенный в данном документе. В некоторых вариантах реализации терапевтический агент представляет собой вектор, предложенный в данном документе. В некоторых вариантах реализации терапевтический агент представляет собой клетку, содержащую полинуклеотид РНК, кольцевую РНК или вектор, представленные в настоящем документе (например, клетку человека, такую как антиген-презентирующую клетку человека). Согласно некоторым вариантам реализации композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиции, представленные в данном документе, содержат терапевтическое средство, предложенное в данном документе, в комбинации с другими фармацевтически активными агентами или лекарственными средствами, такими как противовоспалительные лекарственные средства или антитела, способные нацеливаться на В-клеточные антигены, например, антитела к CD20, например, ритуксимаб.

Что касается фармацевтических композиций, то фармацевтически приемлемым носителем может быть любой из обычно используемых носителей, и он ограничивается только физико-химическими соображениями, такими как растворимость и отсутствие реактивности с активным(и) агентом(ами), и путем введения. Описанные в данном документе фармацевтически приемлемые носители, например носители, адъюванты, вспомогательные вещества и разбавители, хорошо известны специалистам в данной области техники и легко доступны для широкой публики. Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель был химически инертным по отношению к терапевтическому агенту(ам) и не обладал вредными побочными эффектами или токсичностью в условиях применения.

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 данном документе.

В определенных вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит консервант. В некоторых вариантах реализации 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 около 0,0001% до около 2% от массы всей композиции.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит буфферный агент. В некоторых вариантах реализации подходящие буферные агенты 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 агентов. Буферный агент или их смеси обычно присутствуют в количестве от около 0,001% до около 4% от массы всей композиции.

В некоторых вариантах реализации концентрация терапевтического агента в фармацевтической композиции может варьироваться, например, менее чем около 1%, или по меньшей мере около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, или около 50% или более по массе, и может быть выбрана в первую очередь по объему жидкости и вязкости в соответствии с выбранным конкретным способом введения.

Следующие составы для перорального, аэрозольного, парентерального (например, подкожного, внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, внутрикожного, внутрибрюшинного и подоболочечного) и местного введения являются просто иллюстративными и никоим образом не ограничивают данное изобретение. Для введения терапевтических агентов, предложенных в данном документе, можно использовать более одного пути, и в некоторых случаях конкретный путь может обеспечить более немедленный и более эффективный ответ, чем другой путь.

Составы, подходящие для перорального введения, могут включать или состоять из (a) жидких растворов, таких как эффективное количество терапевтического агента, растворенного в разбавителях, таких как вода, физиологический раствор или апельсиновый сок; (b) капсулы, саше, таблетки, пастилки и пастилки, каждая из которых содержит заданное количество активного ингредиента в виде твердых веществ или гранул; (c) 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 вещества, красители, разбавители, буферные агенты, разрыхлители, увлажняющие агенты, консерванты, ароматизаторы и другие фармакологически совместимые вспомогательные

вещества. Формы для рассасывания могут содержать терапевтическое средство с вкусовой добавкой, обычно сахарозой, аравийской камедью или трагакантом. Пастилки могут содержать терапевтическое средство на инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь, эмульсии, гели и т.п., содержащие в дополнение к таким вспомогательным веществам, которые известны в данной области техники.

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 агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах реализации терапевтические агенты, представленные в данном 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 агента, такого как пектин, карбомеры, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза, или эмульгаторов и других фармацевтических адъювантов.

Масла, которые можно использовать в парентеральных составах в некоторых вариантах реализации, включают нефть, 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 изопропилмиристат являются примерами подходящих сложных эфиров жирных кислот.

Подходящие мыла для использования в некоторых вариантах реализации парентеральных составов включают соли жирных щелочных металлов, аммония и триэтаноламина, а подходящие детергенты включают (a) катионные детергенты, такие как, например, диметилдиалкиламмонийгалогениды и галогениды алкилпиридиния, (b) анионные детергенты, такие как, например, алкил-, арил- и олефинсульфонаты, алкил-, олефино, эфир и моноглицеридсульфаты и сульфосукцинаты, (c) неионогенные детергенты, такие как, например, оксиды жирных аминов, алканоламиды жирных кислот и сополимеры полиоксиэтилена и полипропилена, (d) амфотерные детергенты, такие как, например, алкил-β-аминопропионаты и четвертичные аммониевые соли 2-алкилимидазолина, и (e) их смеси.

В некоторых вариантах реализации парентеральные составы будут содержать, например, от около 0,5% до около 25% по массе терапевтического агента в растворе. Можно использовать консерванты и буферы. Чтобы свести к минимуму или устранить раздражение в месте инъекции, такие композиции могут содержать одно или болеео неионогенных поверхностно-активных веществ, имеющих, например, гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) от около 12 до около 17. Количество поверхностно-активного вещества в таких составах обычно составляет, например, от около 5% около до 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 лекарственные формы могут быть представлены в однодозовых или многодозовых запечатанных контейнерах, таких как ампулы или флаконы, и могут храниться в лиофилизированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого вспомогательного вещества, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Инъекционные растворы и суспензии можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных ранее.

В некоторых вариантах реализации в данном документе предложены состав для инъекции. 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., pages 238-250 (1982), и ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed, pages 622-630 (1986)).

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены составы для местного применения. Составы для местного применения, в том числе те, которые пригодны для чрескожного высвобождения лекарственного средства, подходят в контексте определенных вариантов реализации, предложенных в данном документе, для нанесения на кожу. В некоторых вариантах реализации 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-пропеланты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п. Они также могут быть приготовлены в виде фармацевтических препаратов для составов без давления, таких как небулайзер или распылитель. Такие составы в виде спрея также можно использовать для распыления на слизистую оболочку.

В некоторых вариантах реализации терапевтические агенты, представленные в данном документе, могут быть приготовлены в виде комплексов включения, таких как комплексы включения циклодекстрина, или липосом. Липосомы могут служить для нацеливания терапевтических агентов на конкретную ткань. Липосомы также можно использовать для увеличения периода полужизни терапевтических агентов. Различные способы доступны для получения липосом, как описано, например, в Szoka et al., Ann. Rev.

Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980) и патентах США 4235871, 4501728, 4837028, и 5019369.

В некоторых вариантах реализации терапевтические агенты, представленные в данном документе, составлены в виде систем доставки с пролонгированным высвобождением, отсроченным высвобождением или пролонгированным высвобождением, так что доставка композиции происходит до и с достаточным временем, чтобы вызвать сенсибилизацию участка, подлежащего лечению. Такие системы позволяют избежать повторного введения терапевтического агента, повышая тем самым удобство для субъекта и врача, и могут быть особенно подходящими для некоторых вариантов реализации композиции, предложенных в данном документе. В одном варианте реализации изобретения композиции по данному изобретению составляют таким образом, чтобы они были пригодны для длительного высвобождения кольцРНК, содержащейся в них. Такие композиции с пролонгированным высвобождением могут быть удобными для введения субъекту при длительных интервалах дозирования. Например, в одном варианте реализации изобретения, композиции согласно данному изобретению вводят субъекту два раза в день, ежедневно или через день. В предпочтительном варианте реализации изобретения композиции по данному изобретению вводят субъекту два раза в неделю, один раз в неделю, каждые десять дней, каждые две недели, один раз в три недели или более предпочтительно каждые четыре недели, один раз в месяц, каждые шесть недель, каждые восемь недель, каждый следующий месяц, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые шесть месяцев, каждые восемь месяцев, каждые девять месяцев или один раз в год.

В некоторых вариантах реализации белок, кодируемый полинуклеотидом по 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 реализации полипептид экспрессируется на пиковом уровне через около шесть часов после введения. В некоторых вариантах реализации экспрессия полипептида поддерживается по меньшей мере на терапевтическом уровне. В некоторых вариантах реализации полипептид экспрессируется на по меньшей мере 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 реализации полипептид обнаруживается на терапевтическом уровне в ткани пациента (например, в печени или легком). В некоторых вариантах реализации уровень детектируемого полипептида зависит от непрерывной экспрессии из кольцРНК композиции в течение периодов времени более одного, более четырех, более шести, более 12, более 24, более 48 или более 72 часов после введения.

В некоторых вариантах реализации белок, кодируемый полинуклеотидом по изобретению, продуцируется в количествах, превышающих нормальные физиологические уровни. Уровень белка может быть повышен по сравнению с контролем. В некоторых вариантах реализации контроль представляет собой исходный физиологический уровень полипептида у нормального индивидуума или в популяции нормальных индивидуумов. В других вариантах реализации 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 реализации контроль может представлять собой нормальный уровень соответствующего белка или полипептида у индивидуума, которому вводят композицию. В других вариантах реализации контроль представляет собой уровень экспрессии полипептида при другом терапевтическом вмешательстве, например, при прямой инъекции соответствующего полипептида в один или более сравнимых моментов времени.

В некоторых вариантах реализации уровни белка, кодируемого полинуклеотидом по изобретению, обнаруживаются через 3 дня, 4 дня, 5 дней или 1 неделю или более после введения. В ткани (например, в печени или легких) может наблюдаться повышенный уровень белка.

В некоторых вариантах реализации способ обеспечивает устойчивый период полужизни в циркуляции белка, кодируемого полинуклеотидом по изобретению. Например, белок можно обнаружить на несколько часов или дней дольше, чем период полувыведения, наблюдаемый при подкожной инъекции белка или мРНК, кодирующей белок. В некоторых вариантах реализации период полувыведения белка составляет 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней или 1 неделю или более.

Многие типы систем доставки-высвобождения доступны и известны специалистам в данной области техники. Они включают системы на основе полимеров, такие как поли(лактид-гликолид), сополиоксалаты, поликапролактоны, полиэфирамиды, полиортоэфиры, полигидроксимасляная кислота и полиангидриды. Микрокапсулы вышеуказанных полимеров, содержащие лекарственные средства, 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 выпуска гидрогеля; силастические системы; системы на основе пептидов: восковые покрытия; прессованные таблетки с использованием обычных связующих веществ и вспомогательных веществ; частично сросшиеся имплантаты; и тому подобное. Конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими: (a) эрозионные системы, в которых активная композиция содержится в форме в матрице, такой как описанные в патентах США 4452775, 4667014, 4748034 и 5239660, и (b) диффузионные системы в которых активный компонент проникает с контролируемой 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.

В некоторых вариантах реализации терапевтический агент может быть конъюгирован прямо или косвенно через связывающий фрагмент с нацеливающим фрагментом. Способы конъюгирования терапевтических агентов с молекулами-мишенями известны в данной области. См., например, Wadwa et al., J, Drug Targeting 3:111 (1995) и

патент США №5087616.

В некоторых вариантах реализации терапевтические агенты, представленные в данном документе, приготовлены в форме депо, так что способ, которым терапевтический агент высвобождается в организм, которому его вводят, контролируется в отношении времени и местоположения в организме (см. например, патент США 4450150). Депо-формы терапевтических агентов могут представлять собой, например, имплантируемую композицию, содержащую терапевтические агенты и пористый или непористый материал, такой как полимер, где терапевтические агенты инкапсулированы или диффундируют в материале и/или разрушение непористого материала Затем депо имплантируют в нужное место в организме, и терапевтические агенты высвобождаются из имплантата с заданной скоростью.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

В некоторых аспектах в данном документе предложен способ лечения и/или предотвращение состояния, например, вирусной инфекции.

В некоторых вариантах реализации терапевтические средства, предложенные в данном документе, вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими средствами (например, в одной и той же фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях). В некоторых вариантах реализации терапевтическое средство, предложенное в данном документе, можно вводить первым, а одно или более дополнительных терапевтических средств можно вводить вторым, или наоборот. Альтернативно, терапевтическое средство, предложенное в данном документе, и одно или более дополнительных терапевтических средств можно вводить одновременно.

В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах реализации млекопитающим, упомянутым в данном документе, может быть любое млекопитающее, включая, но не ограничиваясь ими, 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 Canines (собаки). Млекопитающие могут быть из отряда Artiodactyla, включая крупный рогатый скот (коровы) и свиней (свиньи), или из отряда Perssodactyla, включая лошадей (лошадей). Млекопитающие могут относиться к отряду приматов, цебоидов или симоидов (обезьяны) или к отряду антропоидов (люди и человекообразные обезьяны). Предпочтительно млекопитающим является человек.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Таблица 1. Последовательности IRES.

SEQ ID NO:	IRES	Последовательность
1	EMCV-A	ccccccctctccctcccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtg tgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaa acctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatg

		caaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaaca acgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctct gcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgcc acgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaaca aggggctgaaggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcg gtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccac ggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataatatggccacaacc
2	EMCV-B	ctccccctcccccccccttactatactggccgaagccacttggaataaggccggtgtgcg tttgtctacatgctattttctaccgcattaccgtcttatggtaatgtgagggtccagaacctg accctgtcttcttgacgaacactcctaggggtctttcccctctcgacaaaggagtgtaag gtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttaaagacaaacaacgt ctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccacctggtgacaggtgcctctgcgg ccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgtt gtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggg gctgaaggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgc acgtgctttacacgtgttgagtcgaggtgaaaaaacgtctaggccccccgaaccacgg ggacgtggttttcctttgaaaaccacgattacaat
3	EMCV-Bf	ttgccagtctgctcgatatcgcaggctgggtccgtgactacccactcccccttcaacgt gaaggctacgatagtgccagggcgggtactgccgtaagtgccaccccaaacaacaac aacaaaacaaactccccctcccccccccttactatactggccgaagccacttggaataag gccggtgtgcgtttgtctacatgctattttctaccgcattaccgtcttatggtaatgtgaggg tccagaacctgaccctgtcttcttgacgaacactcctaggggtctttcccctctcgacaaa ggagtgtaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttaaaga caaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccacctggtgacaggt gcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccc agtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtatt caacaaggggctgaaggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctgggg cctcggtgcacgtgctttacacgtgttgagtcgaggtgaaaaaacgtctaggcccccg aaccacggggacgtggttttcctttgaaaaccacgattacaat
4	EMCV-Cf	ttgccagtctgctcgatatcgcaggctgggtccgtgactacccactcccccttcaacgt gaaggctacgatagtgccagggcgggtactgccgtaagtgccaccccaaaacaacaa caacccccccctctccctccTcccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataa ggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagg gcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgcc aaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttga

		agacaaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccacctggcgac aggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaa ccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagc gtattcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatct ggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccc ccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataat
5	EMCV pEC9	ccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtct atatgttatttttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccct gtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgt tgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtag cgacccttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaa agccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgag ttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaa ggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgct ttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccgaaccacggggacgtgg ttttcctttgaaaaacacgatgataat
6	Пикобирнавирус	gtaaattaaatgctatttacaaaatttaaacagaaaggagagatgttatgaaccggttttac aaggtttcatacatcgaaaatagcactacctggggcagccgacacactaacatcgtctg tttaaccagaagtgttactgaaaggaggttattta
7	HCV QC64	acctgcccctaataggggcgacactccgccatgaatcactcccctgtgaggaactactg tcttcacgcagaaagcgtctagccatggcgttagtatgagtgtcgtacagcctccaggc ccccccctcccgggagagccatagtggtctgcggaaccggtgagtacaccggaattg ccgggaagactgggtcctttcttggataaacccactctatgcccggacatttgggcgtgc ccccgcaagactgctagccgagtagcgttgggttgcgaaaggccttgtggtactgcct gatagggtgcttgcgagtgccccgggaggtctcgtagaccgtgcatc
8	Козавирус человека E/D	ctacaagctttgtgtaaacaaacttttgtttggcttttctcaagcttctctcacatcaggcccc aaagatgtcctgaaggtaccccgtgtatctgaggatgagcaccatcgactacccggac ctgcaaaattttgcaaacgcatgtggtatcccagccccctcctctcggggaggggcttt gctcactcagcacaggatctgatcaggagatccacctccggtgctttacaccggggcgt ggatttaaaaattgcccaaggcctggcgcacaacctaggggactaggttttccttatattt taaagctgtcaat
9	Козавирус человека F	gtcttaggacgacgcatgtggtatcccagcccccgcctacattggcgggggcttttgaa gcaccagacactggatctgatcaggaggagggtagctgctttacagcccctcttaaaaa ttgcccaaggtccggccacccaacctaggggactaggttttccttttatttttaaattgtcat t

10	Козавирус человека JMY	acatgggggagactgcatgtggcagtcttgaaacgtgtggtttgacgtctaccttatatg gcagtgggtggagtactgcaaagatgtcaccgtgctttacacggtttttgaaccccacac cggctgtttgacgctcgtagggcagcaggtttattttcattaaaattcttactttctagctgc atgagttctattcatgcagacggagtgatactcccgttccttcttggacaggttgcctcca cgccctttgtggatcttaaggtgaccaagtcactggtgttggaggtgaagatagagagtc ctcttgggaatgtcatgtggctgtgccaggggttgtagcgatgccattcgtgtgtgcgga tttcctctcgtggtgacacgagcctcacaggccaaaagccccgtccgaaaggacccga atggtggagtgaccctgactccccctgcatagttttgtgattaggaacttgaggaatttct gtcataaatctctatcacatcaggccccaaagatgtcctgaaggtaccctgtgtatctgag gatgagcaccaccgactacccggacttgcattagcagacacatgtggttgcccagccc cacctcttcagaggtggggctttgctcactcagcacaggatctgatcaggagccccgct cgtgtgctttacactcgacgcggggttaaaaattgcccaaggcctggcacaacaaccta ggggactaggttttcctatttttgtaaattatgtcaat
11	Риновирус NAT001	gtgacaatcagccagattgttaacggtcaagcacttctgtttccccggtacccttgtatac gcttcacccgaggcgaaaagtgaggttatcgttatccgcaaagtgcctacgagaagcct agtagcacttttgaagcctatggctggtcgctcaactgtttacccagcagtagacctggc agatgaggctagatgttccccaccagcgatggtgatctagcctgcgtggctgcctgcac actctattgagtgtgaagccagaaagtggacaaggtgtgaagagcctattgtgctcactt tgagtcctccggcccctgaatgtggctaatcctaaccccgtagctgttgcatgtaatcca acatgtctgcagtcgtaatgggcaactatgggatggaaccaactactttgggtgtccgtg tttcttgtttttctttatgcttgcttatggtgacaactgtagttattacatttgttacc
12	HRV14	ttaaaacagcggatgggtatcccaccattcgacccattgggtgtagtactctggtactatg taccttttgtacgcctgtttctccccaaccacccttccttaaaattcccacccatgaaacgtta gaagcttgacattaaagtacaataggtggcgccatatccaatggtgtctatgtacaagca cttctgtttcccaggagcgaggtataggctgtacccactgccaaaagcctttaaccgttat ccgccaaccaactacgtaacagttagtaccatcttgttcttgactggacgttcgatcaggt ggattttccctccactagtttggtcgatgaggctaggaattccccacgggtgaccgtgtc ctagcctgcgtggcggccaacccagcttatgctgggacgccctttaaggacatggtgt gaagactcgcatgtgcttggttgtgagtcctccggcccctgaatgcggctaaccttaacc ctagagccttatgccacgatccagtggttgtaaggtcgtaatgagcaattccgggacgg gaccgactactttgggtgtccgtgtttctcatttttcttcatattgtcttatggtcacagcatat atatacatatactgtgatc
13	HRV89	ttaaaactgggagtgggttgttcccactcactccacccatgcggtgttgtactctgttatta cggtaactttgtacgccagtttttcccacccttccccataatgtaacttagaagtttgtacaa tatgaccaataggtgacaatcatccagactgtcaaaggtcaagcacttctgtttccccggt

		caatgaggatatgctttacccaaggcaaaaaccttagagatcgttatccccacactgcct acacagagcccagtaccatttttgatataattgggttggtcgctccctgcaaacccagca gtagacctggcagatgaggctggacattccccactggcgacagtggtccagcctgcgt ggctgcctgctcacccttcttgggtgagaagcctaattattgacaaggtgtgaagagcc gcgtgtgctcagtgtgcttcctccggcccctgaatgtggctaaccttaaccctgcagccg ttgcccataatccaatgggtttgcggtcgtaatgcgtaagtgcgggatgggaccaacta ctttgggtgtccgtgtttcctgtttttcttttgattgcattttatggtgacaatttatagtgtatag attgtcatc
14	HRVC-02	ttaaaactgggtacaggttgttcccacctgtatcacccacgtggtgtggtgctcttgtattc cggtacacttgcacgccagtttgccacccctcacccgtcgtaacttagaagctaacaact cgaccaacaggcggtggtaaaccataccacttacggtcaagcactcctgtttccccggt atgcgaggaatagactcctacagggttgaagcctcaagtatcgttatccgcattggtact acgcaaagcttagtagtgccttgaaagtcccttggttggtcgctccgctagtttccctag tagacctggcagatgaggcaggacactccccactggcgacagtggtcctgcctgcgt ggctgcctgcgcacccttaggggtgcgaagccaagtgacagacaaggtgtgaagag ccccgtgtgctaccaatgagtcctccggcccctgaatgcggctaatccaaccccacag ctattgcacacaagccagtgtgtatgtagtcgtaatgagcaattgtgggacggaaccga ctactttgggtgtccgtgtttccttttattcttatcattctgcttatggtgacaatactgtgaaat agtgttgttacc
15	HRV-A21	taaaactggatccaggttgttcccacctggatctcctattgggagttgtactctattattccg gtaattttgtacgccagttttatcttccccctccccaattgtaacttagaaggttatcaatacg accaataggtggtagttagccaaactaccaaaggtcaagcacttctgtttccccggtcaa agttgatatgctccaacagggcaaaaacaactgagatcgttatccgcaaagtgcctacg caaagcctagtaacacctttgaagatttatggttggtcgttccgctatttcccatagtagac ctggcagatgaggctagaaatcccccactggcgacagtgctctagcctgcgtggctgc ctgcgcacccctttgggtgcgaagccatacattggacaaggtgtgaagagccccgtgtg ctcactttgagtcctccggcccctgaatgtggctaaccttaaccctgcagctagtgcatgt aatccaacatgttgctagtcgtaatgagtaattgcgggacgggaccaactactttgggtg tccgtgtttcacttttttccttttaatattgcttatggtgacaatatatatagctatatatattgaca cc
16	Саливирус A SH1	ttcccctgcaaccattacgcttactcgcatgtgcattgagtggtgcatgtgttgaacaaac agctacactcacatgggggcgggttttcccgccctacggcttctcgcgaggcccaccc ctccccttttctcccataactacagtgctttggtaggtaagcatcctgatcccccgcggaag ctgctcacgtggcaactgtggggacccagacaggttatcaaaggcacccggtctttcc gccttcaggagtatccctgctagcgaattctagtagggctctgcttggtgccaacctccc

		ccaaatgcgcgctgcgggagtgctcttccccaactcaccctagtatcctctcatgtgtgt gcttggtcagcatatctgagacgatgttccgctgtcccagaccagtccagtaatggacg ggccagtgtgcgtagtcgtcttccggcttgtccggcgcatgtttggtgaaccggtgggg taaggttggtgtgcccaacgcccgtactcaggggatacctcaaggcacccaggaatgc cagggaggtaccccgcttcacagcgggatctgaccctggggtaaatgtctgcggggg gtcttcttggcccacttctcagtacttttcagg
17	Саливирус FHB	acatgggggtctgcggacggcttcggcccacccgcgacaagaatgccgtcatctgt cctcattacccgtattccttcccttcccccgcaaccaccacgcttactcgcgcacgtgttg agtggcacgtgcgttgtccaaacagctacacccacacccttcggggcgggtttgtccc gccctcgggttcctcgcggaaccccccccctccctctctctctttctatccgccctcacttc ccataactacagtgctttggtaggtgagcaccctgacccccccgcggaagctgctaacgt ggcaactgtggggatccaggcaggttatcaaaggcacccggtctttccgccttcagga gtatctctgccggtgaattccggtagggctctgcttggtgccaacctcccccaaatgcgc gctgcgggagtgctcttccccaactcatcttagtaacctctcatgtgtgtgcttggtcagc atatctgaggcgacgttccgctgtcccagaccagtccagcaatggacgggccagtgtg cgtagtcgctttccggttttccggcgcatgtttggcgaaacgctgaggtaaggttggtgt gcccaacgcccgtaatttggtgatacctcaagaccacccaggaatgccagggaggtac cccacttcggtgggatctgaccctgggctaattgtctacggtggttcttcttgcttccactt ctctttttctggcatg
18	Саливирус NG-J1	tatggcaggcgggcttgtggacggcttcggcccacccacagcaagaatgccatcatct gtcctcacccccaattttccctttcttcccctgcaaccattacgcttactcgcatgtgcatt gagtggtgcatgtgttgaacaaacagctacactcacatgggggcgggttttcccgccct acggcctctcgcgaggcccacccctccctcccctataactacagtgctttggtaggta agcatcctgatcccccgcggaagctgctcacgtggcaactgtggggacccagacagg ttatcaaaggcacccggtctttccgccttcaggagtatccctactagtgaattctagcggg gctctgcttggtgccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgctcttccccaactc accctagtatcctctcatgtgtgtgcttggtcagcatatctgagacgatgttccgctgtccc agaccagtccagtaatggacgggccagtgcgtgtagtcgtcttccggcttgtccgggg catgtttggtgaaccggtggggtaaggttggtgtgcccaacgcccgtactttggtgaca cctcaagaccacccaggaatgccagggaggtaccccacctcacggtgggatctgacc ctgggctaattgtctacggtggttcttcttgcttccacttctttcttctgttcacg
19	Пареховирус человека 1	tttgaaaggggtctcctagagagcttggccgtcgggccttataccccgacttgctgagttt ctctaggagagccctttcccagccctgaggcggctggtcaataaaagcctcaaacgta actaacacctaagaagatcatgtaaaccctatgcctggtctccactattcgaaggcaactt gcaataagaagagtgggatcaagacgcttaaagcatagagacagttttcttttctaaccc

		acatttgtgtggggtggcagatggcgtgccataactctaatagtgagataccacgcttgt ggaccttatgctcacacagccatcctctagtaagtttgtgagacgtctggtgacgtgtgg gaacttattggaaacaacattttgctgcaaagcatcctactgccagcggaaaaacacctg gtaacaggtgcctctggggccaaaagccaaggtttaacagacccttaggattggttcta aacctgagatgttgtggaagatatttagtacctgctgatctggtagttatgcaaacactagt tgtaaggcccatgaaggatgcccagaaggtacccgtaggtaacaagtgacactatgga tctgatttggggccagatacctctatcttggtgatctggttaaaaaacatctaatgggcca aacccgggggggatccccggtttcctcttattctatcaatgccact
20	Крохивирус B	gtataagagacaggtgtttgccttgtcttcggactggcatcttgggaccaacccccctttt ccccagccatgggttaaatggcaataaaggacgtaacaactttgtaaccattaagctttgt aattttgtaaccactaagctttgtgcacataatgtaaccatcaagcttgttagtcccagcag gaggtttgcatgcttgtagccgaaatggggctcgacccccccatagtaggatacttgatttt gcattccattgtggacctgcaaactctacacatagaggctttgtcttgcatctaaacacct gagtacagtgtgtacctagaccctatagtacgggaggaccgtttgtttcctcaataaccct acataataggctaggtgggcatgcccaatttgcaagatcccagactgggggtcggtctg ggcagggttagatccctgttagctactgcctgatagggtggtgctcaaccatgtgtagttt aaattgagctgttcatatacc
21	Yc-3	actgaagatcctacagtaactactgccccaatgaacgccacagatgggtctgctgatga ctacctatcttagtgctagttgaggtttgaagtgagccggtttttagaagaaccagtttctg aacattatcatccccagcatctattctatacgcacaagatagatagtcatcagcagacac atctgtgctactgcttgatagagttgcggctggtcaacttagattggtataaccagttgagt ggcaa
22	Розавирус M-7	tatgcatcactggacggcctaacctcggtcgtggcttcttgccgatttcagcgctaccag gctttctggtctcgccaggcgttgattagtaggtgcactgtctaagtgaagacagcagtg ctctctgtgaaaagttgatgacactcttcaggtttgtagcgatcactcaaggctagcggat ttccccgtgtggtaacacacgcctctaggcccagaaggcacggtgttgacagcacccc ttgagtggctggtcttccccaccagcacctgatttgtggattcttcctagtaacggacaag catggctgctcttaagcattcagtgcgtccggggctgaaggatgcccagaaggtaccc gcaggtaacgataagctcactgtggatctgatctggggctgcgggctgggtgtctttcc acccagccaaaacccgtaaaacggtagtcgcagttaaaaaacgtctaggccccaccc ccccagggatgggggttcccttaaaccctcacaagttcaac
23	Шанбавирус A	tgaaaaggggcgcagggtggtggtggttactaaatacccaccatcgccctgcacttc ccttttcccctgtggctcagggtcacttagccccctctttgggttaccagtagttttctaccc ctgggcacagggttaactatgcaagacggaacaacaatctcttagtccccctcgccgat agtgggctcgacccccatgtgtaggagtggataagggacggagtgagccgatacgg

		ggaagagtgtgcggtcacaccttaattccatgagcgctgcgaagaaggaagctgtgaa caatggcgacctgaaccgtacacatggagctccacaggcatggtactcgttagactac gcagcctggttgggagtgggtataccctgggtgagccgccagtgaatgggagttcact ggttaacacacactgcctgatagggtcagggcctcctgtccccgccgtaatgaggtag accatatgcc
24	Пазивирус A	gcggctggatattctggccgtgcaactgcttttgaccagtggctctgggtaacttagcca aagtgtccttctccctttccctattatatgttttatggctttgtctggtcttgtttagtttatatata agatcctttccgccgatatagacctcgacagtctagtgtaggaggattggtgatattaattt gccccagaagagtgaccgtgacacatagaaaccatgagtacatgtgtatccgtggagg atcgcccgggactggattccatatcccattgccatcccaacaagcggagggtataccca ctatgtgcacgtctgcagtgggagtctgcagatttagtcatactgcctgatagggtgtgg gcctgcactctggggtactcaggctgtttatataat
25	Пазивирус A 2	gctggactttctggctgcgcaactgcttttaaccagtggctctgggttacttagccaaaac ccccttttccccgtaccctagtttgtgtgtgtattattattttgttgttgttttgtaaatttttatata agatcctttccgccgatatagacctcgacagtctagtgtaggaggattggtgatattaata tgccccagaagagtgaccgtgacacatagaaaccatgagtacatgtgtatccgtggag gatcgcccgggactggattccatatcccattgccatcccaacaaacggagggtataccc gctatgtgcgcgtctacagtgggaatctgtagatttagtcatactgcctgatagggtgtgg gcctgcactctggggtactcaggctgtttatataat
26	Эховирус E14	ttaaaacagcctgtgggttgttcccatccacagggcccactgggcgccagcactctggt attgcggtaccttagtgcgcctgttttatatacccgtcccccaaacgtaacttagacgcat gtcaacgaagaccaatagtaagcgcagcacaccagctgtgttccggtcaagcacttct gttaccccggaccgagtatcaataagctactcacgtggctgaaggagaaaacgttcgtt acccgaccaattacttcaagaaacctagtaacaccatgaaggttgcgcagtgtttcgctc cgcacaaccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggtgaccgt ggcggtggctgcgctggcggcctgcccatggggaaacccatgggacgcttcaatact gacatggtgcgaagagtctattgagctaattggtagtcctccggcccctgaatgcggct aatcctaactgcggagcagatacccacacaccagtgggcagtctgtcgtaacgggcaa ctctgcagcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttctctttatccttatactggctgctt atggtgacaattgagagattgttaccatatagctattggattggccatccggtgacaaata gagcaattgtgtatttgtttgttggtttcgtgccattaaattacaaggttctaaacacccttaa tcttattatagcattcaacacaacaaa
27	Пареховирус человека 5	gtacattagatgcgtcatctgcaactttagtcaataaattacctccaatgtcattaccaacat tccctacctttttcactaacacctaagacaacaagtacctatgcctggtctccactattcgaa ggcaacttgcaataagaagagtggaattaagacgcttaaagcatagagctagttatctttt

		ctaacccacaaagttttgtggggtggcagatggcgtgccataactctattagtgagatac catgcttgtggatcttatgctcacacagccatcctctagtaagttgataaggtgtctggtga tatgtgggaactcacatgaaccattaatttaccgtaaggtatcctatagccagcggaatca catctggtgacagatgcctctggggccgaaagccaaggtttaacagaccctataggatt ggtttcaaaacctgaattgatgtggattgtgtatagtacctgttgatctggtaacagtgtca acactagttgtaaggcccacgaaggatgcccagaaggtacccgtaggtaacaagtga cactatggatctgatctggggccagctacctctatcatggtgagttggttaaaaaacgtct agtgggccaaacccaggggggatccctggtttccttttacctaatcaaagccact
28	Вирус Аичи	tttgaaaaggggggtgggggggcctcggccccctcaccctcttttccggtggtctggtcc cggaccaccgttactccattcagcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcac ccatactccccccacccccctttttgtaactaagtatgtgtgctcgtgatcttgactcccacg gaacggaccgatccgttggtgaacaaacagctaggtccacatcctcccttcccctggg agggcccccgccctcccacatcctcccccccagcctgacgtatcacaggctgtgtgaag cccccgcgaaagctgctcacgtggcaattgtgggtcccccccttcatcaagacaccagg tctttcctccttaaggctagccccggcgtgtgaattcacgttgggcaactagtggtgtcac tgtgcgctcccaatctcggccgcggagtgctgttccccaagccaaaccccctggcccttc actatgtgcctggcaagcatatctgagaaggtgttccgctgtggctgccaacctggtga caggtgccccagtgtgcgtaaccttcttccgtctccggacggtagtgattggttaagattt ggtgtaaggttcatgtgccaacgccctgtgcgggatgaaacctctactgccctaggaat gccaggcaggtaccccacctccgggtgggatctgagcctgggctaattgtctacgggt agtttcatttccaatccttttatgtcggagtc
29	Вирус гепатита А HA16	ttcaagaggggtctccggagttttccggaacccctcttggaagtccatggtgaggggac ttgatacctcaccgccgtttgcctaggctataggctaaatttccctttccctgtccttcccct atttccttttgttttgtttgtaaatattaattcctgcaggttcagggttctttaatctgtttctctat aagaacactcaatttttcacgctttctgtctcctttcttccagggctctccccttgccctagg ctctggccgttgcgcccggcggggtcaactccatgattagcatggagctgtaggagtct aaattggggacgcagatgtttgggacgtcgccttgcagtgttaacttggctttcatgaacc tctttgatcttccacaaggggtaggctacgggtgaaacctcttaggctaatacttcaatga agagatgccttggatagggtaacagcggcggatattggtgagttgttaagacaaaaacc attcaacgccggaggactggctctcatccagtggatgcattgagggaattgattgtcag ggctgtctctaggtttaatctcagacctctctgtgcttagggcaaacactatttggccttaa atgggatcctgtgagaggggtccctccattgacagctggactgttctttggggccttat gtggtgtttgcctctgaggtactcaggggcatttaggtttttcctcattcttaaataata
30	Фопивирус	gggagtaaacctcaccaccgtttgccgtggtttacggctacctatttttggatgtaaatatt aattcctgcaggttcaggtctcttgaattatgtccacgctagtggcactctcttacccataa

		gtgacgccttagcggaacctttctacacttgatgtggttaggggttacattatttccctggg ccttctttggccctttttcccctgcactatcattctttcttccgggctctcagcatgccaatgtt ccgaccggtgcgcccgccggggttaactccatggttagcatggagctgtaggccctaa aagtgctgacactggaactggactattgaagcatacactgttaactgaaacatgtaactc caatcgatcttctacaaggggtaggctacgggtgaaacccccttaggttaatactcatattg agagatacttctgataggttaaggttgctggataatggtgagtttaacgacaaaaaccatt caacagctgtgggccaacctcatcaggtagatgcttttggagccaagtgcgtaggggt gtgtgtggaaatgcttcagtggaaggtgccctcccgaaaggtcgtaggggtaatcagg ggcagttaggtttccacaattacaatttgaa
31	CVA10	gctcttccgatctgggttgttcccacccacagggcccactgggcgccagcactctgatt ccacggaatctttgtgcgcctgttttacaacccttcccaatttgtaacgtagaagcaataca cactactgatcaatagtaggcatggcgcgccagtcatgtcatgatcaagcacttctgttc ccccggactgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgttcgttaccc ggctaactacttcgagaaacctagtagcaccatggaagctgcggagtgtttcgctcagc actttccccgtgtagatcaggtcgatgagtcactgcaatccccacgggcgaccgtggca gtggctgcgttggcggcctgcctatggggcaacccataggacgctctaatgtggacat ggtgcgaagagtctattgagctagttagtagtcctccggcccctgaatgcggctaatcct aactgcggagcacatgccttcaacccaggaggtggtgtgtcgtaacgggtaactctgc agcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttatcctatattggctgcttatggtg acaatcacggaattgttgccatatagctattggattggccatccggtgtctaacagagcta ttgtatacctatttgttggatttactcccctatcatacaaatctctgaacactttgtgctttatac tgaacttaaacacacgaaa
32	Энтеровирус С	ttaaaacagctctggggttgttcccaccccagaggcccacgtggcggccagtacaccg gtaccacggtacccttgtacgcctgttttatactcccctccccgtaaactagaagcacga aacacaagttcaatagaaggggtacagaccagtaccaccacgaacaagcacttctgt tcccccggtgaggtcacatagactgtccccacggtcaaaagtgactgatccgttatccg ctcacgtacttcggaaagcctagtaccaccttggaatctacgatgcgttgcgctcagcac tcgaccccggagtgtagcttaggctgatgagtctggacgttccccactggtgacagtgg tccaggctgcgttggcggcctacctgtggtccaaaaccacaggacgctagtagtgaac aaggtgtgaagagcccactgagctacctgagaatcctccggcccctgaatgcggctaa tcccaaccacggagcaggtaatcgcaaaccagcggtcagcctgtcgtaacgcgtaagt ctgtggcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttatttttatggtggctgcttatg gtgacaatcatagattgttatcataaagcaaattggattggccatccggagtgagctaaa ctatctatttctctgagtgttggattcgtttcacccacattctgaacaatcagcctcattagtg ttaccctgttaataagacgatatcatcacg

33	Энтеровирус D	ttaaaacagctctggggttgttcccaccccagaggcccacgtggcggctagtactccg gtaccccggtacccttgtacgcctgttttatactccctttcccaagtaactttagaagaaat aaactaatgttcaacaggaggggtacaaaccagtaccaccacgaacacacacttctg tttccccggtgaagttgcatagactgtacccacggttgaaagcgatgaatccgttacccg cttaggtacttcgagaagcctagtatcatcttggaatcttcgatgcgttgcgatcagcact ctaccccgagtgtagcttgggtcgatgagtctggacaccccacaccggcgacgtggtc caggctgcgttggcggcctacccatggctagcaccatgggacgctagttgtgaacaag gtgcgaagagcctattgagctacctgagagtcctccggcccctgaatgcggctaatccc aaccacggagcaaatgctcacaatccagtgagtggtttgtcgtaatgcgcaagtctgtg gcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttatttttattatggctgcttatggtgac aatctgagattgttatcatatagctattggattagccatccggtgatatcttgaaattttgcca taacttttttcacaaatcctacaacattacactacactttctcttgaataattgagacaactcat a
34	Энтеровирус J	ttaaaatagcctcagggttgttcccaccctgagggcccacgtggtgtagtactctggtatt acggtacctttgtacgcctattttataccccccttccccaagtaatttagaagcaagcacaa accagttcagtagtaagcagtacaatccagtactgtaatgaacaagtacttctgttacccc ggaagggtctatcggtaagctgtacccacggctgaagaatgacctaccgttaaccggc tacctacttcgagaagcctagtaatgccgttgaagttttattgacgttacgctcagcacact accccgtgtgtagttttggctgatgagtcacggcactccccacgggcgaccgtggccgt ggctgcgttggcggccaaccaaggagtgcaagctccttggacgtcatattacagacat ggtgtgaagagcctattgagctaggtggtagtcctccggcccctgaatgcggctaatcc taactccggagcatatcggtgcgaaccagcacttggtgtgttgtaatacgtaagtctgga gcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttcctgttttaacttttatggctgcttatggtga caatttaacattgttaccatatagctgttgggttggccatccggattttgttataaaaccattt cctcgtgccttgacctttaacacatttgtgaacttctttaaatccctttttattagtccttaaata ctaaga
35	Пегивирус человека 2	aactgttgttgtagcaatgcgcatattgctacttcggtacgcctaattggtaggcgcccgg ccgaccggccccgcaagggcctagtaggacgtgtgacaatgccatgagggatcatga cactggggtgagcggaggcagcaccgaagtcgggtgaactcgactcccagtgcgac cacctggcttggtcgttcatggagggcatgcccacgggaacgctgatcgtgcaaaggg atgggtccctgcactggtgccatgcgcggcaccactccgtacagcctgatagggtggc ggcgggcccccccagtgtgacgtccgtggagcgcaac
36	GBV-C GT110	tgacgtgggggggttgatTTTcccccccggcactgggtgcaagccccagaaacc gacgcctatctaagtagacgcaatgactcggcgccgactcggcgaccggccaaaagg tggtggatgggtgatgacagggttggtaggtcgtaaatcccggtcatcctggtagccac

		tataggtgggtcttaagagaaggtcaagattcctcttacgcctgcggcgagaccgcgca cggtccacaggtgttggccctaccggtgtgaataagggcccgacatcaggc
37	GBV-C K1737	gacgtgggggggttgatccccccccTTTggcactgggtgcaagccccagaaaccg acgcctatttaaacagacgttaagaaccggcgccgacccggcgaccggccaaaaggt ggtggatgggtgatgccagggttggtaggtcgtaaatcccggtcatcttggtagccact ataggtgggtcttaagggttggttaaggtccctctggcgcttgtggcgagaaagcgcac ggtccacaggtgttggccctaccggtgtgaataagggcccgacgtcaggctcgtcgtt aaaccgagcccactacccacctgggcaaacaacgcccacgtacggtccacgtcgccc ttcaatgtctctcttgaccaataggcttagccggcgagttgacaaggaccagtgggggc tgggcggtaggggaaggacccctgccgctgcccttcccggtggagtgggaaatgc
38	GBV-C Айова	tgacgtgggggggttgatccGcccccccccggcactCggtgcaagccccataaaccg acgcctatctaagtagacgcaatgactcggcgccgactcggcgaccggccaaaaggt ggtggatgggtggtgacagggttggtaggtcgtaaatcccggtcatcctggtagccact ataggtgggtcttaagagaaggtcaagactcctcttgtgcctgcggcgagaccgcgca cggtccacaggtgctggccctaccggtgtgaataagggcccgacgtcaggctcgtcgt taaaccgagcccgtcacccacctgggcaaacgacgcccacgtacggtccacgtcgcc cttca
39	Пегивирус A 1220	tgtagcaatgcgcatattgctacttcggtacgcctaattggtaggcgcccggccgaccg gccccgcaagggcctagtaggacgtgtgacaatgccatgcgggatcatgacactggg gtgagcggaggcagcaccgaagtcgggtgaactcgactcccagtgcgaccacctgg cttggtcgttcatggagggcatgcccacgggaacgctgatcgtgcaaagggatgggtc cctgcactggtgccatgcgcggcaccactccgtacagcctgatagggtggcggcggg ccccccccagtgtgacgtccgtggagcgcaac
40	Пазивирус A 3	attttctggccgtgtagctgcttttgaccagtggctctgggttacttagccaaatccccctc cttcacccttttaaatttgatggtctgtgttgtttgttttgtcttgtctaaataatatataagatcc ttcccgccgatacagacctcgacagtctggtgtaggagggttggtgttattaatttgcccc agaagagtgaccgtgacacatagaaaccatgagtacatgtgtatccgtggaggatcgc ccgggactggattccatatcccattgccatcccaacaagcggagggtatacccactatg tgcgcgtttgcagtgggaatctgcaaatttagtcatactgcctgatagggtgtgggcctg cactctggggtactcaggctgttcatataat
41	Сапеловирус	cccctccacccttaaggtggttgtatcccacataccccacccctcccttccaaagtggacg gacaactggattttgactaacggcaagtctgaatggtatgatttggatacgtttaaacggc agtagcgtggcgagctatggaaaaatcgcaattgtcgatagccatgttagtgacgcgct tcggcgtgctcctttggtgattcggcgactggttacaggagagtaggcagtgagctatg ggcaaacctctacagtattacttagagggaatgtgcaattgagacttgacgagcgtctctt

		tgagatgtggcgcatgctcttggcattaccatagtgagcttccaggttgggaaacctgga ctgggcctatactacctgatagggtcgcggctggccgcctgtaactagtatagtcagttg aaaccccccc
42	Розавирус B	gtctctttagtgtctatgcttcagagagcggtgaactgacaccgttgcttcttgcacagcc cttcgtgccggtctttccggttctcgacagcgttgggcatcatggctagttaggctaagat agtggatgatctagtgaacagttttggattgtttggagttttgtagcgatgctagtagtgtgt gtggacctccccacgtggtaacacgtgccccacaggccaaaagccaaggtgttgaaa gcacccctactagtcccagactcacccatctgggaactcctctcatgaaaaatcttagta acttttgattcggctattcatcaacctctctagtcaagggctgaaggatgcccggaaggta cccgcaggtaacgataagctcactgtggatctgatccggggctttggtgcgaccgtctg tccggcgtagccagagttaaaaaacgtctaggcccttccaccccaagggattggggttt ccccaatcatttgaaagttcact
43	Вирус бакунша	ttttgaacgccacctcggagcgatatccggggacccccctcccctttttccttcctaccttct tcccaaatttccctcttcccttgttattttggtttggatttcctggacatgactcggacggatc tatctcatttgctttgtgtctgctccaccagtggcatggtcgaaagatcatcaacactggac gtgtactgtaatggccaaacgtgcccacaggggaaaccatgccggtcgctgtagcgg cgggtggacgtggtggacccctctccctgctcataaactttgggtaggtgaagggttca agcgacgcttgccgtgagggcgcatccggatggtgggaaccaacaaactaggctgta atggccgacctcaggtggatgagctagggctgctgcaccaaaagggactcgattcgat atcccggcctggtagcctagtgcagtggactcgtagttgggaatctacgactggcctag tacagggtgatagccccgtttcccacgcccacctgttgtagggacacccccccc
44	Тремовирус A	tttgaaagaggcctccggagtgtccggaggctctctttcgacccaacccatactgggggg gtgtgtgggaccgtacctggagtgcacggtatatatgcattcccgcatggcaagggcgt gctaccttgccccttgacgcatggtatgcgtcatcatttgccttggttaagccccatagaa acgaggcgtcacgtgccgaaaatccctttgcgtttcacagaaccatcctaaccatgggt gtagtatgggaatcgtgtatggggatgattaggatctctcgtagagggataggtgtgcca ttcaaatccagggagtactctggctctgacattgggacatttgatgtaaccggacctggtt cagtatccgggttgtcctgtattgttacggtgtatccgtcttggcacactgaaagggtatttt tgggtaatcctttcctactgcctgatagggtggcgtgcccggccacgagagattaaggg tagcaatttaaac
45	Пазивирус свиней 1	gcttttgaccagtggctctgggttacttagccaagtccctttctcttattttcactagtttatgt tgtgtgttgtctgttttgttttgtttaaattgtatacaagatccttcccgccgacacagacctc gacagtctggtgtaggagggttggtgatattaatttgccccaaaagagtgaccgtgatac gtggaaaccatgagtacatgtgtatccgtggaggatcgcccgggactggattccatatc ccattgccatcccaacaaacggagggtatacccaccacgtgcgcgtttgcagtgggaa

		tctgcaaatttagtcatactgcctgatagggtgtgggcctgcactttggggtactcaggct gttcatataat
46	PLV-CHN	acatggggtatgttgtctgtcctgttttgttgaaacaatatataagatcctttccgccgatat agacctcgacagtctagtgtaggaggattggtgatagtaacttgccccagaagagtgac cgtgacacatagaaaccatgagtacatgtgtatccgtggaggatcgcccgggactgga ttccatatcccattgccatcccaacaaacggagggtatacccactatgtgcgcgtttgca gtgggagcctgcaaatttagtcatactgcctgatagggtgtgggcctgcactctggggt actcaggctgtttatataat
47	Пазивирус А (длиннее)	tgaaaaagtggttgtgcagctggattttccggctgtgcaactgcttttgaccagtggctct gggttacttagccaaattcctttcccttatccctattggtttgtgttgtgtgttgtttgttttgtttt gtcttaactatatacaagatccttcccgccgatacagacctcgacagtctggtgtaggag ggttggtgttattaatttgccccaaaagagtgaccgtgacacgtggaaaccatgagtaca tgtgtatccgtggaggatcgcccgggactggattccatatcccattgccatcccaacaaa cggagggtatacccaccacgtgcgcgtttgcagtgggaatctgcaaatttagtcatactg cctgatagggtgtgggcctgcactttggggtactcaggctgtttatataat
48	Сицинивирус	gtgtcattaaggtgtgtttggaagttcgaattagctggtttgtggtgattagtagacccccct ggaggtacccaattcggatctgaccagggacccgtgactataccgctccggtaattcg ggtttaaaacaatgaacgtcaccacacaattacttttctcattttattttcatcattgtcttccta tttaccgattacactcgatttccttggatgttcctggagatttccctggttacctggaccctc attattgttgttgtttcacccagcgagctgtcccaattgcttattatttgcgcttacaacttcgt cctaatatttttctggttgatcgggttgattgagctcccgggctatcctgccattcaac
49	Гепацивирус К	gggaacaatggtccgtccgcggaacgactctagccatgagtctagtacgagtgcgtgc cacccattagcacaaaaaccactgactgagccacacccctcccggaatcctgagtaca ggacattcgctcggacgacgcatgagcctccatgccgagaaaattgggtatacccacg ggtaaggggtggccacccagcgggaatctgggggctggtcactgactatggtacagc ctgatagggtgctgccgcagcgtcagtggtatgcggctgttcatggaac
50	Гепацивирус А	acctccgtgctaggcacggtgcgttgtcagcgttttgcgcttgcatgcgctacacgcgtc gtccaacgcggagggaacttcacatcaccatgtgtcactcccctatggagggttccac cccgcttacacggaaatgggttaaccatacccaaagtacgggtatgcgggtcctcctag ggcccccccggcaggtcgagggagctggaattcgtgaattcgtgagtacacgaaaat cgcggcttgaacgtctttgaccttcggagccgaaatttgggcgtgccccacgaaggaa ggcgggggcggtgttgggccgccgccccctttatcccacggtctgataggatgcttgc gagggcacctgccggtctcgtagaccataggac
51	BVDV1	gtatacgagaatttgcctaggacctcgtttacaatatgggcaatctaaaattataattaggc ctaagggacaaatcctcctcagcgaaggccgaaaagaggctagccatgcccttagtag

		gactagcaaaataaggggggtagcaacagtggtgagttcgttggatggctgaagccct gagtacagggtagtcgtcagtggttcgacgcttcggaggacaagcctcgagataccac gtggacgagggcatgcccacagcacatcttaacctggacgggggtcgttcaggtgaa aacggtttaaccaaccgctacgaatacagcctgatagggtgctgcagaggcccactgt attgctactgaaaatctctgctgtacatggcac
52	Вирус пограничной болезни овец	gtatacgggagtagctcatgcccgtatacaaaattggatattccaaaactcgattgggtta gggagccctcctagcgacggccgaaccgtgttaaccatacacgtagtaggactagca gacgggaggactagccatcgtggtgagatccctgagcagtctaaatcctgagtacagg atagtcgtcagtagttcaacgcaggcacggttctgccttgagatgctacgtggacgagg gcatgcccaagacttgctttaatctcggcgggggtcgccgaggtgaaaacacctaacg gtgttggggttacagcctgatagggtgctgcagaggcccacgaataggctagtataaa aatctctgctgtacatggcac
53	BVDV2	gtatacgagattagctaaagtactcgtatatggattggacgtcaacaaatttttaattggca acgtagggaaccttcccctcagcgaaggccgaaaagaggctagccatgccctttagta ggactagcaaaagtaggggactagcggtagcagtgagttcgttggatggccgaacc cctgagtacaggggagtcgtcaatggttcgacactccattagtcgaggagtctcgagat gccatgtggacgagggcatgcccacggcacatcttaacccatgcgggggttgcatgg gtgaaagcgctaatcgtggcgttatggacacagcctgatagggtgtagcagagacctg ctattccgctagtaaaaaactctgctgtacatggcac
54	CSFV-PK15C	gtatacgaggttagttcattctcgtatgcattattggacaaatcaaaatttcaatttggttcag ggcctccctccagcgacggccgaactgggctagccatgcccatagtaggactagcaa acggagggactagccgtagtggcgagctccctgggtgttctaagtcctgagtacagga cagtcgtcagtagttcgacgtgagcagaagcccacctcgagatgctatgtggacgagg gcatgcccaagacgcaccttaaccctagcgggggtcgctagggtgaaatcacaccac gtgatgggagtccgacctgatagggtgctgcagaggctcactattaggctagtataaaa atctctgctgtacatggcac
55	SF573 Дицистровирус	aaaaccgaccccagagatcagaaagtcgttgacgcgatcttttattagaggacgttgcg ctggcgcgagctttaattagcagacgccaaaaataaacaacaaaatgctgatcgcgag acttaattgtcagacgattggccaaatccgatgtgatctttgctgctcccagattgccgaa ataggagtagtag
56	Пикорна-подобный вирус Губеи	ccccaaaaccccccccttaaactcaacactgtagtggattcattttccgttgcaaaacaaa acattactacccgcatttatgtaggctctgtgttttctatgcgaccgttacattaatctctact ctgacccactagtttataaaaccgaagacctgaatgaaacgattttccttcttttcaacctct aacgaacctctgacggcttgagaaacctgaagttagtaattatgtttaaaagaaaggaaa gtcaaacgcgatgactcttacatccctattccataccgttgctccacaatgtgagcgatgc

		gaggtcgggactgcagtattaggggaacgagctacatggagagttaattatctctcccc tcctacgggagtctcatgtgagctgtagaaagcggttggcacctctcgttacctcgcctg tacatgatcc
57	CRPV	aaaagcaaaaatgtgatcttgcttgtaaatacaattttgagaggttaataaattacaagtag tgctatttttgtatttaggttagctatttagctttacgttccaggatgcctagtggcagcccca caatatccaggaagccctctctgcggtttttcagattaggtagtcgaaaaacctaagaaat ttacct
58	Саливирус A BN5	tttcctcctttcgaccgccttacggcaggcgggtccgcggacggcttcggcctacccgc gacaagaatgccgtcatctgtccttatcacccatattctttcccttcccccgcaaccatcac gcttactcgcgcacgtgttgagtggcacgtgcgttgtccaaacagttacactcacaccct tggggcgggtttgtcccgccctcgggttcctcgcggaaccctccctcttctctcccttt ctatccgccttcactttccataactacagtgctttggtaggtaagcatcctgacccccgc ggaagctgccaacgtggcaactgtggggatccaggcaggttatcaaaggcacccggt ctttccgccttcaggagtatccctgccggtgaattccgacagggctctgcttggtgccaa cctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgctcttccccaactcatcttagtaacctctcat gtgtgtgcttggtcagcatatctgaggcgacgttccgctgtcccagaccagtccagcaat ggacgggccagtgtgcgtagtcgctttccggtttcccggcgcatgtttggcgaaacgct gaggtaaggttggtgtgcccaatgcccgtaatttggtgacacctcaagaccacccagg aatgccagggaggtaccccacttcggtgggatctgaccctgggctaattgtctacggtg gttcttcttgcttccacttctctttttttctggcatg
59	Саливирус A BN2	tatggcaggcgggcttgtggacggcttcggcccacccacagcaagaatgccatcatct gtcctcacccccatgtttcccctttctttccctgcaaccgttacgcttactcgcaggtgcatt tgagtggtgcacgtgttgaataaacagctacactcacatgggggcgggttttcccgccc tgcggcctctcgcgaggcccacccctcccctttcctcccataactacagtgctttggtagg taagcatcctgatcccccgcggaagctgctcacgtggcaactgtggggacccagaca ggttatcaaaggcacccggtctttccgccttcaggagtatccctgctagtgaattctagta gggctctgcttggtgccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgctcttccccaac tcaccctagtatcctctcatgtgtgtgcttggtcagcatatctgagacgatgttccgctgtc ccagaccagtccagtaatggacgggccagtgtgcgtagtcgtcttccggcttttccggc gcatgtttggtgaaccggtggggtaaggttggtgtgcccaacgcccgtactttggtgata cctcaagaccacccaggaatgccagggaggtaccccgcttcacagcgggatctgacc ctgggctaattgtctacggtggttcttcttgcttccacttctttctactgttc
60	Саливирус A 02394	tttcgaccgccttatggcaggcgggcttgtggacggcttcggcccacccacagcaaga atgccatcatctgtcctcacccccatttctcccctccttcccctgcaaccattacgcttactc gcatgtgcattgagtggtgcacgtgttgaacaaacagctacactcacgtgggggcgggg

		ttttcccgcccttcggcctctcgcgaggcccacccttccccttcctcccataactacagtg ctttggtaggtaagcatcctgatcccccgcggaagctgctcgcgtggcaactgtgggg acccagacaggttatcaaaggcacccggtctttccgcctccaggagtatccctgctagt gaattctagtggggctctgcttggtgccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgc tcttccccaactcaccctagtatcctctcatgtgtgtgcttggtcagcatatctgagacgat gttccgctgtcccagaccagtccagcaatggacgggccagtgtgcgtagtcgtcttccg gcttgtccggcgcatgtttggtgaaccggtggggtaaggttggtgtgcccaacgcccgt actttggtgacaactcaagaccacccaggaatgccagggaggtaccccgcctcacgg cgggatctgaccctgggctaattgtctacggtggttcttcttgcttccatttctttcttctgttc
61	Саливирус A GUT	tatggcaggcgggcttgtggacggtttcggcccacccacagcaagaatgccatcatct gtcctcacccccaattttccctttcttcccctgcaatcatcacgcttactcgcatgtgcattg agtggtgcatgtgttgaacaaacagctacactcacatgggggcgggttttcccgcccta cggcctctcgcgaggcccacccttcccctcccctataactacagtgctttggcaggtaa gcatcctgatcccccgcggaagctgctcacgtggcaactgtggggacccagacaggtt atcaaaggcacccggtctttccgccttcaggagcatccccactagtgaattctagtggg gctctgcttggtgccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgctcttccccaaccc atcctagtatcctctcatgtgtgtgcttggtcagcatatctgagacgacgttccgctgtccc agaccagtccagtaatggacgggccagtgtgcgtagtcgtcttccggcttgtccggcg catgtttggtgaaccggtggggtaaggttggtgtgcccaacgcccgtactttggtgaca cctcaagaccacccaggaatgccagggaggtaccccgcctcacggcgggatctgac cctgggctaattgtctacggtggttcttcttgcttccacttctttctt
62	Саливирус A CH	ttctcctgcaaccattacgcttaatcgcatgtgcattgagtggtgcatgtgttgaacaaaca gctacaatcacatgggggcgggttttcccgccccacggcttctcgcgaggcccatccct ccctttttctcccataactacagtgctttggtaggtaagcatcccgatctcccgcggaagct gctcacgtggcaactgtggggacccagacaggttatcaaaggcacccggtctttccgc cttcaggagtatccctgctagcgaattctagtagggctctgcttggtgccaacctctccca aatgcgcgctgcgggagtgctcttccccaaatcaccccagtatcctctcatgtgtgtgcc tggtcagcatatctgagacgatgttccgctgtcccagaccagtccagtaatggacgggc cagtgtgcgtagtcgtcctccggcttgtccggcgcatgtttggtgaaccggtggggtaa ggttggtgtgcccaacgcccgtaatcaggggatacctcaaggcacccaggaatgcca gggaggtatcccgcctcacagcgggatctgaccctggggtaaatgtctgcgggggggt cctcttggcccaattctcagtaattttcagg
63	Саливирус A SZ1	tctgtcctcaccccatcttcccttctttcctgcaccgttacgcttactcgcatgtgcattgagt ggtgcacgtgcttgaacaaacagctacactcacatgggggcgggttttcccgccctgc ggcctctcgcgaggcccacccctcccccttcctcccataactacagtgctttggtaggtaa

		gcatcctgatcccccgcggaagctgctcacgtggcaactgtggggacccagacaggtt atcaaaggcacccggtctttccgccttcaggagtatccctgctagtgaattctagtaggg ctctgcttggtgccaacctcccccaaatgcgcgctgcgggagtgctcttccccaactca ccctagtatcctctcatgtgtgtgcttggtcagcatatctgagacgatgttccgctgtccca gaccagtccagtaatggacgggccagtgtgcgtagtcgtcttccggcttgtccggcgc atgtttggtgaaccggtggggtaaggttggtgtgcccaacgcccgtactttggtgatacc tcaagaccacccaggaatgccagggaggtaccccgcttcacagcgggatctgaccct gggctaattgtctacggtggttcttcttgcttccacttctttctactgttcatg
64	Саливирус FHB	acatgggggtctgcggacggcttcggcccacccgcgacaagaatgccgtcatctgt cctcattacccgtattccttcccttcccccgcaaccaccacgcttactcgcgcacgtgttg agtggcacgtgcgttgtccaaacagctacacccacacccttcggggcgggtttgtccc gccctcgggttcctcgcggaaccccccccctccctctctctctttctatccgccctcacttc ccataactacagtgctttggtaggtgagcaccctgacccccgcggaagctgctaacgt ggcaactgtggggatccaggcaggttatcaaaggcacccggtctttccgccttcagga gtatctctgccggtgaattccggtagggctctgcttggtgccaacctcccccaaatgcgc gctgcgggagtgctcttccccaactcatcttagtaacctctcatgtgtgtgcttggtcagc atatctgaggcgacgttccgctgtcccagaccagtccagcaatggacgggccagtgtg cgtagtcgctttccggttttccggcgcatgtttggcgaaacgctgaggtaaggttggtgt gcccaacgcccgtaatttggtgatacctcaagaccacccaggaatgccagggaggtac cccacttcggtgggatctgaccctgggctaattgtctacggtggttcttcttgcttccactt ctctttttctggcatg
65	CVB3	ttaaaacagcctgtgggttgatcccacccacaggcccattgggcgctagcactctggta tcacggtacctttgtgcgcctgttttataccccctcccccaactgtaacttagaagtaacac acaccgatcaacagtcagcgtggcacaccagccacgttttgatcaagcacttctgttacc ccggactgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaagcgttcgttatccgg ccaactacttcgaaaaacctagtaacaccgtggaagttgcagagtgtttcgctcagcact accccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggcgaccgtggcggt ggctgcgttggcggcctgcccatggggaaacccatgggacgctctaatacagacatg gtgcgaagagtctattgagctagttggtagtcctccggcccctgaatgcggctaatccta actgcggagcacacaccctcaagccagagggcagtgtgtcgtaacgggcaactctgc agcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttcattttattcctatactggctgcttatggtg acaattgagagatcgttaccatatagctattggattggccatccggtgactaatagagcta ttatatatccctttgttgggtttataccacttagcttgaaagaggttaaaacattacaattcatt gttaagttgaatacagcaaa
66	CVB1	ttaaaacagcctgtgggttgttcccacccacaggcccattgggcgctagcactctggtat

		cacggtacctttgtgcgcctgttttacatcccctccccaaattgtaatttagaagtttcacac accgatcattagcaagcgtggcacaccagccatgttttgatcaagcacttctgttacccc ggactgagtatcaatagaccgctaacgcggttgaaggagaaaacgttcgttacccggc caactacttcgaaaaacctagtaacaccatggaagttgcggagtgtttcgctcagcacta ccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcgttccccacgggcgaccgtggcggt ggctgcgttggcggcctgcctacggggaaacccgtaggacgctctaatacagacatg gtgcgaagagtctattgagctagttggtaatcctccggcccctgaatgcggctaatccta actgcggagcacataccctcaaaccaggggggcagtgtgtcgtaacgggcaactctgc agcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttcattttattcctatactggctgcttatggtg acaattgacaggttgttaccatatagttattggattggccatccggtgactaacagagcaa ttatatatctctttgttgggtttataccacttagcttgaaagaggttaaaacactacatctcat cattaaactaaatacaacaaa
67	Эховирус 7	ttaaaacagcctgtgggttgttcccacccacagggcccattgggcgtcagcaccctggt atcacggtacctttgtgcgcctgttttatatcccttcccccaattgtaacttagaagaaaca cacaccgatcaacagcaagcgtggcacaccagccatgttttggtcaagcacttctgtta ccccggactgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaagcgtccgttatcc ggccagctacttcgagaaacctagtaacaccatggaagttgcggagtgtttcgctcagc actaccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgctttccccacgggcgaccgtggc ggtggctgcgttggcggcctgcctatgggggaacccataggacgctctaatacagaca tggtgcgaagagtctattgagctagctggtattcctccggcccctgaatgcggctaatcc taactgtggagcacatgcccctaatccaaggggtagtgtgtcgtaatgagcaattccgc agcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttcctcttattcttgtactggctgcttatggtg acaattgagagattgttaccatatagctattggattggccatccggtgactaatagagcta ttgtgtatctctttgttggatttgtaccacttaatttgaaagaaatcaggacactacgctacat tttactattgaacaccgcaaa
68	CVB5	ttaaaacagcctgtgggttgtacccacccacagggcccactgggcgctagcactctggt atcacggtacctttgtgcgcctgttttatgccccttcccccaattgaaacttagaagttac acacaccgatcaacagcgggcgtggcataccagccgcgtcttgatcaagcactcctgt ttccccggaccgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgttcgttac ccggctaactacttcgagaaacctagtagcatcatgaaagttgcgaagcgtttcgctcag cacatccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggcgaccgtgg cggtggctgcgttggcggcctgcctacggggcaacccgtaggacgcttcaatacaga catggtgcgaagagtcgattgagctagttagtagtcctccggcccctgaatccggctaat cctaactgcggagcacataccctcaacccaggggcattgtgtcgtaacgggtaactct gcagcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttattcttataatggctgcttatgg

		tgacaattgaaagattgttaccatatagctattggattggccatccggtgtctaacagagc tattatatacctctttgttggatttgtaccacttgatctaaaggaagtcaagacactacaattc atcatacaattgaacacagcaaa
69	EVA71	ttaaaacagcctgtgggttgcacccactcacagggcccactgggcgcaagcactctgg cacttcggtacctttgtgcgcctgttttatatcccctccccaatgaaatttagaagcagca aaccccgatcaatagcaggcataacgctccagttatgtcttgatcaagcacttctgtttcc ccggactgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgttcgttatccgg ctaactacttcggaaagcctagtaacaccatggaagttgcggagagtttcgttcagcact tccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggcgaccgtggcggt ggctgcgttggcggcctgcccatggggtaacccatgggacgctctaatacggacatgg tgtgaagagtctactgagctagttagtagtcctccggcccctgaatgcggctaatcccaa ctgcggagcacacgcccacaagccagtgggtagtgtgtcgtaacgggcaactctgca gcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttattcttatgttggctgcttatggtgac aattaaagagttgttaccatatagctattggattggccatccggtgtgcaacagagcgatc gtttacctatttattggttttgtaccattgacactgaagtctgtgatcacccttaattttatctta accctcaacacagccaaac
70	CVA3	ttaaaacagcctgtgggttgtacccacccacagggcccactgggcgctagcacactgg tattacggtacctttgtgcgcctgttttatacccccccccaacctcgaaacttagaagtaaag caaacccgatcaatagcaggtgcggcgcaccagtcgcatcttgatcaagcacttctgta accccggaccgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaaacgttcgttac ccggctaactacttcgagaaacccagtagcatcatgaaagttgcagagtgtttcgctcag cactacccccgtgtagatcaggccgatgagtcaccgcacttccccacgggcgaccgtg gcggtggctgcgttggcggcctgcctatggggcaacccataggacgctctaatacgga catggtgcgaagagtctattgagctagttagtagtcctccggcccctgaatgcggctaat cctaactgcggagcacatacccttaatccaaagggcagtgtgtcgtaacgggtaactct gcagcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttaatttttactggctgcttatggt gacaattgaggaattgttgccatatagctattggattggccatccggtgactaacagagc tattgtgttccaatttgttggatttaccccgctcacactcacagtcgtaagaacccttcatta cgtgttatttctcaactcaagaaa
71	CVA12	ttaaaacagcctgtgggttgtacccacccacagggcccactgggcgctagcactctggt actacggtacctttgtgtgcctgttttaagcccctaccccccactcgtaacttagaaggctt ctcacactcgatcaatagtaggtgtggcacgccagtcacaccgtgatcaagcacttctgt taccccggtctgagtaccaataagctgctaacgcggctgaaggggaaaacgatcgttat ccggctaactacttcgagaaacccagtaccaccatgaacgttgcagggtgtttcgctcg gcacaaccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgtattccccacgggcgaccgtg

		gcggtggctgcgttggcggcctgcccatggggtgacccatgggacgctctaatactga catggtgcgaagagtctattgagctagttagtagtcctccggcccctgaatgcggctaat cctaactgcggagcacataccttaatccaaagggcagtgtgtcgtaacgggcaactct gcagcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttattcttacattggctgcttatgg tgacaattgaaaagttgttaccatatagctattggattggccatccggtgacaaatagagc tattgtatatctttttgttggttacgtacccctttaattacaaagtggtttcaactttgaaatacat cctaacactaaattgtagaaa
72	EV24	ttaaaacagcctgtgggttgcacccacccacagggcccacagggcgctagcactctg gtatcacggtaccttgtgcgcctgttttattacccctccccaattgaaaattagaagcaat gcacaccgatcaacagcaggcgtggcgcaccagtcacgtctcgatcaagcacttctgt ttccccggaccgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggagaaagtgttcgttatc cggctaaccacttcgagaaacccagtaacaccatgaaagttgcagggtgtttcgctcag cacttccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcgttccccacgggcgaccgtgg cggtggctgcgttggcggcctgcctatgggttaacccataggacgctctaatacagaca tggtgcgaagagtttattgagctggttagtatccctccggcccctgaatgcggctaatcct aactgcggagcacgtgcctccaatccaggggggttgcatgtcgtaacgggtaactctgc agcggaaccgactactttgggtgtccgtgtttccttttattcttatactggctgcttatggtg acaatcgaggaattgttaccatatagctattggattggccatccggtgtctaacagagcg attatatacctctttgttggatttatgcagctcaataccaccaactttaacacattgaaatata tcttaaagttaaacacagcaaa

В некоторых вариантах реализации IRES по изобретению представляет собой IRES, имеющую последовательность, указанную в Таблице 1 (SEQ ID NO: 1-72). В некоторых вариантах реализации IRES представляет собой IRES саливируса. В некоторых вариантах реализации IRES представляет собой IRES саливируса SZ1.

Таблица 2. Последовательности фрагментов 5'-конца интрона перестановки анабаена.

SEQ ID NO:	Сайт перестановки	Последовательность
73	L2-1	GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGA AACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGA CTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA AGAGAATGAAAATCCGT

74	L2-2	AAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAA ACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCA AGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGAC TTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAG CTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGT
75	L2-3	AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAA CCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAA GCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTT ACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAA TTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGT
76	L5-1	GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAAT CCGT
77	L5-2	TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGT AATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGT
78	L5-3	TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTA ATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATCGG AAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCA AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GT
79	L5-4	ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATCGGA AGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA

		GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCG T
80	L5-5	TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAAT TAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATCGGA AGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCG T
81	L6-1	ACAATAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTA AAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAG CGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
82	L6-2	CAATAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGA CTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
83	L6-3	AATAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGAC TCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
84	L6-4	ATAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAG AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
85	L6-5	TAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAA AGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
86	L6-6	AGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCG ACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
87	L6-7	GATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGA

		CGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGA GAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
88	L6-8	ATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGT
89	L6-9	TGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACG GGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGA GTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGT
90	L8-1	CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAAT CCGT
91	L8-2	AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGT
92	L8-3	AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GT
93	L8-4	GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAA TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCG T
94	L8-5	ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
95	L9a-1	AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATC CGT
96	L9a-2	ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GT
97	L9a-3	TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCG T
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

В некоторых вариантах реализации фрагмент 5’-конца интрона представляет собой фрагмент, имеющий последовательность, указанную в Таблице 2. Как правило, конструкция, содержащая фрагмент 5’-конца интрона, указанный в Таблице 2, будет содержать соответствующий фрагмент 3’-конца интрона, указанный в Таблице 3 (например, оба представляют собой фрагменты с сайтом перестановки L9a-8).

Таблица 3. Последовательности фрагментов 3’-интрона перестановки анабаена.

SEQ ID NO:	Сайт перестановки	Последовательность
112	L2-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA
113	L2-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAG
114	L2-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA
115	L5-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA
116	L5-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA G
117	L5-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GT
118	L5-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTT
119	L5-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA

		GTTA
120	L6-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTA
121	L6-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAA
122	L6-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAAC
123	L6-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACA
124	L6-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAA
125	L6-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAAT
126	L6-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATA
127	L6-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAG
128	L6-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT

		TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGA
129	L8-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT
130	L8-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT C
131	L8-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CA
132	L8-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAA
133	L8-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAG
134	L9a-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG

		TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC C
135	L9a-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CA
136	L9a-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAA
137	L9a-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAAT
138	L9a-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATA
139	L9-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG

		TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGC
140	L9-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCG
141	L9-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGA
142	L9-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAA
143	L9-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAA
144	L9-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG

		TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAG
145	L9-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC
146	L9-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA
147	L9-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA
148	L9a-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAG
149	L9a-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG

		TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGC
150	L9a-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAGGCA

В некоторых вариантах реализации фрагмент 3’-конца интрона представляет собой фрагмент, имеющий последовательность, указанную в Таблице 3. В некоторых вариантах реализации, конструкция, содержащая фрагмент 3’-конца интрона, указанный в Таблице 3, будет содержать соответствующий фрагмент 5’-конца интрона, указанный в Таблице 2 (например, оба представляют собой фрагменты с сайтом перестановки L9a-8).

Таблица 4. Последовательности фрагментов 5’-конца интрона перестановки неанабаена.

SEQ ID NO:	Интрон	Последовательность
151	Azop1	tgcgccgatgaaggtgtagagactagacggcacccacctaaggcaaacgctatggtgaa ggcatagtccagggagtggcgaaagtcacacaaaccggaatccgt
152	Azop2	ccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcggcgcctgcgccgatgaaggtgtagag actagacggcacccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtccagggagtggcg aaagtcacacaaaccggaatccgt
153	Azop3	acggcacccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtccagggagtggcgaaagt cacacaaaccggaatccgt
154	Azop4	acgctatggtgaaggcatagtccagggagtggcgaaagtcacacaaaccggaatccgt
155	S795p1	attaaagttatagaattatcagagaatgatatagtccaagccttatggtaacatgagggcactt gaccctggtag
156	Twortp1	aagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagagaaagtgcaacgactattccga taggaagtagggtcaagtgactcgaaatggggattacccttctagggtagtgatatagtctg aacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattcgtaacataattgaactt ttagttat
157	Twortp2	taataagagaaagtgcaacgactattccgataggaagtagggtcaagtgactcgaaatgg

		ggattacccttctagggtagtgatatagtctgaacatatatggaaacatatagaaggatagg agtaacgaacctattcgtaacataattgaacttttagttat
158	Twortp3	taggaagtagggtcaagtgactcgaaatggggattacccttctagggtagtgatatagtctg aacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaacctattcgtaacataattgaactt ttagttat
159	Twortp4	ctagggtagtgatatagtctgaacatatatggaaacatatagaaggataggagtaacgaac ctattcgtaacataattgaacttttagttat
160	LSUp1	agttaataaagatgatgaaatagtctgaaccattttgagaaaagtggaaataaaagaaaatct tttatgataacataaattgaacaggctaa
161	Phip1	caaagactgatgatatagtccgacactcctagtaataggagaatacagaaaggatgaaatc c
162	Nostoc	agtcgagggtaaagggagagtccaattctcaaagcctattggcagtagcgaaagctgcgg gagaatgaaaatccgt
163	Nostoc	agccgagggtaaagggagagtccaattctcaaagccaataggcagtagcgaaagctgcg ggagaatgaaaatccgt
164	Nodularia	agccgagggtaaagggagagtccaattctcaaagccgaaggttattaaaacctggcagca gtgaaagctgcgggagaatgaaaatccgt
165	Pleurocapsa	agctgagggtaaagagagagtccaattctcaaagccagcagatggcagtagcgaaagct gcgggagaatgaaaatccgt
166	Planktothrix	agccgagggtaaagagagagtccaattctcaaagccaattggtagtagcgaaagctacgg gagaatgaaaatccgt

В некоторых вариантах реализации фрагмент 5’-конца интрона представляет собой фрагмент, имеющий последовательность, указанную в Таблице 4. Конструкция, содержащая фрагмент 5’-конца интрона, указанный в Таблице 4, будет содержать соответствующий фрагмент 3’-конца интрона, указанный в Таблице 5 (например, оба представляют собой фрагменты с интроном Azop1).

Таблица 5. Последовательности фрагментов 3’-конца интрона перестановки неанабаена.

SEQ ID NO:	Интрон	Последовательность
167	Azop1	gcggactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaaattc ggcgaaacctaagcgcccgcccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcggcgcc
168	Azop2	gcggactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaaattc ggcgaaacctaagcgcccgc
169	Azop3	gcggactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaaattc

		ggcgaaacctaagcgcccgcccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcggcgcct gcgccgatgaaggtgtagagactag
170	Azop4	gcggactcatatttcgatgtgccttgcgccgggaaaccacgcaagggatggtgtcaaattc ggcgaaacctaagcgcccgcccgggcgtatggcaacgccgagccaagcttcggcgcct gcgccgatgaaggtgtagagactagacggcacccacctaaggcaa
171	S795p1	aggattagatactacactaagtgtcccccagactggtgacagtctggtgtgcatccagctat atcggtgaaaccccattggggtaataccgagggaagctatattatatatatattaataaatag ccccgtagagactatgtaggtaaggagatagaagatgataaaatcaaaatcatc
172	Twortp1	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatcgaaaaatcctctaattca gggaacacctaaacaaact
173	Twortp2	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatcgaaaaatcctctaattca gggaacacctaaacaaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttag
174	Twortp3	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatcgaaaaatcctctaattca gggaacacctaaacaaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagaga aagtgcaacgactattccga
175	Twortp4	actactgaaagcataaataattgtgcctttatacagtaatgtatatcgaaaaatcctctaattca gggaacacctaaacaaactaagatgtaggcaatcctgagctaagctcttagtaataagaga aagtgcaacgactattccgataggaagtagggtcaagtgactcgaaatggggattaccctt
176	LSUp1	cgctagggatttataactgtgagtcctccaatattataaaatgttggtaatatattgggtaaattt caaagacaacttttctccacgtcaggatatagtgtatttgaagcgaaacttattttagcagtga aaaagcaaataaggacgttcaacgactaaaaggtgagtattgctaacaataatccttttttttta atgcccaacatctttattaact
177	Phip1	gtgggtgcataaactatttcattgtgcacattaaatctggtgaactcggtgaaaccctaatgg ggcaataccgagccaagccatagggaggatatatgagaggcaagaagttaattcttgagg ccactgagactggctgtatcatccctacgtcacacaaacttaatgccgatggttatttcagaa agaaaaccaatggcgtcttagagatgtatcacagaacggtgtggaaggagcataacgga gacatacctgatggcttcgagatagaccataagtgtcgcaatagggcttgctgtaatataga gcatttacagatgcttgagggtacagcccacactgttaagaccaatcgtgaacgctacgca gacagaaaggaaacagctagggaatactggctggagactggatgtaccggcctagcact cggtgagaagtttggtgtgtcgttctcttctgcttgtaagtggattagagaatggaaggcgta gagactatccgaaaggagtagggccgagggtgagactccctcgtaacccgaagcgcca gacagtcaact
178	Nostoc	acggacttaagtaattgagccttaaagaagaaattctttaagtggcagctctcaaactcagg gaaacctaaatctgttcacagacaaggcaatcctgagccaagccgaaagagtcatgagtg

		ctgagtagtgagtaaaataaaagctcacaactcagaggttgtaactctaagctagtcggaa ggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtaa
179	Nostoc	acggacttaaactgaattgagccttagagaagaaattctttaagtgtcagctctcaaactcag ggaaacctaaatctgttgacagacaaggcaatcctgagccaagccgagaactctaagttat tcggaaggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtca
180	Nodularia	acggacttagaaaactgagccttgatcgagaaatctttcaagtggaagctctcaaattcagg gaaacctaaatctgtttacagatatggcaatcctgagccaagccgaaacaagtcctgagtgt taaagctcataactcatcggaaggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgtta
181	Pleurocapsa	acggacttaaaaaaattgagccttggcagagaaatctgtcatgcgaacgctctcaaattcag ggaaacctaagtctggcaacagatatggcaatcctgagccaagccttaatcaaggaaaaa aacatttttacctttttaccttgaaaggaaggtgcagagactcaacgggagctaccctaacag gtca
182	Planktothrix	acggacttaaagataaattgagccttgaggcgagaaatctctcaagtgtaagctgtcaaatt cagggaaacctaaatctgtaaattcagacaaggcaatcctgagccaagcctaggggtatta gaaatgagggagtttccccaatctaagatcaatacctaggaaggtgcagagactcgacgg gagctaccctaacgtta

В некоторых вариантах реализации фрагмент 3’-конца интрона представляет собой фрагмент, имеющий последовательность, указанную в Таблице 5. Конструкция, содержащая фрагмент 3’-конца интрона, указанный в Таблице 5, будет содержать соответствующий фрагмент 5’-конца интрона, указанный в Таблице 4 (например, оба представляют собой фрагменты с интроном Azop1).

Таблица 6. Последовательности фрагментов спейсера и анабаена фрагмента 5’-конца интрона.

SEQ ID NO:	Спейсер	Последовательность
183	T25 L10	agtatataagaaacaaaccacTAGATGACTTACAACTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT ggctcgcagc
184	T25 L20	ctgaaattatacttatactcaaacaaaccacTAGATGACTTACAACTAAT CGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAG CCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAA TCCGTggctcgcagc

185	T25 L30 (I80-10) [Контроль]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggctcgcagc
186	T25 L40	catcaacaatatgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGA CTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA AGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
187	T25 L50	catcaacaatatgaaactatacttatactcagtatatgaagcattatcgcaaacaaaccacT AGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCG ACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
188	T50 L10	tagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT ggctcgcagc
189	T50 L20	atactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACTAAT CGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACG TCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAG CCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAA TCCGTggctcgcagc
190	T50 L30	gtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA ATGAAAATCCGTggctcgcagc
191	T50 L40	cctcacctgagtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaTAGATG ACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGG AGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT CCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc

192	T50 L50	ccgaatgatgcctcacctgagtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaaacaaacaaa TAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAA AGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
193	T75 L10	cggtgcgagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAT AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT ggctcgcagc
194	T75 L20	cgctccgacccagtgcgagcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAA CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAA AGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAA AATCCGTggctcgcagc
195	T25 L30 1MM	ctgaaattatactAatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggctcgcagc
196	T25 L30 3MM	ctgaaaAtatactAatactcaCtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA ATGAAAATCCGTggctcgcagc
197	T25 L30 5MM	ctgaTaAtataGtAatactcaCtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTA CCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgcagc
198	T25 L30 8MM	ctgaTaAtaAaGtAatacAcaCtataAgacaaacaaaccacTAGATGACT TACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCA ATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAG AGAATGAAAATCCGTggctcgcagc

199	T25 L30 нецелевая 10	ctgaaattatacttatactctctaagttacaaacaaaccacTAGATGACTTACAA CTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCC TAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCT CAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAAT GAAAATCCGTggctcgcagc
200	T25 L30 нецелевая 20	ctgaaattatgtgtgttacAtctaagttacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggctcgcagc
201	T25 L30 нецелевая 30	gttgatcggtgtgtgttacAtctaagttacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggctcgcagc
202	T25 L30 I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTgattaaacag
203	T25 L30 I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTgattcacaatataaattacg
204	T25 L30 I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggatcatagc
205	T25 L30 I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggatcgcagcataatatccg

206	T25 L30 I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctaccg
207	T25 L30 I80-20×2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctaccgaaagccggcgtcgacgttagc gc
208	T25 L30 I50-20×2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTggatcgcagcataatatccgaaacgaggatacaagtgacatg c
209	T25 L30 I25-20×2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGTgattcacaatctaaattacgaaacgataaatgataactctaac
210	T0 L0	aaacaaaccacTAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCA GAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAG TAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcag c
211	T100 L5	cgggcaaacaaacaaaTAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGT GCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACG AGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGG CAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctc gcagc
212	T75 L30	cgctccgacgagcttccggccagtgcgagcaaacaaacaaaTAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTA CCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT

		TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgcagc
213	T0 L0a	aaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAA ATCCGTggctcgcagc
214	T25 L10a	agtatataagaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA ATGAAAATCCGTggctcgcagc
215	T25 L20a	ctgaaattatacttatactcaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCA AGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
216	T25 L30a (I80-10) [Контроль]	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
217	T50 L10a	tagcgtcagcaaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgcagc
218	T50 L20a	atactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
219	T50 L30a	gtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaGGCAGTAGCGAA AGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
220	T75 L10a	cggtgcgagcaaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgcagc
221	T75 L20a	cgctccgacccagtgcgagcaaacaaacaaaGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
222	T75 L30a	cgctccgacgagcttccggccagtgcgagcaaacaaacaaaGGCAGTAGCGA AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
223	T0 L0b	aaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCT CAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAAT GAAAATCCGTggctcgcagc
224	T25 L10b	agtatataagaaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
225	T25 L20b	ctgaaattatacttatactcaaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGA GAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
226	T25 L30b (I80-10)	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC

	[Контроль]	GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
227	T50 L10b	tagcgtcagcaaacaaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA AGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
228	T50 L20b	atactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGA GAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
229	T50 L30b	gtgtgaagctatactcatactagcgtcagcaaacaaacaaaAAGACGAGGGTA AAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAG CGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
230	T75 L10b	cggtgcgagcaaacaaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA AGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
231	T75 L20b	cgctccgacccagtgcgagcaaacaaacaaaAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
232	T75 L30b	cgctccgacgagcttccggccagtgcgagcaaacaaacaaaAAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTA GCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
233	T25 L30 I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGT
234	T25 L30a I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
235	T25 L30a I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattaaacag
236	T25 L30a I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaatataaattacg
237	T25 L30a I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
238	T25 L30a I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAA GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcataatatccg

239	T25 L30a I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctaccg
240	T25 L30b I0-0	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
241	T25 L30b I25-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattaaacag
242	T25 L30b I25-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaatataaattacg
243	T25 L30b I50-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
244	T25 L30b I50-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcataatatccg
245	T25 L30b I80-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaaacaaaccacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctaccg

В некоторых вариантах реализации спейсер и фрагмент 5’-конца интрона представляют собой спейсеры и фрагменты, имеющие последовательности, указанные в Таблице 6.

Таблица 7. Последовательности спейсера и фрагмента 3’-конца интрона анабаена.

SEQ ID NO:	Спейсер	Последовательность
246	T25 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaacttatatact
247	T25 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT

		AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagagtataag tataatttcag
248	T25 L30 (I80-10) [Контроль]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatact gagtataagtataatttcag
249	T25 L40	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatact gagtataagtataatttcatattgttgatg
250	T25 L50	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagcgataatg cttcatatactgagtataagtatagtttcatattgttgatg
251	T50 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgct a
252	T50 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgct agtatgagtat
253	T50 L30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgct agtatgagtatagcttcacac
254	T50 L40	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA

		AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgct agtatgagtatagcttcacactcaggtgagg
255	T50 L50	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctgacgct agtatgagtatagcttcacactcaggtgaggcatcattcgg
256	T75 L10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctcgcac cg
257	T75 L20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctcgcact gggtcggagcg
258	T25 L30 1MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatact gagtataagtataatttcag
259	T25 L30 3MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatact gagtataagtataatttcag
260	T25 L30 5MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatact gagtataagtataatttcag

261	T25 L30 8MM	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatact gagtataagtataatttcag
262	T25 L30 нецелевая 10	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtaacttag agagtataagtataatttcag
263	T25 L30 нецелевая 20	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtaacttag aTgtaacacacataatttcag
264	T25 L30 нецелевая 30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtaacttag aTgtaacacacaccgatcaac
265	T25 L30 I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAA ATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCG AAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatactg agtataagtataatttcag
266	T25 L30 I25-20	cgtaatttatattgtgaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGA AACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaa gtcatatactgagtataagtataatttcag
267	T25 L30 I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatact gagtataagtataatttcag

268	T25 L30 I50-20	cggatattatgctgcgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
269	T25 L30 I80-20	cggtaggcgcgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
270	T25 L30 I80-20×2	gcgctaacgtcgacgccggcaaacggtaggcgcgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
271	T25 L30 I50-20×2	gcatgtcacttgtatcctcgaaacggatattatgctgcgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
272	T25 L30 I25-20×2	gttagagttatcatttatcgaaacgtaatttagattgtgaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
273	T0 L0	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaa
274	T100 L5	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagcccg
275	T75 L30	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA

		AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAAaacaaaaacaagctcgcact ggccggaagctcgtcggagcg
276	T0 L0a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAcacaaacacaa
277	T25 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAcacaaacacaacttatatact
278	T25 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAcacaaacacaagagtataagtataatttcag
279	T25 L30a (I80-10) [Контроль]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
280	T50 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC

		GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgacgcta
281	T50 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgacgctagtatgagtat
282	T50 L30a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctgacgctagtatgagtatagcttcaca c
283	T75 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctcgcaccg
284	T75 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctcgcactgggtcggagcg
285	T75 L30a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT

		AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAaacaaaaacaagctcgcactggccggaagctcgtcgga gcg
286	T0 L0b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCcacaaacacaa
287	T25 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCcacaaacacaacttatatact
288	T25 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCcacaaacacaagagtataagtataatttcag
289	T25 L30b (I80-10) [Контроль]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
290	T50 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC

		CCTAACGTCaacaaaaacaagctgacgcta
291	T50 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCaacaaaaacaagctgacgctagtatgagtat
292	T50 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCaacaaaaacaagctgacgctagtatgagtatagcttcacac
293	T75 L10b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCaacaaaaacaagctcgcaccg
294	T75 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCaacaaaaacaagctcgcactgggtcggagcg
295	T75 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCaacaaaaacaagctcgcactggccggaagctcgtcggagcg
296	T25 L30 I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtat

		aatttcag
297	T25 L30a I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGC CAATAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
298	T25 L30a I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAA ATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCG AAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
299	T25 L30a I25-20	cgtaatttatattgtgaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGA AACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGA CTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtat aatttcag
300	T25 L30a I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
301	T25 L30a I50-20	cggatattatgctgcgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGA AACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGA CTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA

		GCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTC CAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcatatactgagtataagtat aatttcag
302	T25 L30a I80-20	cggtaggcgcgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTA AAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGG GAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAG CCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGAT GACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGG GAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcatatactgagtataa gtataatttcag
303	T25 L30b I0-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTT TAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTA GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATC GGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGT Ccacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
304	T25 L30b I25-10	ctgtttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAA ATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCG AAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACC CTAACGTCcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
305	T25 L30b I25-20	cgtaatttatattgtgaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGA AACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCC AAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGA CTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCTAACGTCcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttca g
306	T25 L30b I50-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCC GAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC

		CCTAACGTCcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
307	T25 L30b I50-20	cggatattatgctgcgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag
308	T25 L30b I80-20	cggtaggcgcgctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaacacaagtcatatactgagtataagtataatttcag

В некоторых вариантах реализации спейсер и фрагмент 3’-конца интрона представляют собой спейсер и фрагменты, имеющие последовательности, указанные в Таблице 7.

Таблица 8. Последовательности сайтов расщепления.

SEQ ID NO:	Участок расщепления	Последовательность
309	2A-подобная последовательность	YHADYYKQRLIHDVEMNPGP
310	2A-подобная последовательность	HYAGYFADLLIHDIETNPGP
311	2A-подобная последовательность	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
312	2A-подобная последовательность	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
313	2A-подобная последовательность	AARQMLLLLSGDVETNPGP
314	2A-подобная последовательность	RAEGRGSLLTCGDVEENPGP
315	2A-подобная последовательность	TRAEIEDELIRAGIESNPGP

316	2A-подобная последовательность	AKFQIDKILISGDVELNPGP
317	2A-подобная последовательность	SSIIRTKMLVSGDVEENPGP
318	2A-подобная последовательность	CDAQRQKLLLSGDIEQNPGP
319	2A-подобная последовательность	YPIDFGGFLVKADSEFNPGP
320	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
321	F2A	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
322	E2A	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
323	T2A	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
324	2A консервативная последовательность	GDVEXNPGP

Таблица 9. Последовательности белков SARS-CoV-2.

SEQ ID NO:	SARS-CoV-2 Белки	Последовательность
325	Спайк гликопротеин	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYP DKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKR FDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLI VNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEF RVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFK NIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINIT RFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRT FLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIY QTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW NRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF TNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTG CVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDIST EIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYR VVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLT GTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDI TPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHA DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIP IGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSV

		AYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDS TECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQV KQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKV TLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLL TDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTAS ALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILS RLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASA NLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHG VVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVS NGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNT VYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINAS VVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPW YIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCC KFDEDDSEPVLKGVKLHYT
326	полипротеин ORF1ab	MESLVPGFNEKTHVQLSLPVLQVRDVLVRGFGDSVEEV LSEARQHLKDGTCGLVEVEKGVLPQLEQPYVFIKRSDAR TAPHGHVMVELVAELEGIQYGRSGETLGVLVPHVGEIPV AYRKVLLRKNGNKGAGGHSYGADLKSFDLGDELGTDP YEDFQENWNTKHSSGVTRELMRELNGGAYTRYVDNNF CGPDGYPLECIKDLLARAGKASCTLSEQLDFIDTKRGVY CCREHEHEIAWYTERSEKSYELQTPFEIKLAKKFDTFNG ECPNFVFPLNSIIKTIQPRVEKKKLDGFMGRIRSVYPVASP NECNQMCLSTLMKCDHCGETSWQTGDFVKATCEFCGT ENLTKEGATTCGYLPQNAVVKIYCPACHNSEVGPEHSL AEYHNESGLKTILRKGGRTIAFGGCVFSYVGCHNKCAY WVPRASANIGCNHTGVVGEGSEGLNDNLLEILQKEKVNI NIVGDFKLNEEIAIILASFSASTSAFVETVKGLDYKAFKQI VESCGNFKVTKGKAKKGAWNIGEQKSILSPLYAFASEA ARVVRSIFSRTLETAQNSVRVLQKAAITILDGISQYSLRLI DAMMFTSDLATNNLVVMAYITGGVVQLTSQWLTNIFGT VYEKLKPVLDWLEEKFKEGVEFLRDGWEIVKFISTCACE IVGGQIVTCAKEIKESVQTFFKLVNKFLALCADSIIIGGAK LKALNLGETFVTHSKGLYRKCVKSREETGLLMPLKAPK EIIFLEGETLPTEVLTEEVVLKTGDLQPLEQPTSEAVEAPL

		VGTPVCINGLMLLEIKDTEKYCALAPNMMVTNNTFTLK GGAPTKVTFGDDTVIEVQGYKSVNITFELDERIDKVLNE KCSAYTVELGTEVNEFACVVADAVIKTLQPVSELLTPLG IDLDEWSMATYYLFDESGEFKLASHMYCSFYPPDEDEEE GDCEEEEFEPSTQYEYGTEDDYQGKPLEFGATSAALQPE EEQEEDWLDDDSQQTVGQQDGSEDNQTTTIQTIVEVQP QLEMELTPVVQTIEVNSFSGYLKLTDNVYIKNADIVEEA KKVKPTVVVNAANVYLKHGGGVAGALNKATNNAMQV ESDDYIATNGPLKVGGSCVLSGHNLAKHCLHVVGPNVN KGEDIQLLKSAYENFNQHEVLLAPLLSAGIFGADPIHSLR VCVDTVRTNVYLAVFDKNLYDKLVSSFLEMKSEKQVE QKIAEIPKEEVKPFITESKPSVEQRKQDDKKIKACVEEVT TTLEETKFLTENLLLYIDINGNLHPDSATLVSDIDITFLKK DAPYIVGDVVQEGVLTAVVIPTKKAGGTTEMLAKALRK VPTDNYITTYPGQGLNGYTVEEAKTVLKKCKSAFYILPSI ISNEKQEILGTVSWNLREMLAHAEETRKLMPVCVETKAI VSTIQRKYKGIKIQEGVVDYGARFYFYTSKTTVASLINTL NDLNETLVTMPLGYVTHGLNLEEAARYMRSLKVPATVS VSSPDAVTAYNGYLTSSSKTPEEHFIETISLAGSYKDWSY SGQSTQLGIEFLKRGDKSVYYTSNPTTFHLDGEVITFDNL KTLLSLREVRTIKVFTTVDNINLHTQVVDMSMTYGQQF GPTYLDGADVTKIKPHNSHEGKTFYVLPNDDTLRVEAFE YYHTTDPSFLGRYMSALNHTKKWKYPQVNGLTSIKWA DNNCYLATALLTLQQIELKFNPPALQDAYYRARAGEAA NFCALILAYCNKTVGELGDVRETMSYLFQHANLDSCKR VLNVVCKTCGQQQTTLKGVEAVMYMGTLSYEQFKKGV QIPCTCGKQATKYLVQQESPFVMMSAPPAQYELKHGTF TCASEYTGNYQCGHYKHITSKETLYCIDGALLTKSSEYK GPITDVFYKENSYTTTIKPVTYKLDGVVCTEIDPKLDNY YKKDNSYFTEQPIDLVPNQPYPNASFDNFKFVCDNIKFA DDLNQLTGYKKPASRELKVTFFPDLNGDVVAIDYKHYT PSFKKGAKLLHKPIVWHVNNATNKATYKPNTWCIRCL WSTKPVETSNSFDVLKSEDAQGMDNLACEDLKPVSEEV VENPTIQKDVLECNVKTTEVVGDIILKPANNSLKITEEVG HTDLMAAYVDNSSLTIKKPNELSRVLGLKTLATHGLAA

		VNSVPWDTIANYAKPFLNKVVSTTTNIVTRCLNRVCTN YMPYFFTLLLQLCTFTRSTNSRIKASMPTTIAKNTVKSVG KFCLEASFNYLKSPNFSKLINIIIWFLLLSVCLGSLIYSTAA LGVLMSNLGMPSYCTGYREGYLNSTNVTIATYCTGSIPC SVCLSGLDSLDTYPSLETIQITISSFKWDLTAFGLVAEWF LAYILFTRFFYVLGLAAIMQLFFSYFAVHFISNSWLMWLI INLVQMAPISAMVRMYIFFASFYYVWKSYVHVVDGCNS STCMMCYKRNRATRVECTTIVNGVRRSFYVYANGGKG FCKLHNWNCVNCDTFCAGSTFISDEVARDLSLQFKRPIN PTDQSSYIVDSVTVKNGSIHLYFDKAGQKTYERHSLSHF VNLDNLRANNTKGSLPINVIVFDGKSKCEESSAKSASVY YSQLMCQPILLLDQALVSDVGDSAEVAVKMFDAYVNTF SSTFNVPMEKLKTLVATAEAELAKNVSLDNVLSTFISAA RQGFVDSDVETKDVVECLKLSHQSDIEVTGDSCNNYML TYNKVENMTPRDLGACIDCSARHINAQVAKSHNIALIW NVKDFMSLSEQLRKQIRSAAKKNNLPFKLTCATTRQVV NVVTTKIALKGGKIVNNWLKQLIKVTLVFLFVAAIFYLIT PVHVMSKHTDFSSEIIGYKAIDGGVTRDIASTDTCFANK HADFDTWFSQRGGSYTNDKACPLIAAVITREVGFVVPGL PGTILRTTNGDFLHFLPRVFSAVGNICYTPSKLIEYTDFAT SACVLAAECTIFKDASGKPVPYCYDTNVLEGSVAYESLR PDTRYVLMDGSIIQFPNTYLEGSVRVVTTFDSEYCRHGT CERSEAGVCVSTSGRWVLNNDYYRSLPGVFCGVDAVN LLTNMFTPLIQPIGALDISASIVAGGIVAIVVTCLAYYFMR FRRAFGEYSHVVAFNTLLFLMSFTVLCLTPVYSFLPGVY SVIYLYLTFYLTNDVSFLAHIQWMVMFTPLVPFWITIAYI ICISTKHFYWFFSNYLKRRVVFNGVSFSTFEEAALCTFLL NKEMYLKLRSDVLLPLTQYNRYLALYNKYKYFSGAMD TTSYREAACCHLAKALNDFSNSGSDVLYQPPQTSITSAV LQSGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDV VYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIRKSNHNFLVQAGNV QLRVIGHSMQNCVLKLKVDTANPKTPKYKFVRIQPGQT FSVLACYNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSCGSVGF NIDYDCVSFCYMHHMELPTGVHAGTDLEGNFYGPFVDR QTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTT

		LNDFNLVAMKYNYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDM CASLKELLQNGMNGRTILGSALLEDEFTPFDVVRQCSGV TFQSAVKRTIKGTHHWLLLTILTSLLVLVQSTQWSLFFFL YENAFLPFAMGIIAMSAFAMMFVKHKHAFLCLFLLPSLA TVAYFNMVYMPASWVMRIMTWLDMVDTSLSGFKLKD CVMYASAVVLLILMTARTVYDDGARRVWTLMNVLTLV YKVYYGNALDQAISMWALIISVTSNYSGVVTTVMFLAR GIVFMCVEYCPIFFITGNTLQCIMLVYCFLGYFCTCYFGL FCLLNRYFRLTLGVYDYLVSTQEFRYMNSQGLLPPKNSI DAFKLNIKLLGVGGKPCIKVATVQSKMSDVKCTSVVLL SVLQQLRVESSSKLWAQCVQLHNDILLAKDTTEAFEKM VSLLSVLLSMQGAVDINKLCEEMLDNRATLQAIASEFSS LPSYAAFATAQEAYEQAVANGDSEVVLKKLKKSLNVA KSEFDRDAAMQRKLEKMADQAMTQMYKQARSEDKRA KVTSAMQTMLFTMLRKLDNDALNNIINNARDGCVPLNII PLTTAAKLMVVIPDYNTYKNTCDGTTFTYASALWEIQQ VVDADSKIVQLSEISMDNSPNLAWPLIVTALRANSAVKL QNNELSPVALRQMSCAAGTTQTACTDDNALAYYNTTK GGRFVLALLSDLQDLKWARFPKSDGTGTIYTELEPPCRF VTDTPKGPKVKYLYFIKGLNNLNRGMVLGSLAATVRLQ AGNATEVPANSTVLSFCAFAVDAAKAYKDYLASGGQPI TNCVKMLCTHTGTGQAITVTPEANMDQESFGGASCCLY CRCHIDHPNPKGFCDLKGKYVQIPTTCANDPVGFTLKNT VCTVCGMWKGYGCSCDQLREPMLQSADAQSFLNRVCG VSAARLTPCGTGTSTDVVYRAFDIYNDKVAGFAKFLKT NCCRFQEKDEDDNLIDSYFVVKRHTFSNYQHEETIYNLL KDCPAVAKHDFFKFRIDGDMVPHISRQRLTKYTMADLV YALRHFDEGNCDTLKEILVTYNCCDDDYFNKKDWYDF VENPDILRVYANLGERVRQALLKTVQFCDAMRNAGIVG VLTLDNQDLNGNWYDFGDFIQTTPGSGVPVVDSYYSLL MPILTLTRALTAESHVDTDLTKPYIKWDLLKYDFTEERL KLFDRYFKYWDQTYHPNCVNCLDDRCILHCANFNVLFS TVFPPTSFGPLVRKIFVDGVPFVVSTGYHFRELGVVHNQ DVNLHSSRLSFKELLVYAADPAMHAASGNLLLDKRTTC FSVAALTNNVAFQTVKPGNFNKDFYDFAVSKGFFKEGS

		SVELKHFFFAQDGNAAISDYDYYRYNLPTMCDIRQLLFV VEVVDKYFDCYDGGCINANQVIVNNLDKSAGFPFNKW GKARLYYDSMSYEDQDALFAYTKRNVIPTITQMNLKYA ISAKNRARTVAGVSICSTMTNRQFHQKLLKSIAATRGAT VVIGTSKFYGGWHNMLKTVYSDVENPHLMGWDYPKC DRAMPNMLRIMASLVLARKHTTCCSLSHRFYRLANECA QVLSEMVMCGGSLYVKPGGTSSGDATTAYANSVFNICQ AVTANVNALLSTDGNKIADKYVRNLQHRLYECLYRNR DVDTDFVNEFYAYLRKHFSMMILSDDAVVCFNSTYASQ GLVASIKNFKSVLYYQNNVFMSEAKCWTETDLTKGPHE FCSQHTMLVKQGDDYVYLPYPDPSRILGAGCFVDDIVK TDGTLMIERFVSLAIDAYPLTKHPNQEYADVFHLYLQYI RKLHDELTGHMLDMYSVMLTNDNTSRYWEPEFYEAMY TPHTVLQAVGACVLCNSQTSLRCGACIRRPFLCCKCCYD HVISTSHKLVLSVNPYVCNAPGCDVTDVTQLYLGGMSY YCKSHKPPISFPLCANGQVFGLYKNTCVGSDNVTDFNAI ATCDWTNAGDYILANTCTERLKLFAAETLKATEETFKLS YGIATVREVLSDRELHLSWEVGKPRPPLNRNYVFTGYR VTKNSKVQIGEYTFEKGDYGDAVVYRGTTTYKLNVGD YFVLTSHTVMPLSAPTLVPQEHYVRITGLYPTLNISDEFS SNVANYQKVGMQKYSTLQGPPGTGKSHFAIGLALYYPS ARIVYTACSHAAVDALCEKALKYLPIDKCSRIIPARARVE CFDKFKVNSTLEQYVFCTVNALPETTADIVVFDEISMAT NYDLSVVNARLRAKHYVYIGDPAQLPAPRTLLTKGTLE PEYFNSVCRLMKTIGPDMFLGTCRRCPAEIVDTVSALVY DNKLKAHKDKSAQCFKMFYKGVITHDVSSAINRPQIGV VREFLTRNPAWRKAVFISPYNSQNAVASKILGLPTQTVD SSQGSEYDYVIFTQTTETAHSCNVNRFNVAITRAKVGILC IMSDRDLYDKLQFTSLEIPRRNVATLQAENVTGLFKDCS KVITGLHPTQAPTHLSVDTKFKTEGLCVDIPGIPKDMTY RRLISMMGFKMNYQVNGYPNMFITREEAIRHVRAWIGF DVEGCHATREAVGTNLPLQLGFSTGVNLVAVPTGYVDT PNNTDFSRVSAKPPPGDQFKHLIPLMYKGLPWNVVRIKI VQMLSDTLKNLSDRVVFVLWAHGFELTSMKYFVKIGPE RTCCLCDRRATCFSTASDTYACWHHSIGFDYVYNPFMID

		VQQWGFTGNLQSNHDLYCQVHGNAHVASCDAIMTRCL AVHECFVKRVDWTIEYPIIGDELKINAACRKVQHMVVK AALLADKFPVLHDIGNPKAIKCVPQADVEWKFYDAQPC SDKAYKIEELFYSYATHSDKFTDGVCLFWNCNVDRYPA NSIVCRFDTRVLSNLNLPGCDGGSLYVNKHAFHTPAFDK SAFVNLKQLPFFYYSDSPCESHGKQVVSDIDYVPLKSAT CITRCNLGGAVCRHHANEYRLYLDAYNMMISAGFSLW VYKQFDTYNLWNTFTRLQSLENVAFNVVNKGHFDGQQ GEVPVSIINNTVYTKVDGVDVELFENKTTLPVNVAFELW AKRNIKPVPEVKILNNLGVDIAANTVIWDYKRDAPAHIS TIGVCSMTDIAKKPTETICAPLTVFFDGRVDGQVDLFRN ARNGVLITEGSVKGLQPSVGPKQASLNGVTLIGEAVKTQ FNYYKKVDGVVQQLPETYFTQSRNLQEFKPRSQMEIDFL ELAMDEFIERYKLEGYAFEHIVYGDFSHSQLGGLHLLIG LAKRFKESPFELEDFIPMDSTVKNYFITDAQTGSSKCVCS VIDLLLDDFVEIIKSQDLSVVSKVVKVTIDYTEISFMLWC KDGHVETFYPKLQSSQAWQPGVAMPNLYKMQRMLLEK CDLQNYGDSATLPKGIMMNVAKYTQLCQYLNTLTLAV PYNMRVIHFGAGSDKGVAPGTAVLRQWLPTGTLLVDSD LNDFVSDADSTLIGDCATVHTANKWDLIISDMYDPKTK NVTKENDSKEGFFTYICGFIQQKLALGGSVAIKITEHSWN ADLYKLMGHFAWWTAFVTNVNASSSEAFLIGCNYLGK PREQIDGYVMHANYIFWRNTNPIQLSSYSLFDMSKFPLK LRGTAVMSLKEGQINDMILSLLSKGRLIIRENNRVVISSD VLVNN
327	полипротеин ORF1a	MESLVPGFNEKTHVQLSLPVLQVRDVLVRGFGDSVEEV LSEARQHLKDGTCGLVEVEKGVLPQLEQPYVFIKRSDAR TAPHGHVMVELVAELEGIQYGRSGETLGVLVPHVGEIPV AYRKVLLRKNGNKGAGGHSYGADLKSFDLGDELGTDP YEDFQENWNTKHSSGVTRELMRELNGGAYTRYVDNNF CGPDGYPLECIKDLLARAGKASCTLSEQLDFIDTKRGVY CCREHEHEIAWYTERSEKSYELQTPFEIKLAKKFDTFNG ECPNFVFPLNSIIKTIQPRVEKKKLDGFMGRIRSVYPVASP NECNQMCLSTLMKCDHCGETSWQTGDFVKATCEFCGT ENLTKEGATTCGYLPQNAVVKIYCPACHNSEVGPEHSL

		AEYHNESGLKTILRKGGRTIAFGGCVFSYVGCHNKCAY WVPRASANIGCNHTGVVGEGSEGLNDNLLEILQKEKVNI NIVGDFKLNEEIAIILASFSASTSAFVETVKGLDYKAFKQI VESCGNFKVTKGKAKKGAWNIGEQKSILSPLYAFASEA ARVVRSIFSRTLETAQNSVRVLQKAAITILDGISQYSLRLI DAMMFTSDLATNNLVVMAYITGGVVQLTSQWLTNIFGT VYEKLKPVLDWLEEKFKEGVEFLRDGWEIVKFISTCACE IVGGQIVTCAKEIKESVQTFFKLVNKFLALCADSIIIGGAK LKALNLGETFVTHSKGLYRKCVKSREETGLLMPLKAPK EIIFLEGETLPTEVLTEEVVLKTGDLQPLEQPTSEAVEAPL VGTPVCINGLMLLEIKDTEKYCALAPNMMVTNNTFTLK GGAPTKVTFGDDTVIEVQGYKSVNITFELDERIDKVLNE KCSAYTVELGTEVNEFACVVADAVIKTLQPVSELLTPLG IDLDEWSMATYYLFDESGEFKLASHMYCSFYPPDEDEEE GDCEEEEFEPSTQYEYGTEDDYQGKPLEFGATSAALQPE EEQEEDWLDDDSQQTVGQQDGSEDNQTTTIQTIVEVQP QLEMELTPVVQTIEVNSFSGYLKLTDNVYIKNADIVEEA KKVKPTVVVNAANVYLKHGGGVAGALNKATNNAMQV ESDDYIATNGPLKVGGSCVLSGHNLAKHCLHVVGPNVN KGEDIQLLKSAYENFNQHEVLLAPLLSAGIFGADPIHSLR VCVDTVRTNVYLAVFDKNLYDKLVSSFLEMKSEKQVE QKIAEIPKEEVKPFITESKPSVEQRKQDDKKIKACVEEVT TTLEETKFLTENLLLYIDINGNLHPDSATLVSDIDITFLKK DAPYIVGDVVQEGVLTAVVIPTKKAGGTTEMLAKALRK VPTDNYITTYPGQGLNGYTVEEAKTVLKKCKSAFYILPSI ISNEKQEILGTVSWNLREMLAHAEETRKLMPVCVETKAI VSTIQRKYKGIKIQEGVVDYGARFYFYTSKTTVASLINTL NDLNETLVTMPLGYVTHGLNLEEAARYMRSLKVPATVS VSSPDAVTAYNGYLTSSSKTPEEHFIETISLAGSYKDWSY SGQSTQLGIEFLKRGDKSVYYTSNPTTFHLDGEVITFDNL KTLLSLREVRTIKVFTTVDNINLHTQVVDMSMTYGQQF GPTYLDGADVTKIKPHNSHEGKTFYVLPNDDTLRVEAFE YYHTTDPSFLGRYMSALNHTKKWKYPQVNGLTSIKWA DNNCYLATALLTLQQIELKFNPPALQDAYYRARAGEAA NFCALILAYCNKTVGELGDVRETMSYLFQHANLDSCKR

		VLNVVCKTCGQQQTTLKGVEAVMYMGTLSYEQFKKGV QIPCTCGKQATKYLVQQESPFVMMSAPPAQYELKHGTF TCASEYTGNYQCGHYKHITSKETLYCIDGALLTKSSEYK GPITDVFYKENSYTTTIKPVTYKLDGVVCTEIDPKLDNY YKKDNSYFTEQPIDLVPNQPYPNASFDNFKFVCDNIKFA DDLNQLTGYKKPASRELKVTFFPDLNGDVVAIDYKHYT PSFKKGAKLLHKPIVWHVNNATNKATYKPNTWCIRCL WSTKPVETSNSFDVLKSEDAQGMDNLACEDLKPVSEEV VENPTIQKDVLECNVKTTEVVGDIILKPANNSLKITEEVG HTDLMAAYVDNSSLTIKKPNELSRVLGLKTLATHGLAA VNSVPWDTIANYAKPFLNKVVSTTTNIVTRCLNRVCTN YMPYFFTLLLQLCTFTRSTNSRIKASMPTTIAKNTVKSVG KFCLEASFNYLKSPNFSKLINIIIWFLLLSVCLGSLIYSTAA LGVLMSNLGMPSYCTGYREGYLNSTNVTIATYCTGSIPC SVCLSGLDSLDTYPSLETIQITISSFKWDLTAFGLVAEWF LAYILFTRFFYVLGLAAIMQLFFSYFAVHFISNSWLMWLI INLVQMAPISAMVRMYIFFASFYYVWKSYVHVVDGCNS STCMMCYKRNRATRVECTTIVNGVRRSFYVYANGGKG FCKLHNWNCVNCDTFCAGSTFISDEVARDLSLQFKRPIN PTDQSSYIVDSVTVKNGSIHLYFDKAGQKTYERHSLSHF VNLDNLRANNTKGSLPINVIVFDGKSKCEESSAKSASVY YSQLMCQPILLLDQALVSDVGDSAEVAVKMFDAYVNTF SSTFNVPMEKLKTLVATAEAELAKNVSLDNVLSTFISAA RQGFVDSDVETKDVVECLKLSHQSDIEVTGDSCNNYML TYNKVENMTPRDLGACIDCSARHINAQVAKSHNIALIW NVKDFMSLSEQLRKQIRSAAKKNNLPFKLTCATTRQVV NVVTTKIALKGGKIVNNWLKQLIKVTLVFLFVAAIFYLIT PVHVMSKHTDFSSEIIGYKAIDGGVTRDIASTDTCFANK HADFDTWFSQRGGSYTNDKACPLIAAVITREVGFVVPGL PGTILRTTNGDFLHFLPRVFSAVGNICYTPSKLIEYTDFAT SACVLAAECTIFKDASGKPVPYCYDTNVLEGSVAYESLR PDTRYVLMDGSIIQFPNTYLEGSVRVVTTFDSEYCRHGT CERSEAGVCVSTSGRWVLNNDYYRSLPGVFCGVDAVN LLTNMFTPLIQPIGALDISASIVAGGIVAIVVTCLAYYFMR FRRAFGEYSHVVAFNTLLFLMSFTVLCLTPVYSFLPGVY

		SVIYLYLTFYLTNDVSFLAHIQWMVMFTPLVPFWITIAYI ICISTKHFYWFFSNYLKRRVVFNGVSFSTFEEAALCTFLL NKEMYLKLRSDVLLPLTQYNRYLALYNKYKYFSGAMD TTSYREAACCHLAKALNDFSNSGSDVLYQPPQTSITSAV LQSGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDV VYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIRKSNHNFLVQAGNV QLRVIGHSMQNCVLKLKVDTANPKTPKYKFVRIQPGQT FSVLACYNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSCGSVGF NIDYDCVSFCYMHHMELPTGVHAGTDLEGNFYGPFVDR QTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTT LNDFNLVAMKYNYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDM CASLKELLQNGMNGRTILGSALLEDEFTPFDVVRQCSGV TFQSAVKRTIKGTHHWLLLTILTSLLVLVQSTQWSLFFFL YENAFLPFAMGIIAMSAFAMMFVKHKHAFLCLFLLPSLA TVAYFNMVYMPASWVMRIMTWLDMVDTSLSGFKLKD CVMYASAVVLLILMTARTVYDDGARRVWTLMNVLTLV YKVYYGNALDQAISMWALIISVTSNYSGVVTTVMFLAR GIVFMCVEYCPIFFITGNTLQCIMLVYCFLGYFCTCYFGL FCLLNRYFRLTLGVYDYLVSTQEFRYMNSQGLLPPKNSI DAFKLNIKLLGVGGKPCIKVATVQSKMSDVKCTSVVLL SVLQQLRVESSSKLWAQCVQLHNDILLAKDTTEAFEKM VSLLSVLLSMQGAVDINKLCEEMLDNRATLQAIASEFSS LPSYAAFATAQEAYEQAVANGDSEVVLKKLKKSLNVA KSEFDRDAAMQRKLEKMADQAMTQMYKQARSEDKRA KVTSAMQTMLFTMLRKLDNDALNNIINNARDGCVPLNII PLTTAAKLMVVIPDYNTYKNTCDGTTFTYASALWEIQQ VVDADSKIVQLSEISMDNSPNLAWPLIVTALRANSAVKL QNNELSPVALRQMSCAAGTTQTACTDDNALAYYNTTK GGRFVLALLSDLQDLKWARFPKSDGTGTIYTELEPPCRF VTDTPKGPKVKYLYFIKGLNNLNRGMVLGSLAATVRLQ AGNATEVPANSTVLSFCAFAVDAAKAYKDYLASGGQPI TNCVKMLCTHTGTGQAITVTPEANMDQESFGGASCCLY CRCHIDHPNPKGFCDLKGKYVQIPTTCANDPVGFTLKNT VCTVCGMWKGYGCSCDQLREPMLQSADAQSFLNGFAV

328	белок ORF3a	MDLFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQASL PFGWLIVGVALLAVFQSASKIITLKKRWQLALSKGVHFV CNLLLLFVTVYSHLLLVAAGLEAPFLYLYALVYFLQSIN FVRIIMRLWLCWKCRSKNPLLYDANYFLCWHTNCYDY CIPYNSVTSSIVITSGDGTTSPISEHDYQIGGYTEKWESGV KDCVVLHSYFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVTFFIYNKI VDEPEEHVQIHTIDGSSGVVNPVMEPIYDEPTTTTSVPL
329	белок оболочки	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLC AYCCNIVNVSLVKPSFYVYSRVKNLNSSRVPDLLV
330	мембранный гликопротеин	MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFLTWICLLQFAY ANRNRFLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLAAVYRINWITG GIAIAMACLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETN ILLNVPLHGTILTRPLLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGR CDIKDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQRVAGDSGFAAYS RYRIGNYKLNTDHSSSSDNIALLVQ
331	белок ORF6	MFHLVDFQVTIAEILLIIMRTFKVSIWNLDYIINLIIKNLSK SLTENKYSQLDEEQPMEID
332	белок ORF7a	MKIILFLALITLATCELYHYQECVRGTTVLLKEPCSSGTY EGNSPFHPLADNKFALTCFSTQFAFACPDGVKHVYQLR ARSVSPKLFIRQEEVQELYSPIFLIVAAIVFITLCFTLKRKT E
333	белок ORF7b	MIELSLIDFYLCFLAFLLFLVLIMLIIFWFSLELQDHNETC HA
334	белок ORF8	MKFLVFLGIITTVAAFHQECSLQSCTQHQPYVVDDPCPIH FYSKWYIRVGARKSAPLIELCVDEAGSKSPIQYIDIGNYT VSCLPFTINCQEPKLGSLVVRCSFYEDFLEYHDVRVVLD FI
335	нуклеокапсидный фосфопротеин	MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSGARSK QRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGVPINT NSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYYLG TGPEAGLPYGANKDGIIWVATEGALNTPKDHIGTRNPAN NAAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRSRNS SRNSTPGSSRGTSPARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLE SKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAY

		NVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQ FAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPN FKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADETQALPQ RQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA
336	белок ORF10	MGYINVFAFPFTIYSLLLCRMNSRNYIAQVDVVNFNLT

В некоторых вариантах реализации антигенный полипептид представляет собой белок SARS-CoV-2, фрагмент белка SARS-CoV-2 или получен из белка SARS-CoV-2 или его фрагмента. В некоторых вариантах реализации антигенный полипептид может состоять, помимо прочего, из спайк белка SARS-CoV2, Nsp1-Nsp16, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORFb, ORF8, ORF10, белка оболочки SARS-CoV2, мембранного белка SARS-CoV2, нуклеокапсидного белка SARS-CoV2 или иммуногенного фрагмента спайк белка SARS-CoV2.

В некоторых вариантах реализации антиген содержит всю или часть последовательности из Таблицы 9. В некоторых вариантах реализации пептид содержит последовательность сходную на по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% с последовательностью в Таблице 9. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК-вакцина содержит РНК, кодирующую более одного антигена. В некоторых вариантах реализации кольцевая РНК-вакцина содержит РНК, кодирующую по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 антигенов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК кодирует более одного антигена. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кольцевой РНК кодирует по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 антигенов.

Таблица 10. Адъювантные полипептиды

SEQ ID NO:	Адъювантный белок	Последовательность
337	BCSP31 (BCSP_BRUME)	MKFGSKIRRLAVAAVAGAIALGASFAVAQAPTFFRIG TGGTAGTYYPIGGLIANAISGAGEKGVPGLVATAVSS NGSVANINAIKSGALESGFTQSDVAYWAYNGTGLYD GKGKVEDLRLLATLYPETIHIVARKDANIKSVADLKG KRVSLDEPGSGTIVDARIVLEAYGLTEDDIKAEHLKPG PAGERLKDGALDAYFFVGGYPTGAISELAISNGISLVPI SGPEADKILEKYSFFSKDVVPAGAYKDVAETPTLAVA AQWVTSAKQPDDLIYNITKVLWNEDTRKALDAGHA KGKLIKLDSATSSLGIPLHPGAERFYKEAGVLK

338	MOMP (MOMP6_CHLP6)	MKKLLKSALLFAATGSALSLQALPVGNPAEPSLLIDG TMWEGASGDPCDPCATWCDAISIRAGYYGDYVFDRV LKVDVNKTFSGMAATPTQATGNASNTNQPEANGRPN IAYGRHMQDAEWFSNAAFLALNIWDRFDIFCTLGASN GYFKASSAAFNLVGLIGFSAASSISTDLPMQLPNVGIT QGVVEFYTDTSFSWSVGARGALWECGCATLGAEFQY AQSNPKIEMLNVTSSPAQFVIHKPRGYKGASSNFPLPI TAGTTEATDTKSATIKYHEWQVGLALSYRLNMLVPYI GVNWSRATFDADTIRIAQPKLKSEILNITTWNPSLIGST TALPNNSGKDVLSDVLQIASIQINKMKSRKACGVAVG ATLIDADKWSITGEARLINERAAHMNAQFRF
339	Флагеллин (FLIC_ECOLI (штамм K12))	MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRIN SAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQ TTEGALSEINNNLQRVRELTVQATTGTNSESDLSSIQD EIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAKNGSMKIQVGAN DNQTITIDLKQIDAKTLGLDGFSVKNNDTVTTSAPVT AFGATTTNNIKLTGITLSTEAATDTGGTNPASIEGVYT DNGNDYYAKITGGDNDGKYYAVTVANDGTVTMAT GATANATVTDANTTKATTITSGGTPVQIDNTAGSATA NLGAVSLVKLQDSKGNDTDTYALKDTNGNLYAADV NETTGAVSVKTITYTDSSGAASSPTAVKLGGDDGKTE VVDIDGKTYDSADLNGGNLQTGLTAGGEALTAVANG KTTDPLKALDDAIASVDKFRSSLGAVQNRLDSAVTNL NNTTTNLSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIIQQAGN SVLAKANQVPQQVLSLLQG
340	IFN-альфа (IFNA1_HUMAN интерферон альфа-1/13)	MASPFALLMVLVVLSCKSSCSLGCDLPETHSLDNRRT LMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKA PAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTEL YQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFR RITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLR RKE
341	IFN-гамма (IFNG_HUMAN интерферон гамма)	MKYTSYILAFQLCIVLGSLGCYCQDPYVKEAENLKKY FNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVS FYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKK RDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAK

		TGKRKRSQMLFRGRRASQ
342	IL-2 (IL2_HUMAN Интерлейкин-2)	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS TLT
343	IL-15 (IL15_HUMAN Интерлейкин-15)	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFS AGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLI ILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTS
344	IL-18 (IL18_HUMAN Интерлейкин-18)	MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDY FGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDC RDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCE NKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQF ESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTV QNED
345	FLt3-лиганд	MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSPIS SDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWR LVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKC AFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQN FSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPRPLEATAPTAPQPPLLL LLLLPVGLLLLAAAWCLHWQRTRRRTPRPGEQVPPV PSPQDLLLVEH
346	анти-CTLA4 (ипилумимаб)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHW VRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

		DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
347	анти-PD1 (ниволумаб)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISR DNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
348	анти-41BB (утомилумаб)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWV RQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSPSFQGQVTISAD KSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCV ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид или белок, кодируемый полинуклеотидом, содержит последовательность на по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 99,5% сходную с одной или более последовательностями, раскрытыми в данном документе. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид или белок, кодируемый полинуклеотидом, содержит последовательность, идентичную одной или более последовательностям, раскрытым в данном документе. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность кодирует белок, который содержит или состоит из последовательности на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%

сходной или идентичной последовательности в Таблице 8. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность кодирует белок, который содержит или состоит из последовательности на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% сходной или идентичной последовательности в Таблице 8, и IRES, который содержит или состоит из последовательности на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% сходной или идентичной последовательности в Таблице 1. В некоторых вариантах реализации экспрессионную последовательность кодирует белок, который содержит или состоит из последовательности на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% сходной или идентичной последовательности в Таблице 8, а также фрагменты 3'- и 5'-концов интронов группы I, которые содержат или состоят из соответствующих последовательностей на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% сходных или идентичных последовательностям в Таблицах 2 и 3, 4 и 5 или 6 и 7.

В данном документе описаны предпочтительные варианты реализации. Вариации этих предпочтительных вариантов реализации могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеприведенного описания. Изобретатели ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие варианты по мере необходимости, и изобретатели 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. Кроме того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариантах охватывается изобретением, если иное не указано в данном документе или явно противоречит контексту.

ПРИМЕРЫ

Wesselhoeft et al., (2019) RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In vivo. Molecular Cell. 74(3), 508-520 и Wesselhoeft et al., (2018) Engineering circular RNA for Potent and Stable Translation in Eukaryotic Cells. Nature Communications. 9, 2629 полностью включены посредством ссылки.

Изобретение дополнительно описано подробно со ссылкой на следующие примеры, но не предполагается, что они ограничиваются следующими примерами. Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять способы и композиции согласно изобретению, и не ограничивают объем того, что авторы считают своим изобретением.

ПРИМЕР 1

Пример 1А: Области, образующие внешние дуплексы, обеспечивают циркуляризацию длинной РНК-предшественника с использованием стратегии циркуляризации пермутированного экзона интрона (PIE).

Последовательность из 1,1 кнт последовательность, содержащая IRES полноразмерного вируса энцефаломиокардита (EMCV), экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia (GLuc) и два коротких экзонных фрагмента конструкции пермутированного интрон-экзона (PIE), вставляли между 3'- и 5'-концами интронов пермутированного каталитического интрона группы I в гене тимидилатсинтазы (Td) фага T4. Прекурсорную РНК синтезировали способом стоковой транскрипции. Была предпринята попытка циркуляризации путем нагревания РНК-предшественника в присутствии ионов магния и ГТФ, но продукты сплайсинга не были получены.

Идеально комплементарные участки, образующие дуплекс длиной 9 нуклеотидов и 19 нуклеотидов, были сконструированы и добавлены к 5'- и 3'-концам РНК-предшественника. Добавление этих гомологических плеч увеличило эффективность сплайсинга с 0 до 16% для области, образующие 9 нуклеотидных дуплексов, и до 48% для областей, образующих 19 нуклеотидных дуплексов, что оценивается по исчезновению полосы предшественника РНК.

Продукт сплайсинга обрабатывали РНКазой R. Секвенирование предполагаемого соединения сплайсинга в реакциях сплайсинга, обработанных РНКазой R, выявило лигированные экзоны, а расщепление обработанной РНКазой R реакции сплайсинга РНКазой H, нацеленной на олигонуклеотиды, дало одну полосу, в отличие от двух полос, полученных из линейного предшественника, расщепленным РНКазой H. Это показывает, что кольцевая РНК является основным продуктом реакций сплайсинга РНК-предшественника, содержащей участки, образующие внешние дуплексы длиной 9 или 19 нуклеотидов.

Пример 1B: Спейсеры, которые сохраняют вторичные структуры сайтов сплайсинга IRES и PIE, повышают эффективность циркуляризации.

Был разработан ряд спейсеров, которые были вставлены между 3'-концом сайта сплайсинга PIE и IRES. Эти спейсеры были разработаны либо для сохранения, либо для разрушения вторичных структур внутри последовательностей интронов в IRES, 3'-конце сайта сплайсинга PIE, и/или 5' конце сайта 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 2A: Внутренние области, образующие дуплекс, в дополнение к внешним областям, образующим дуплекс, создают пузырь сплайсинга и позволяют транслировать несколько последовательностей экспрессии.

Спейсеры были сконструированы так, чтобы они были неструктурированными, негомологичными последовательностям интрона и IRES и содержали области, образующие спейсер-спейсерный дуплекс. Их вставляли между 5'-концом экзона и IRES и между 3'-концом экзона и последовательностью экспрессии в конструкциях, содержащих внешние дуплексообразующие области, EMCV IRES и экспрессионные последовательности для

люциферазы Gaussia (общая длина: 1289 нт), люциферазы светлячка (2384 нт), eGFP (1451 нт), эритропоэтина человека (1313 нт) и эндонуклеазы Cas9 (4934 нт). Циркуляризация всех 5 конструкций была достигнута. Циркуляризация конструкций с использованием фага T4 и интронов Anabaena была приблизительно одинаковой. Эффективность циркуляризации была выше для более коротких последовательностей. Для измерения трансляции каждую конструкцию трансфицировали в клетки HEK293. Клетки, трансфицированные люциферазойGaussia и светлячка, давали устойчивый ответ, измеренный по люминесценции, эритропоэтин человека определяли в среде клеток, трансфицированных эритропоэтиновой кольцРНК, а флуоресценция EGFP наблюдалась в клетках, трансфицированных EGFP кольцРНК. Совместная трансфекция кольцРНК Cas9 с sgРНК, направленной против GFP, в клетки, конститутивно экспрессирующие GFP, приводила к исчезновению флуоресценции до 97% клеток по сравнению с контролем, содержащим только sgРНК.

Пример 2B: Использование CVB3 IRES увеличивает производство белка.

Были созданы конструкции с внутренними и внешними дуплексообразующими областями, и различными IRES, содержащими последовательности экспрессии либо люциферазы Gaussia, либо люциферазы Firefly. Выработку белка измеряли по люминесценции в супернатанте клеток HEK293 через 24 часа после трансфекции. Конструкция IRES вируса Коксаки B3 (CVB3) вырабатывала наибольшее количество белка в обоих случаях.

Пример 2C: Использование спейсеров полиA или полиAC увеличивает производство белка.

Между IRES и соединением сплайсинга в конструкцию с каждым IRES, который вырбатывал белок, в примере 2B добавляли спейсеры полиA или полиAC длиной тридцать нуклеотидов. Активность люциферазы Gaussia измеряли по люминесценции в супернатанте клеток HEK293 через 24 часа после трансфекции. Оба спейсера улучшали экспрессию в каждой конструкции по сравнению с контрольными конструкциями без спейсеров.

ПРИМЕР 3

Клетки HEK293 или HeLa, трансфицированные кольцевой РНК, вырабатывают больше белка, чем клетки, трансфицированные сопоставимой немодифицированной или модифицированной линейной РНК.

КольцРНК, кодирующую люциферазу Gaussia, очищенную ВЭЖХ (CVB3-GLuc-pAC), сравнивали с канонической немодифицированной линейной мРНК GLuc, кэпированной 5'-метилгуанозином и 3'-полиA-хвостом, и коммерчески доступной нуклеозид-модифицированной (псевдоуридин, 5-метилцитозин) линейной мРНК GLuc (от Trilink). Люминесценцию измеряли через 24 часа после трансфекции, показывая, что кольцРНК вырабатывает на 811,2% больше белка, чем немодифицированная линейная мРНК в клетках HEK293 и на 54,5% больше белка, чем модифицированная мРНК. Аналогичные результаты были получены в клетках HeLa и при сравнении оптимизированной кольцРНК, кодирующей эритропоэтин человека, с линейной мРНК,

модифицированной 5-метоксиуридином.

Данные люминесценции собирали в течение 6 дней. В клетках HEK293 трансфекция кольцРНК приводила к периоду полужизни выработки белка 80 часов по сравнению с 43 часами немодифицированной линейной мРНК и 45 часами модифицированной линейной мРНК. В клетках HeLa трансфекция кольцРНК приводила к периоду полужизни выработки белка 116 часов по сравнению с 44 часами немодифицированной линейной мРНК и 49 часами модифицированной линейной мРНК. КольцРНК вырабатывала значительно больше белка, чем немодифицированная и модифицированная линейные мРНК за время своего существования в клетках обоих типов.

ПРИМЕР 4

Пример 4A: Очистка кольцРНК расщеплением РНКазой, очисткой ВЭЖХ и обработкой 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.

Клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293) и карциномы легкого человека A549 трансфицировали:

a. продуктами реакции сплайсинга неочищенной кольцевой РНК GLuc,

b. продуктами расщепления РНКазой R реакции сплайсинга,

c. продуктами расщепления РНКазой R и очистки ВЭЖХ реакции сплайсинга, или

d. продуктами расщепления РНКазой, очистки ВЭЖХ и обработки фосфатазой реакции сплайсинга.

Расщепление РНКазой R реакций сплайсинга было недостаточным для предотвращения высвобождения цитокинов в клетках A549 по сравнению с нетрансфицированными контролями.

Добавление очистки ВЭЖХ также было недостаточным для предотвращения высвобождения цитокинов, хотя наблюдалось значительное снижение интерлейкина-6 (IL-6) и значительное увеличение количества интерферона-α1 (IFNα1) по сравнению с неочищенной реакцией сплайсинга.

Добавление обработки фосфатазой после очистки ВЭЖХ и перед расщеплением РНКазой R резко снижало экспрессию всех активированных цитокинов, оцененных в клетках A549. Уровни секретируемого хемоаттрактантного белка 1 моноцитов (MCP1), IL-6, IFNα1, фактора некроза опухоли α (TNFα) и белка-10, индуцируемого IFNγ (IP-10), упали до неопределяемых или до исходных нетрасфицированных уровней.

В клетках HEK293 не было значительного высвобождения цитокинов. 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.

Клетки A549 трансфицировали:

a. неочищенной кольцевой РНК,

b. высокомолекулярной (линейной и циклической конкатенацией) РНК,

c. кольцевой (разрезанной) РНК,

d. ранней фракцией очищенной кольцевой РНК (большее совпадение с пиком РНК с разрывом),

e. поздней фракцией очищенной кольцевой РНК (меньшее перекрытие пика РНК с разрывом),

f. интронами, вырезанными во время циркуляризации, или

g. носителем (т.е. нетрансфицированный контроль).

РНК-предшественник синтезировали отдельно и очищали в форме мутанта с делецией сайта сплайсинга (DS) из-за трудностей с получением достаточно чистой линейной РНК-предшественника в результате реакции сплайсинга. Высвобождение цитокинов и жизнеспособность клеток измеряли в каждом случае.

Сильное высвобождение IL-6, RANTES и IP-10 наблюдалось в ответ на большинство видов, присутствующих в реакции сплайсинга, а также на РНК-предшественник. Ранние фракции кольцРНК вызывали цитокиновый ответ, сравнимый с другими фракциями, не относящимися к кольцРНК, что указывает на то, что даже относительно небольшие количества примесей линейной РНК способны индуцировать значительный клеточный иммунный ответ в клетках A549. Поздние фракции кольцРНК не вызывали цитокинового ответа, превышающего таковой у нетрансфицированных контролей. Жизнеспособность клеток A549 через 36 часов после трансфекции была значительно выше для поздних фракций кольцРНК по сравнению со всеми другими фракциями.

Анализировали индукцию транскриптов RIG-I и IFN-β1 при трансфекции клеток A549 фракциями поздней кольцРНК ВЭЖХ, РНК-предшественником или неочищенными реакциями сплайсинга. Индукция транскриптов как RIG-I, так и IFN-β1 была слабее для поздних фракций кольцРНК, 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-β1, но очищенная кольцРНК этого не делала. В целом клетки HeLa были менее чувствительны к загрязняющим видам РНК, чем клетки A549.

Временной эксперимент, отслеживающий индукцию транскриптов RIG-I, IFN-β1, IL-6 и RANTES в течение первых 8 часов после трансфекции клеток A549 реакциями сплайсинга или полностью очищенной кольцРНК, не выявил временного ответа на кольцРНК. Очищенная кольцРНК также не смогла индуцировать провоспалительные транскрипты в мышиных макрофагах RAW264.7.

Клетки A549 трансфицировали очищенной кольцРНК, содержащей экспрессионную последовательность 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 кольцРНК не является естественным лигандом для RIG-I.

ПРИМЕР 5

Кольцевая РНК избегает обнаружения TLR.

Репортерные клеточные линии TLR 3, 7 и 8 трансфицировали множественными конструкциями линейной или кольцевой РНК и измеряли секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP).

Линеаризованную РНК конструировали путем удаления последовательностей интрона и гомологических плеч. Затем линейные конструкции РНК обрабатывали фосфатазой (в случае кэпированных РНК после кэпирования) и очищали с помощью ВЭЖХ.

Ни одна из попыток трансфекции не вызывала ответа в репортерных клетках TLR7. Репортерные клетки TLR3 и TLR8 активировали кэпированной линеаризованной РНК, полиаденилированной линеаризованной РНК, фракцией ВЭЖХ никированной кольцевой РНК и ранней фракцией кольцевой РНК. Поздняя фракция кольцРНК и m1ψ-мРНК не вызывали TLR-опосредованного ответа ни в одной клеточной линии.

Во втором эксперименте кольцРНК линеаризовали с использованием двух способов: обработки кольцРНК нагреванием в присутствии ионов магния и расщепления РНКазой H, управляемой ДНК-олигонуклеотидами. Оба способа дали большую часть линейной РНК полной длины с небольшим количеством интактной кольцРНК. 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. В репортерных клетках TLR3 и TLR7 не наблюдалось активации в деградированных или интактных условиях, несмотря на активацию TLR3 линеаризованной РНК, транскрибированной in vitro.

ПРИМЕР 6

Немодифицированная кольцевая РНК вызывает повышенную устойчивую экспрессию белка in vivo, чем линейная РНК.

Мышам вводили инъекции, а клетки HEK293 трансфицировали немодифицированными и m1ψ-модифицированными линейными мРНК и кольцРНК эритропоэтина человека (hEpo). Эквимолярная трансфекция m1ψ-мРНК и немодифицированной кольцРНК приводила к устойчивой экспрессии белка в клетках HEK293. Линейная мРНК hEpo и кольцРНК демонстрировали сходные относительные модели экспрессии белка и жизнеспособность клеток по сравнению с линейной мРНК и кольцРНК GLuc при трансфекции клеток HEK293 и A549 одинаковой массой.

У мышей hEpo обнаруживали в сыворотке после инъекции кольцевой РНК hEpo или

линейной мРНК в висцеральный жир. hEpo, обнаруженный после инъекции немодифицированной кольцРНК, распадался медленнее, чем таковой из немодифицированной или m1ψ-мРНК, и все еще присутствовал через 42 часа после инъекции. Уровень hEpo в сыворотке быстро снижался при введении неочищенной реакции сплайсинга кольцРНК или немодифицированной линейной мРНК. Инъекция неочищенных реакций сплайсинга вызывала цитокиновый ответ, обнаруживаемый в сыворотке, который не наблюдался для других РНК, включая очищенную кольцРНК.

ПРИМЕР 7

Кольцевая РНК может быть эффективно доставлена in vivo или in vitro с помощью липидных наночастиц.

Очищенную кольцевую РНК превращали в липидные наночастицы (LNP) с ионизируемым липидоидом 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.

Очищенная кольцРНК hEpo демонстрировала более высокую экспрессию, чем 5moU-мРНК, при инкапсулировании в LNP и добавлении к клеткам HEK293. Стабильность экспрессии 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 кольцРНК. Как немодифицированная кольцРНК, так и 5moU-мРНК не активировались RIG-I/IFN-β1 in vitro.

У мышей LNP-РНК доставляли путем местной инъекции в висцеральную жировую ткань или внутривенно в печень. Экспрессия hEpo в сыворотке из кольцРНК была ниже, но сравнима с экспрессией из 5moU-мРНК через 6 часов после доставки в обоих случаях. Сывороточный hEpo, обнаруженный после инъекции в жировую ткань немодифицированной LNP-кольцРНК, распадался медленнее, чем таковой из LNP-5moU-мРНК, при этом в сыворотке наблюдалась задержка в затухании экспрессии, аналогичная наблюдаемой in vitro, но сывороточный hEpo после внутривенной инъекции LNP-кольцРНК или LNP-5moU-мРНК распадались с около одинаковой скоростью. Ни в одном из этих случаев не было повышения уровня сывороточных цитокинов или местной индукции транскриптов RIG-I, TNFα или IL-6.

ПРИМЕР 8

Экспрессия и функциональная стабильность с помощью IRES в клетках HEK293, HepG2 и 1C1C7.

Конструкции, включающие области интрона/экзона анабаена, экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и различные IRES, циркуляризировали. 100 нг 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, включающие крохивирус B, саливирус FHB, вирус Аичи, саливирус HG-J1 и энтеровирус J IRES, вызывали наибольшую люминесценцию через 24 часа (Фиг. 1A). В клетках HepG2 конструкции, включающие вирус Аичи, FHB саливируса, EMCV-Cf и CVA3 IRES, давали высокую люминесценцию через 24 часа (Фиг. 1B). В клетках 1C1C7 конструкции, включающие саливирус FHB, вирус Аичи, саливирус NG-J1 и саливирус A SZ-1 IRES, вызывали сильную люминесценцию через 24 часа (Фиг. 1C).

Наблюдалась тенденция большие IRES, вызывали 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 крохивируса B давала самую высокую люминесценцию, особенно по сравнению с другими IRES аналогичной длины (Фиг. 2A). Графики экспрессии из конструкций IRES в клетках HepG2 и 1C1C7 в зависимости от размера IRES представлены на Фиг 2B и 2C.

Функциональную стабильность выбранных конструкций IRES в клетках HepG2 и 1C1C7 измеряли в течение 3 дня. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли каждые 24 часа после трансфекции 20000 клеток 100 нг каждой реакции циркуляризации с последующей полной заменой среды. Саливирус A GUT и саливирус FHB проявляли самую высокую функциональную стабильность в клетках HepG2, а саливирус N-J1 и саливирус FHB давали наиболее стабильную экспрессию в клетках 1C1C7 (Фиг. 3A и 3B).

ПРИМЕР 9

Экспрессия и функциональная стабильность IRES в клетках Jurkat.

2 набора конструкций, включая области интрона/экзона anabaena, экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и подмножество ранее протестированных IRES, циркуляризированы. 60000 клеток Jurkat подвергали электропорации с 1 мкг 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 Саливирус A SZ1 IRES давали наибольшую экспрессию через 24 часа. Данные можно найти на Фиг. 4A и 4B.

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 элетропорации 60.000 клеток 1 мкг каждой реакции циркуляризации с последующей полной заменой среды (Фиг. 5A и 5B).

Конструкции саливирус A SZ1 и саливирус 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.

Конструкция, включающая регионы интрона анабаена/экзонов, экспрессионные последовательности люциферазы Gaussia и саливирус FHB IRES были циркулированы. мРНК, включая экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и ~150нт хвост полиА и модифицированный для замены 100% уридина 5-метоксиуридином (5moU) коммерчески доступны и были приобретены у Trilink. Было показано, что нуклеотидные модификации 5moU улучшают стабильность и экспрессию мРНК (Bioconjug Chem. 2016 Mar 16;27(3):849-53). Измеряли и сравнивали экспрессию модифицированной мРНК, реакции циркуляризации (неочищенная) и кольцРНК, очищенной с помощью ВЭЖХ с исключением по размеру (чистая), в клетках Jurkat и сравнивали (Фиг. 6A). Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации 60000 клеток с 1 мкг каждого вида РНК.

Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли каждые 24 часа после электропорации 60000 клеток с 1 мкг каждого вида РНК с последующей полной заменой среды. Сравнение данных функциональной стабильности модифицированных мРНК и кольцРНК в клетках Jurkat в течение 3 дней представлено на Фиг. 6B.

IFNγ (Фиг. 7A), IL-6 (Фиг. 7B), IL-2 (Фиг. 7C), RIG-I (Фиг. 7D), IFN-β1 (Фиг. 7E) и TNFα (Фиг. 7F) индукцию транскрипта измеряли через 18 часов после электропорации 60000 клеток Jurkat с 1 мкг каждого вида РНК, описанного выше, и 3p-hpРНК (5'-трифосфатная шпилечная РНК, которая является известным агонистом RIG-I).

ПРИМЕР 11

Экспрессия кольцевой и линейной РНК в моноцитах и макрофагах.

Конструкция, включающая регионы интрона анабаена/экзонов, экспрессионные последовательности люциферазы Gaussia и саливирус FHB IRES были циркулированы. мРНК, включая экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и ~150 нт хвост полиА и модифицированный для замены 100% уридина 5-метоксиуридином (5moU) были приобретены 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 с 1 мкг каждого вида РНК. Люминесценцию также измеряли через 4 дня после электропорации первичных макрофагов человека со сменой среды каждые 24 часа (Фиг. 8C). Различие в люминесценции в каждом случае было статистически значимым ($p < 0,05$).

ПРИМЕР 12

Экспрессия и функциональная стабильность IRES в первичных Т-клетках.

Конструкции, включающие интрон анабаена/области экзонов, экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и подмножество ранее протестированных IRES были циркуляризованы, а продукты реакции были очищены с помощью ВЭЖХ с исключением по размеру. 150000 первичных CD3+ Т-клеток человека подвергали

электропорации с 1 мкг каждой кольцевой РНК. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации (Фиг. 9A). Конструкции вируса Аичи и саливируса A CVB3 IRES давали наибольшую экспрессию через 24 часа.

Люминесценцию также измеряли каждые 24 часа после электропорации в течение 3 дней, чтобы сравнить функциональную стабильность каждой конструкции (Фиг. 9B). Наиболее стабильной оказалась конструкция с саливирус A SZ1 IRES.

ПРИМЕР 13

Экспрессия и функциональная стабильность кольцевой и линейной РНК в первичных Т-клетках и МКПК.

Конструкции, включающая регионы интрона анабаена/экзонов, экспрессионные последовательности люциферазы Gaussia и саливирус A SZ1 IRES и саливирус FHB IRES были циркулированы. мРНК, включая экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и ~150нт хвост полиА и модифицированный для замены 100% уридина 5-метоксиуридином (5moU) и были приобретены у Trilink. Экспрессию кольцевой и модифицированной мРНК саливирус A SZ1 IRES, очищенной с помощью ВЭЖХ, измеряли в первичных CD3+ Т-клетках человека. Экспрессию саливирус FHB, очищенной ВЭЖХ кольцевой, неочищенной кольцевой и модифицированной мРНК, измеряли в МКПК человека. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации 150000 клеток с 1 мкг каждого вида РНК. Данные для первичных Т-клеток человека представлены на Фиг. 10A и 10B, а данные для МКПК представлены на Фиг. 10C. Различие в экспрессии между очищенной кольцевой РНК и неочищенной кольцевой РНК или линейной РНК было значительным в каждом случае ($p < 0,05$).

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. 10B. Разница в относительной люминесценции по результатам измерений на 1-й день между очищенной кольцевой РНК и линейной РНК была значимой как на 2-й, так и на 3-й день для первичных Т-клеток.

ПРИМЕР 14

Эффективность циркуляризации по сайту перестановки в интроне анабаена.

Получали конструкции РНК, включая CVB3 IRES, экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia, интрон анабаена/экзонные области, спейсеры, внутренние дуплексообразующие области и плечи гомологии. Эффективность циркуляризации конструкций с использованием традиционного сайта перестановки интрона анабаена и 5 последовательных сайтов перестановки в P9 измеряли с помощью ВЭЖХ. Хроматограммы ВЭЖХ для 5 последовательных сайтов перестановки в P9 показаны на Фиг. 11A.

Эффективность циркуляризации измеряли в различных местах перестановки.

Эффективность циркуляризации определяли как площадь под кривой хроматограммы ВЭЖХ для каждого из: кольцРНК/(кольцРНК+предшественник РНК). Ранжированная количественная оценка эффективности циркуляризации в каждом сайте перестановки показана на Фиг. 11B. 3 сайта перестановки (показаны на Фиг. 11B) были выбраны для дальнейшего исследования.

Кольцевую РНК в этом примере циркулировали с помощью транскрипции in vitro (IVT), а затем очищали с помощью центрифужной колонки. Эффективность циркуляризации для всех конструкций, вероятно, была бы выше, если бы была включена дополнительная стадия 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 те, которые кодируют химерные антигенные рецепторы.

ПРИМЕР 15

Эффективность циркуляризации альтернативных интронов.

Была создана РНК-предшественник, содержащая пермутированный интрон группы 1 различного видового происхождения или сайта перестановки и несколько константных элементов, включая: CVB3 IRES, экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia, спейсеры, внутренние дуплексообразующие области и плечи гомологии. Данные о циркулизации можно найти на Фиг. 12. Фиг. 12A показывает хроматограммы, разделяющие предшественник, кольцРНК и интроны. На фиг. 12B представлена ранжированная количественная оценка эффективности циркуляризации, основанная на хроматограммах, показанных на Фиг. 12A, в зависимости от конструкции интрона.

Кольцевую РНК в этом примере циркулировали с помощью транскрипции in vitro (IVT), очищали с помощью очистки на центрифужной колонке. Эффективность циркуляризации для всех конструкций, вероятно, была бы выше, если бы была включена дополнительная стадия инкубации с Mg^{2+} и гуанозиновым нуклеотидом; однако удаление этой стадии позволяет сравнить и оптимизировать конструкции кольцевой РНК. Этот уровень оптимизации особенно полезен для поддержания высокой эффективности циркуляризации с большими конструкциями РНК, такими как те, которые кодируют химерные антигенные рецепторы.

ПРИМЕР 16

Эффективность циркуляризации по наличию или длине гомологического плеча.

Получали конструкции РНК, включая CVB3 IRES, экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia, интрон анабаена/экзонные области, спейсеры, и внутренние дуплексообразующие области. Конструкции, представляющие 3 сайта пермутации интронов анабаена, тестировали с плечами гомологии 30 нт, 25% GC или без плеч гомологии («NA»). Этим конструкциям давали возможность циркуляризироваться без стадии инкубации с Mg^{2+}. Эффективность циркуляризации измеряли и сравнивали. Данные можно найти на Фиг. 13. Эффективность циркуляризации была выше для каждой

конструкции без плеч гомологии. На Фиг. 13A показано количественную ранжированную оценку эффективности циркуляризации; На Фиг. 13B представлены хроматограммы, разделяющие предшественник, кольцРНК и интроны.

Для каждого из 3 сайтов перестановки были созданы конструкции с длиной плеча 10, 20 и 30 нуклеотидов и содержанием GC 25%, 50% и 75%. Эффективность сплайсинга этих конструкций измеряли и сравнивали с конструкциями без плеч гомологии (Фиг. 14). Эффективность сплайсинга определяли как долю свободных интронов по отношению к общей РНК в реакции сплайсинга.

На Фиг. 15A (слева) показаны хроматограммы ВЭЖХ, указывающие на вклад сильных плеч гомологии в улучшенную эффективность сплайсинга. Верх слева: Содержание GC 75%, плечи гомологии 10 нуклеотидов. Центр слева: Содержание GC 75%, плечи гомологии 20 нуклеотидов. Низ слева: Содержание GC 75%, плечи гомологии 30 нуклеотидов.

На Фиг. 15A (справа) показаны хроматограммы ВЭЖХ, указывающие на повышенную эффективность сплайсинга в сочетании с увеличенным разрывом, проявляющимся в виде плеча на пике кольцРНК. Верх справа: Содержание GC 75%, плечи гомологии 10 нуклеотидов. Центр справа: Содержание GC 75%, плечи гомологии 20 нуклеотидов. Низ справа: Содержание GC 75%, плечи гомологии 30 нуклеотидов.

На Фиг. 15B (слева) показаны избранные комбинации сайтов пермутации и плеч гомологии, предположительно демонстрирующие повышенную эффективность циркуляризации.

На Фиг. 15B (справа) показаны избранные комбинации сайтов пермутации и плеч гомологии, предположительно демонстрирующие улучшенную эффективность циркуляризации, обработанные полиA-полимеразой E. coli.

Кольцевую РНК в этом примере циркулировали с помощью транскрипции in vitro (IVT), очищали с помощью очистки на центрифужной колонке. Эффективность циркуляризации для всех конструкций, вероятно, была бы выше, если бы была включена дополнительная стадия 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 те, которые кодируют химерные антигенные рецепторы.

ПРИМЕР 17

Кольцевая РНК, кодирующая химерные антигенные рецепторы.

Конструкции, включающие области интрона/экзона анабаена, экспрессионную последовательность химерного антигенного рецептора (CAR) Kymriah и IRES CVB3, циркуляризировали. 100000 первичных CD3+ Т-клеток человека подвергали электропорации с 500 нг кольцРНК и совместно культивировали в течение 24 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка. Отношение эффектора к мишени (E:T соотношение) 0,75:1. 100.000 первичных CD3+ Т-клеток человека

подвергали имитации электропорации и совместно культивировали в качестве контроля (Фиг. 16).

Наборы из 100.000 первичных CD3+ Т-клеток человека подвергали имитационной электропорации или электропорации с 1 мкг кольцРНК, и затем совместно культивировали в течение 48 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка. E:T соотношение 10:1 (Фиг. 17).

Количественную оценку специфического лизиса клеток-мишеней Raji определяли путем обнаружения люминесценции светлячка (Фиг. 18). 100000 первичных CD3+ Т-клеток человека, подвергнутых имитации электропорации или электропорации с кольцРНК, кодирующей различные последовательности CAR, совместно культивировали в течение 48 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка. % Специфического лизиса определяли как 1-[CAR условие люминисценции]/[имитация условие люминисценции]. E:T соотношение 10:1.

ПРИМЕР 18

Экспрессия и функциональная стабильность кольцевой и линейной РНК в клетках Jurkat и покоящихся Т-клетках человека.

Конструкции, включающие интрон анабаена/области экзонов, экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и подмножество ранее протестированных IRES были циркуляризованы, а продукты реакции были очищены с помощью ВЭЖХ с исключением по размеру. 150000 клеток Jurkat подвергали электропорации с 1 мкг кольцевой РНК или 5 мкЕд-мРНК. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации (Фиг. 19A слева). 150000 покоящихся первичных CD3+ Т-клеток человека (через 10 дней после стимуляции) подвергали электропорации с 1 мкг кольцевой РНК или 5 мкЕд мРНК. Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 24 часа после электропорации (Фиг. 19A справа).

Люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли каждые 24 часа после электропорации с последующей полной заменой среды. Данные функциональной стабильности показаны на Фиг. 19B. Циркулярная 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 линейной РНК или различными конструкциями кольцевой РНК.

Конструкции, включающие интрон анабаена/области экзонов, экспрессионную последовательность люциферазы Gaussia и подмножество ранее протестированных IRES были циркуляризованы, а продукты реакции были очищены с помощью ВЭЖХ с исключением по размеру. 150 000 CD3+ Т-клеток человека подвергали электропорации с 1 мкг кольцевой РНК, 5moU-мРНК или иммуностимулирующего положительного контроля

полиинозин:цитозин. IFN-β1 (Фиг. 20A), RIG-I (Фиг. 20B), IL-2 (Фиг. 20C), IL-6 (Фиг. 20D), IFN-γ (Фиг. 20E) и TNF-α (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 мишенями, клетками, экспрессирующими CAR, при разных E:T отношениях.

Конструкции, включающие интрон анабаена/области экзонов, экспрессионную последовательность анти-CD19 CAR и CVB3 IRES циркулировали, а продукты реакции очищали с помощью ВЭЖХ с исключением по размеру. 150000 первичных CD3+ Т-клеток человека, подвергнутых имитации электропорации или электропорации с различными количествами кольцРНК, кодирующей последовательность анти-CD19 CAR, совместно культивировали в течение 12 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими GFP и люциферазу светлячка, при соотношении E:T 2:1. Специфический лизис клеток-мишеней Raji определяли путем обнаружения люминесценции светлячка (Фиг. 21A). % специфического лизиса определяли как 1-[люминесценция в условиях CAR]/[люминесценция в условиях имитации]. Индукцию транскрипта IFNγ измеряли через 24 часа после электропорации (Фиг. 21B).

150.000 первичных CD3+ Т-клеток человека подвергали либо имитационной электропорации, либо электропорации с 500 нг кольцРНК или m1ψ-мРНК, кодирующей последовательность анти-CD19 CAR, затем совместно культивировали в течение 24 часов с клетками Raji, стабильно экспрессирующими люциферазу светлячка при различных соотношениях E:T. Специфический лизис клеток-мишеней Raji определяли путем обнаружения люминесценции светлячка (Фиг. 22A). Специфический лизис определяли как 1-[люминесценция в условиях CAR]/[люминесценция в условиях имитации].

Т-клетки, экспрессирующие CAR, также совместно культивировали в течение 24 часов с клетками Raji или K562, стабильно экспрессирующими люциферазу светлячка при различных E:T отношениях. Специфический лизис клеток-мишеней Raji или клеток K562, не являющихся мишенями, определяли путем обнаружения люминесценции светлячка (Фиг. 22B). % специфического лизиса определяли как 1-[люминесценция в условиях CAR]/[люминесценция в условиях имитации].

ПРИМЕР 21

Специфический лизис клеток-мишеней Т-клетками, электропорированными кольцевой РНК или линейной РНК, кодирующей CAR.

Конструкции, включающие интрон анабаена/области экзонов, экспрессионную последовательность анти-CD19 CAR и CVB3 IRES циркулировали, а продукты реакции очищали с помощью ВЭЖХ с исключением по размеру. Первичные CD3+ Т-клетки человека подвергали электропорации с 500 нг кольцевой РНК или эквимолярным количеством m1ψ-мРНК, каждая из которых кодирует CAR, нацеленный на CD19. Клетки

Raji добавляли к культурам клеток CAR-T в течение 7 дней при E:T соотношение 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 анти-CD19 CAR или анти-BCMA CAR.

Конструкции, включающие интрон анабаена/области экзонов, экспрессионную последовательность анти-CD19 или анти-BCMA CAR, и CVB3 IRES циркулировали, а продукты реакции очищали с помощью ВЭЖХ с исключением по размеру. 150000 первичных CD3+ Т-клеток человека подвергали электропорации с 500 нг кольцРНК, и затем совместно культивировали с клетками Raji при E:T соотношение 2:1. % Специфического лизиса измеряли через 12 часов после электропорации (Фиг. 24).

ПРИМЕР 23

Экспрессия, функциональная стабильность и индукция транскриптов цитокинов кольцевых и линейных РНК, экспрессирующих антигены.

Конструкции, включающие одну или более последовательностей экспрессии антигена, циркуляризируют, а продукты реакции очищают с помощью ВЭЖХ с исключением по размеру. Антигенпредставляющие клетки подвергают электропорации с кольцевой РНК или мРНК.

Продукцию антигена in vitro измеряли с помощью ИФА. При необходимости продукцию антигена измеряли каждые 24 часа после электропорации. Индукцию или высвобождение цитокинового транскрипта измеряли через 18 часов после электропорации антигенпрезентирующих клеток с кольцевыми или линейными РНК, кодирующими антигены. Тестируемые цитокины могут включать IFN-β1, RIG-I, IL-2, IL-6, IFNγ, RANTES и TNFα.

Продукцию антигена in vitro и индукцию цитокинов измеряли с использованием очищенной кольцРНК, очищенной кольцРНК плюс антисмысловая кольцРНК и неочищенной кольцРНК, чтобы найти соотношение, которое наилучшим образом сохраняет экспрессию и иммунную стимуляцию.

ПРИМЕР 24

Экспрессия антигена и антитела in vivo на животных моделях.

Чтобы оценить способность кольцРНК, кодирующих антиген, способствовать экспрессии антигена и выработке антител in vivo, мышам посредством внутримышечной инъекции вводили возрастающие дозы РНК, кодирующей один или более антигенов.

Мышам делали однократную инъекцию, собирали кровь через 28 дней, затем делали инъекцию снова, и собирали кровь через 14 дней после этого. Уровень нейтрализующих антител к представляющему интерес антигену измеряли с помощью ИФА.

ПРИМЕР 25

Защита от инфекции.

Для оценки способности кольцРНК, кодирующей антиген, защищать от инфекции или лечить ее, РНК, кодирующую один или более антигенов вируса (например, гриппа),

вводят мышам посредством внутримышечной инъекции.

Мыши получают первоначальную инъекцию и бустерные инъекции кольцРНК, кодирующей один или более антигенов. Защита от вируса, такого как грипп, определяется потерей массы тела и смертностью в течение 2 недель.

ПРИМЕР 26

Пример 26A: Синтез соединений

Синтез репрезентативных ионизируемых липидов по изобретению описан в заявках PCT 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 20190314284, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

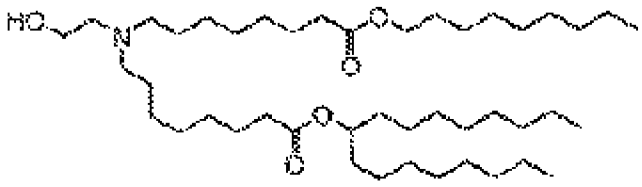
Пример 26B: Синтез соединений

Синтез репрезентативных ионизируемых липидов по изобретению описан в патентной публикации США номер US20170210697A1, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ПРИМЕР 27

Экспрессия белка по органам

Получали кольцевую или линейную РНК, кодирующую FLuc, и загружали в переносчики со следующим составом: 50% ионизируемых липидов 10b-15, представленных

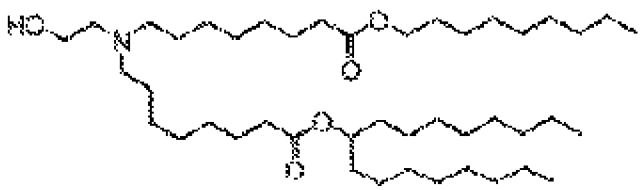


, 10% DSPC, 1,5% ПЭГ-ДМГ, 38,5% холестерина. Мышам CD-1 вводили дозу 0,2 мг/кг и люминесценцию измеряли через 6 часов (живой IVIS) и 24 часа (живой IVIS и ex vivo IVIS). Измеряли общий поток (фотоны/секунду над интересующей областью) печени, селезенки, почек, легких и сердца (Фиг. 25 и 26).

ПРИМЕР 28

Распределение экспрессии в селезенке

Получали кольцевую или линейную РНК, кодирующую GFP, и загружали в переносчики со следующим составом: 50% ионизируемых липидов 10b-15, представленных



, 10% DSPC, 1,5% ПЭГ-ДМГ, 38,5%

холестерина. Композицию вводят мышам CD-1. Проточная цитометрию проводили на клетках селезенки для определения распределения экспрессии по типам клеток.

ПРИМЕР 29

ПРИМЕР 29A: Производство композиций наночастиц

Для исследования безопасности и эффективности композиций наночастиц для доставки кольцевой РНК в клетки готовили и тестировали ряд составов. В частности, оптимизировали конкретные элементы и их соотношения в липидном компоненте композиций наночастиц.

Наночастицы могут быть получены в 1 потоке жидкости или с помощью способов смешивания, таких как микрофлюидика и Т-образное смешивание двух потоков жидкости, один из которых содержит кольцевую РНК, а другой - липидные компоненты.

Липидные композиции получали путем объединения ионизируемого липида, необязательно вспомогательного липида (такого как DOPE, DSPC или олеиновая кислота, поставляемая Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), липида ПЭГ (такого как 1,2-димиристоил-sn-глицерин метоксиполиэтиленгликоль, также известный как ПЭГ-DMG, поставляемый Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), и структурного липида, такого как холестерин, в концентрациях около, например, 40 или 50 мМ в растворителе, например, этаноле. Растворы следует хранить в холодильнике при температуре, например, -20 °C. Липиды объединяют для получения желаемых молярных соотношений (см., например, Таблицы 11a и 11b ниже) и разбавляют водой и этанолом до конечной концентрации липидов, например, от около 5,5 мМ до около 25 мМ.

Таблица 11a

Номер состава	Описание
1	Аликвоты спиртовых растворов 50 мг/мл C12-200, DOPE, Chol и DMG-PEG2K (40:30:25:5) перемешали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) кольцРНК полученный из 1 мг/мл маточного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор кольцРНК и перемешали до получения конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц отфильтровали, диафильтровали 1× ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8 °C.
2	Аликвоты спиртовых растворов 50 мг/мл DODAP, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (18:56:20:6) перемешали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) EPO кольцРНК полученный из 1 мг/мл маточного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор

	кольцРНК и перемешали до получения конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц отфильтровали, диафильтровали 1× ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8 °C. Конечная концентрация=1,35 мг/мл EPO кольцРНК (инкапсулированная). Zave=75,9 нм (Dv(50)=57,3 нм; Dv(90)=92,1 нм).
3	Аликвоты спиртовых растворов 50 мг/мл HGT4003, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (50:25:20:5) перемешали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) кольцРНК полученный из 1 мг/мл маточного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор кольцРНК и перемешали до получения конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц отфильтровали, диафильтровали 1× ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8 °C.
4	Аликвоты спиртовых растворов 50 мг/мл ICE, DOPE и DMG-PEG2K (70:25:5) перемешали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) кольцРНК полученный из 1 мг/мл маточного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор кольцРНК и перемешали до получения конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц отфильтровали, диафильтровали 1× ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8 °C.
5	Аликвоты спиртовых растворов 50 мг/мл HGT5000, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (40:20:35:5) перемешали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) EPO кольцРНК полученный из 1 мг/мл маточного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор кольцРНК и перемешали до получения конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц отфильтровали, диафильтровали 1× ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8 °C. Конечная концентрация=1,82 мг/мл EPO мРНК (инкапсулированная). Zave=105,6 нм (Dv(50)=53,7 нм; Dv(90)=157 нм).
6	Аликвоты спиртовых растворов 50 мг/мл HGT5001, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (40:20:35:5) перемешали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) EPO кольцРНК полученный из 1 мг/мл

	маточного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор кольцРНК и перемешали до получения конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц отфильтровали, диафильтровали 1× ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8 °C.
7	Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов HGT5001, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (35:16:46,5:2,5) смешивали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) EPO кольцРНК полученный из 1 мг/мл маточного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор кольцРНК и перемешали до получения конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц отфильтровали, диафильтровали 1× ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8 °C.
8	Аликвоты 50 мг/мл этанольных растворов HGT5001, DOPE, холестерина и DMG-PEG2K (40:10:40:10) смешивали и разбавляли этанолом до конечного объема 3 мл. Отдельно готовили водный забуференный раствор (10 мМ цитрат/150 мМ NaCl, pH 4,5) EPO кольцРНК полученный из 1 мг/мл маточного раствора. Липидный раствор быстро вводили в водный раствор кольцРНК и перемешали до получения конечной суспензии в 20% этаноле. Полученную суспензию наночастиц отфильтровали, диафильтровали 1× ФСБ (pH 7,4), концентрировали и хранили при 2-8 °C.

В некоторых вариантах реализации переносчик имеет состав, как описано в Таблице 11a.

Таблица 11b

Состав (% мол.)	Компоненты
40:20:38,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
45:15:38,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
50:10:38,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
55:5:38,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
60:5:33,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG

45:20:33,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
50:20:28,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
55:20:23,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
60:20:18,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
40:15:43,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
50:15:33,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
55:15:28,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
60:15:23,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
40:10:48,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
45:10:43,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
55:10:33,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
60:10:28,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
40:5:53,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
45:5:48,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
50:5:43,5:1,5	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
40:20:40:0	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
45:20:35:0	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG

50:20:30:0	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
55:20:25:0	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
60:20:20:0	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG
40:15:45:0	Соединени:Фосфолипид:Фитостерол*:ПЭГ-DMG

В некоторых вариантах реализации переносчик имеет состав, как описано в Таблице 11b.

Для композиций наночастиц, включающих кольцРНК, растворы кольцРНК в концентрации 0,1 мг/мл в деионизированной воде разбавляют буфером, например, 50 мМ цитратно-натриевым буфером при pH от 3 до 4, с образованием исходного раствора. В качестве альтернативы растворы кольцРНК в концентрации 0,15 мг/мл в деионизированной воде разбавляли буфером, например, 6,25 мМ буфером ацетата натрия при pH от 3 до 4,5, с образованием исходного раствора.

Композиции наночастиц, включающие кольцевую РНК и липидный компонент, получали путем объединения липидного раствора с раствором, включающим кольцевую РНК при липидный компонент к кольцевая РНК отношении масс:масс. между около 5:1 и около 50:1. Липидный раствор быстро вводили, используя, например, микрофлюидную систему NanoAssemblr со скоростью потока около 10 мл/мин и около 18 мл/мин или около 5 мл/мин и около 18 мл/мин в раствор кольцРНК для получения суспензии с соотношением воды и этанола около 1:1 и около 4:1.

Композиции наночастиц могут быть обработаны диализом для удаления этанола и замены буфера. Составы подвергали диализу дважды против фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7,4, в объемах, в 200 раз превышающих объемы первичного продукта, с использованием кассет Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс) с порогом молекулярной массы 10 кДа или 20 кДа. Затем составы подвергали диализу в течение ночи при 4°C. Полученную суспензию наночастиц фильтровали через стерильные фильтры 0,2 мкм (Sarstedt, Nümbrecht, Германия) в стеклянные флаконы и закупоривали обжимными крышками. Получали в общем растворы состава наночастиц 0,01 мг/мл до 0,15 мг/мл.

Описанный выше способ вызывает наноосаждение и образование частиц.

Для достижения такого же наноосаждения можно использовать альтернативные способы, включая Т-образный переход и прямой впрыск, но не ограничиваясь ими. В. Характеристика композиций наночастиц

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания) можно использовать для определения размера частиц, индекса полидисперсности (PDI) и

дзета-потенциала композиций наночастиц в 1×ФСБ при определении размера частиц и 15 мМ ФСБ при определении дзета-потенциала.

Ультрафиолетово-видимая спектроскопия может быть использована для определения концентрации кольцРНК в композициях наночастиц. 100 мкл разбавленного состава в 1×ФСБ добавляли к 900 мкл 4:1 (v/v) смесь метанола и хлороформа. После смешивания регистрировали спектр поглощения раствора, например, между 230 нм и 330 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Брэа, Калифорния). Концентрация кольцРНК в композиции наночастиц может быть рассчитана на основе коэффициента экстинкции кольцРНК, используемой в композиции, и разницы между поглощением при длине волны, например, 260 нм, и исходным значением при длине волны, для например, 330 нм.

Анализ РНК QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) можно использовать для оценки инкапсуляции кольцРНК композицией наночастиц. Образцы разбавляли до концентрации около 5 мкг/мл или 1 мкг/мл в буферном растворе ТЕ (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5). 50 мкл разведенных образцов переносили в полистироловый 96-луночный планшет и в лунки добавляют либо 50 мкл ТЕ-буфера, либо 50 мкл 2-4%-ного раствора Тритона X-100. Планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 15 минут. Реактив RIBOGREEN® разводили 1:100 или же 1:200 в буфере ТЕ и в каждую лунку добавляли по 100 мкл этого раствора. Интенсивность флуоресценции можно измерить с помощью флуоресцентного планшетного ридера (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, Массачусетс) при длине волны возбуждения, например, около 480 нм, и при длине волны испускания, например, около 520 нм. Значения флуоресценции холостой пробы реагента вычитают из значений каждого из образцов и определяют процент свободной кольцРНК путем деления интенсивности флуоресценции интактного образца (без добавления Тритона X-100) на значение флуоресценции разрушенного образца (вызвано добавлением Тритон X-100). С.

ПРИМЕР 29B: Исследования составов in vivo

Чтобы контролировать, насколько эффективно различные композиции наночастиц доставляют кольцРНК к клеткам-мишеням, готовили и вводили популяциям грызунов различные композиции наночастиц, включая кольцРНК. Мышам внутривенно, внутримышечно, внутриартериально или внутриопухолево вводили разовую дозу, включающую композицию наночастиц с составом липидных наночастиц. В некоторых случаях мышей можно заставить вдыхать дозы. Размеры доз могут варьироваться от 0,001 мг/кг до 10 мг/кг, где 10 мг/кг описывает дозу, включающую 10 мг кольцРНК в составе наночастиц на каждый 1 кг массы тела мыши. Также можно использовать контрольную композицию, включающую ФСБ.

При введении композиций наночастиц мышам профили доставки дозы, ответ на дозу и токсичность конкретных составов и их доз можно измерить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), 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, включающей кольцевую РНК, будут свидетельствовать о более высокой степени трансляции кольцевой РНК, и/или эффективности доставки кольцРНК композиции 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 кольцРНК с помощью данной композиции наночастиц по сравнению с другими композициями наночастиц или их отсутствие.

ПРИМЕР 30

Характеристика композиций наночастиц

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания) можно использовать для определения размера частиц, индекса полидисперсности (PDI) и дзета-потенциала композиций переносчиков в 1×ФСБ при определении размера частиц и 15 мМ ФСБ при определении дзета-потенциала.

Ультрафиолетово-видимая спектроскопия может быть использована для определения концентрации терапевтического средства и/или профилактического средства (например, кольцРНК) в композициях переносчиков. 100 мкл разбавленного состава в 1×ФСБ добавляли к 900 мкл 4:1 (v/v) смесь метанола и хлороформа. После смешивания регистрировали спектр поглощения раствора, например, между 230 нм и 330 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Брэа, Калифорния). Концентрация терапевтического средства и/или профилактического средства в композиции переносчика может быть рассчитана на основе коэффициента экстинкции терапевтического средства и/или профилактического средства, используемого в композиции, и разницы между поглощением при длине волны, например, 260 нм, и исходным значением при длине волны, для например, 330 нм.

Для композиций переносчика, включающих РНК, можно использовать анализ РНК QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) для оценки инкапсуляции РНК композицией переносчика. Образцы разбавляли до концентрации около 5 мкг/мл или 1 мкг/мл в буферном растворе ТЕ (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5). 50 мкл разведенных образцов переносили в полистироловый 96-луночный планшет и в лунки добавляют либо 50 мкл ТЕ-буфера, либо 50 мкл 2-4%-ного раствора Тритона X-100. Планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 15 минут. Реактив RIBOGREEN® разводили 1:100 или же 1:200 в буфере ТЕ и в каждую лунку добавляли по 100 мкл этого раствора. Интенсивность флуоресценции можно измерить с помощью флуоресцентного планшетного ридера (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, Массачусетс) при длине волны возбуждения, например, около 480 нм, и при длине волны испускания, например, около 520 нм. Значения флуоресценции холостой пробы реагента вычитают из значений каждого из образцов и определяют процент свободной РНК путем

деления интенсивности флуоресценции интактного образца (без добавления Тритона X-100) на значение флуоресценции разрушенного образца (вызвано добавлением Тритон X-100).

ПРИМЕР 31

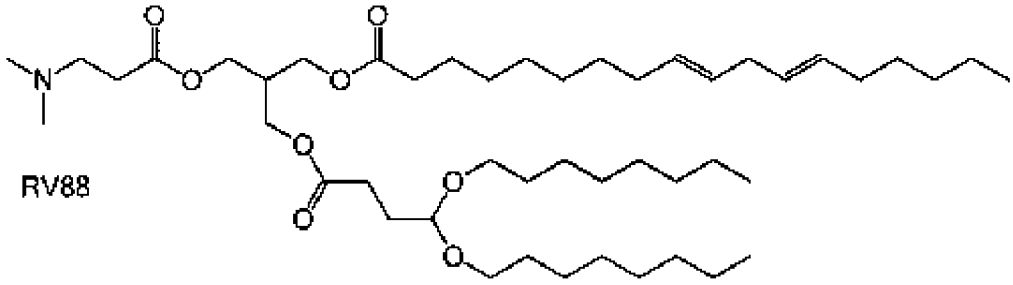
Нацеливание на Т-клетки

Для нацеливания переносчиков на Т-клетки связывающие антигены Т-клеток, например, анти-CD8-антитела, соединяют с поверхностью переносчика. Антитела к Т-клеточному антигену слегка восстанавливали избытком DTT в присутствии EDTA в ФСБ, чтобы обнажить тиолы свободной шарнирной области. Для удаления ДТТ антитела пропускали через обессоливающую колонку. Гетеробифункциональный сшивающий агент SM(ПЭГ)24 использовали для закрепления антител на поверхности переносчиков, нагруженных кольцРНК (аминогруппы присутствуют в головных группах липидов ПЭГ, свободные тиоловые группы на антителах были созданы с помощью DTT, SM(ПЭГ)24 связывает аминогруппы и тиоловые группы поперечными связями). Переносчики сначала инкубировали с избытком SM(ПЭГ)24 и центрифугировали для удаления непрореагировавшего сшивающего агента. Активированные переносчики затем инкубировали с избытком восстановленного антитела к Т-клеточному антигену. Несвязавшееся антитело удаляли с помощью устройства центробежного фильтрования.

ПРИМЕР 32

РНК, содержащая переносчик, с использованием RV88.

В этом примере РНК, содержащие переносчики, синтезировали с использованием 2-D вихревого микрожидкостного чипа с катионным липидом RV88 для доставки кольцРНК.



RV88

Таблица 12a

Материалы и Инструменты	Поставщик	Номер в каталоге
1M Трис-HCl, pH 8,0 Стерильный	Teknova	T1080
5M раствор хлорида натрия	Teknova	S0250
QB цитратный буфер, pH 6,0 (100 мМ)	Teknova	Q2446
Вода свободная от нуклеазы	Ambion	AM9937
Тритон X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100mL
RV88	GVK Bio	

DSPC	Lipoid	556500
Холестерин	Sigma	C3045-5G
ПЭГ2К	Avanti Polar Lipids	880150
Этанол	Acros Organic	615090010
5 мл виалы из боросиликатного стекла	Thermo Scientific	ST5-20
PD Mini Trap G-25 обессоливающие колонки	GE Healthcare	VWR #95055-984
Набор для анализа РНК Quanti-iT RiboGreen	Molecuar Probes/Life Technologies	R11490
Черные 96-луночные планшеты	Greiner	655900

RV88, DSPC и холестерин готовили в этаноле при концентрации 10 мг/мл в боросиликатных флаконах. Липид 14:0-PEG2K PE готовят в концентрации 4 мг/мл также во флаконе из боросиликатного стекла. Растворение липидов в исходных концентрациях достигали путем обработки липидов ультразвуком в этаноле в течение 2 мин. Затем растворы нагревали на орбитальном шейкере с наклоном при 170 об/мин при 37 °C в течение 10 мин. Затем флаконы уравновешивали при 26°C в течение как минимум 45 мин. Затем липиды смешивали, добавляя объемы маточного липида, как показано в Таблице 12b. Затем раствор доводили этанолом до конечной концентрации липидов 7,92 мг/мл.

Таблица 12b

Состав	М.м.	%	нмоль	мг	Исходный 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	
ПЭГ2К	2693,3	2%	360	0,97	4	242,4	

РНК готовили в виде исходного раствора с 75 мМ цитратным буфером при pH 6,0 и концентрации РНК при 1,250 мг/мл. Затем концентрацию РНК доводили до 0,1037 мг/мл с помощью 75 мМ цитратного буфера при pH 6,0, уравновешивая при 26 °C. Затем раствор инкубировали при 26 °C в течение как минимум 25 мин.

Микрожидкостную камеру очищали этанолом и готовили шприцевые насосы neMYSIS, загружая шприц с раствором РНК и другой шприц с этаноловым липидом. Оба шприца загружали и находились под управлением программного обеспечения neMESYS. Затем растворы наносили на смесительный чип при соотношении водной к органической

фаз 2 и общей скорости потока 22 мл/мин (14,67 мл/мин для РНК и 7,33 мл/мин для липидного раствора. Оба насоса запускали синхронно. Смешанный раствор, вытекающий из микрофлюидного чипа, собиралит фракциями 4×1 мл, причем первую фракцию выбрасывалит как отходы. Оставшийся раствор, содержащий РНК-липосомы, обменивали с использованием мини-колонок для обессоливания G-25 на 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА при pH 7,5. После замены буфера материалы характеризовали по размеру и захвату РНК с помощью анализа DLS и анализа Ribogreen соответственно.

ПРИМЕР 33

РНК, содержащая переносчик, с использованием RV94.

В данном примере РНК, содержащие липосомы, синтезировали с использованием 2-D вихревого микрожидкостного чипа с катионным липидом RV94 для доставки кольцРНК.

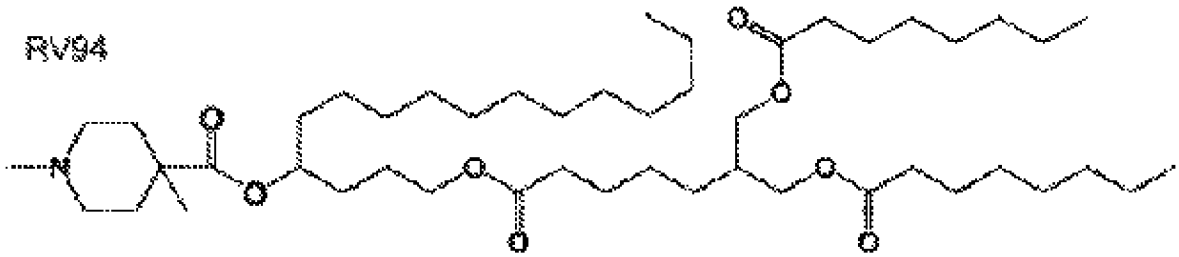


Таблица 13

Материалы и Инструменты	Поставщик	Номер в каталоге
1M Трис-HCl, pH 8,0 Стерильный	Teknova	T1080
5M раствор хлорида натрия	Teknova	S0250
QB цитратный буфер, pH 6,0 (100 мМ)	Teknova	Q2446
Вода свободная от нуклеазы	Ambion	AM9937
Тритон X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100mL
RV94	GVK Bio	
DSPC	Lipoid	556500
Холестерин	Sigma	C3045-5G
ПЭГ2К	Avanti Polar Lipids	880150
Этанол	Acros Organic	615090010
5 мл виалы из боросиликатного стекла	Thermo Scientific	ST5-20

PD Mini Trap G-25 обессоливающие колонки	GE Healthcare	VWR #95055-984
Набор для анализа РНК Quanti-iT RiboGreen	Molecuar Probes/Life Technologies	R11490
Черные 96-луночные планшеты	Greiner	655900

Липиды были получены, как в Примере 29, с использованием количеств материалов, указанных в Таблице 14, до конечной концентрации липидов 7,92 мг/мл.

Таблица 14

Состав	М.м.	%	нмоль	мг	Исходный 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	
ПЭГ2К	2693,3	2%	144	0,39	4	97,0	

Водный раствор кольцРНК готовили в виде исходного раствора с 75 мМ цитратным буфером при pH 6,0, кольцРНК при 1,250 мг/мл. Затем концентрацию РНК доводили до 0,1037 мг/мл с помощью 75 мМ цитратного буфера при pH 6,0, уравновешивая при 26 °C. Затем раствор инкубировали при 26 °C в течение как минимум 25 мин.

Микрожидкостную камеру очищали этанолом и готовили шприцевые насосы neMYSIS, загружая шприц с раствором РНК и другой шприц с этаноловым липидом. Оба шприца загружали и находились под управлением программного обеспечения neMESYS. Затем растворы наносили на смесительный чип при соотношении водной к органической фаз 2 и общей скорости потока 22 мл/мин (14,67 мл/мин для РНК и 7,33 мл/мин для липидного раствора. Оба насоса запускали синхронно. Смешанный раствор, вытекающий из микрофлюидного чипа, собиралит фракциями 4×1 мл, причем первую фракцию выбрасывалит как отходы. Оставшийся раствор, содержащий кольцРНК-переносчики, обменивали с использованием мини-колонок для обессоливания G-25 на 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА при pH 7,5, как описано выше. После замены буфера материалы характеризовали по размеру и захвату РНК с помощью анализа DLS и анализа Ribogreen соответственно. Биофизический анализ липосом показан в Таблице 15.

Таблица 15

Название образца	Соотношение N:P	TFR	Соотношение	Количество инкапсулированной РНК	Выход инкапсулированной РНК	Размер

		Мл/мин	(водная/ органическая фаза)	(мкг/мл)	%	Д. нм	PDI
SAM-RV94	8	22	2	31,46	86,9	113,1	0,12

ПРИМЕР 34

Общий протокол для смешивания в потоке.

Готовили индивидуальные и отдельные исходные растворы, один из которых содержит липид, а другой - кольцРНК. Липидный раствор, содержащий желаемый липид или смесь липидов, DSPC, холестерин и липид ПЭГ, готовили растворением в 90% этаноле. Остальные 10% представляли собой цитратный буфер с низким pH. Концентрация исходного раствора липида составляла 4 мг/мл. pH этого цитратного буфера может варьироваться от pH 3 до pH 5, в зависимости от типа используемого липида. кольцРНК также растворяли в цитратном буфере при концентрации 4 мг/мл. Готовили по 5 мл каждого маточного раствора.

Исходные растворы были полностью прозрачны, а липиды были полностью солюбилизированы перед объединением с кольцРНК. Исходные растворы можно нагревать до полного растворения липидов. кольцРНК, используемые в этом способе, могут представлять собой немодифицированные или модифицированные олигонуклеотиды и могут быть конъюгированы с липофильными остатками, такими как холестерин.

Отдельные исъодные растворы объединяли путем перекачки каждого раствора в Т-образное соединение. Двойной насос Watson-Marlow использовался для одновременного управления запуском и остановкой двух потоков. Полипропиленовая трубка диаметром 1,6 мм была дополнительно уменьшена до 0,8 мм, чтобы увеличить линейную скорость потока. Полипропиленовая линия (ID=0,8 мм) крепилась к любой стороне Т-образного соединения. Полипропилен Т имел линейную кромку 1,6 мм для результирующего объема 4,1 $мм^3$. Каждый из больших концов (1,6 мм) полипропиленовой линии помещали в пробирки, содержащие либо солюбилизированный исходный раствор липидов, либо солюбилизированную кольцРНК. После Т-образного соединения размещали одну трубку, где выходил объединенный поток. Затем трубку подавали в контейнер с 2-кратным объемом ФСБ, который быстро перемешивали. Скорость потока насоса устанавливали на 300 об/мин или 110 мл/мин. Этанол удаляли и заменяли на ФСБ диализом. Липидные составы затем концентрировали с помощью центрифугирования или диафильтрования до соответствующей рабочей концентрации.

C57BL/6 мыши (Charles River Labs, Массачусетс) получали либо физиологический раствор, либо составленую кольцРНК посредством инъекции в хвостовую вену. В различные моменты времени после введения образцы сыворотки собирали ретроорбитальным кровотечением. Уровни белка фактора VII в сыворотке определяли в образцах с использованием хромогенного анализа (Biophen FVTI, Aniara Corporation,

Охайо). Для определения уровней РНК фактора VII в печени животных умервщляли, печень собирали и быстро замораживали в жидком азоте. Тканевые лизаты готовили из замороженных тканей, и уровни РНК фактора VII в печени определяли количественно, используя анализ разветвленной ДНК (QuantiGene Assay, Panomics, Калифорния).

Активность FVII оценивали у животных, получавших миРНК FVTI, через 48 часов после внутривенной (болюсной) инъекции в C57BL/6 мышей. Уровень FVII измеряли с использованием имеющегося в продаже набора для определения уровня белка в сыворотке или ткани в соответствии с инструкциями производителя в масштабах микропланшетов. Снижение уровня FVII определяли по сравнению с необработанными контрольными мышами, и результаты выражали как % Остаточного FVII. Два уровня дозы (0,05 и 0,005 мг/кг миРНК FVII) использовали при скрининге каждой новой липосомной композиции.

ПРИМЕР 36

Состав кольцРНК с использованием предварительно сформированных везикул.

Переносчики, содержащие катионный липид, изготавливали с использованием способа предварительно сформированных везикул. Катионный липид, DSPC, холестерин и ПЭГ-липид растворяли в этаноле при молярном соотношении 40/10/40/10, соответственно. Смесь липидов добавляли к водному буферу (50 мМ цитрата, pH 4) при перемешивании до конечной концентрации этанола и концентрации липидов 30% (об./об.) и 6,1 мг/мл соответственно, и перед экструзией давали уравновеситься при комнатной температуре в течение 2 мин. Гидратированные липиды экструдировали через два расположенных друг над другом фильтра с размером пор 80 нм (Nuclepore) при 22°C с использованием экструдера Lipex (Northern Lipids, Ванкувер, Британская Колумбия) до тех пор, пока диаметр везикул не становился равным 70-90 нм, как определено 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.

кольцРНК FVII (солюбилизированную в 50 мМ цитрате, водном растворе с pH 4, содержащем 30% этанола) добавляли к везикулам, предварительно уравновешенным при 35°C, со скоростью ~ 5мл/мин с перемешиванием. После того как достигали целевого соотношения кольцРНК/липид 0,06 (масс. масс.) смесь инкубировали еще 30 мин при 35°C, чтобы обеспечить реорганизацию везикул и инкапсуляцию РНК FVII. Затем этанол удаляли и внешний буфер заменяли ФСБ (155 мМ NaCl, 3 мМ Na2HP04, ImM KH2P04, pH 7,5) либо диализом, либо диафильтрацией с тангенциальным потоком. Окончательное соотношение инкапсулированной кольцРНК к липиду определяли после удаления неинкапсулированной РНК с использованием спин-колонок с эксклюзионным размером или ионообменных спин-колонок.

ПРИМЕР 37

ПРИМЕР 37А: Экспрессия триспецифических антигенсвязывающих белков из сконструированной кольцевой РНК

Кольцевые РНК включают: (1) фрагмент 3'-конца интрона группы I после сплайсинга; (2) внутренний сайт входа в рибосому (IRES); (3) область, кодирующую триспецифический антигенсвязывающий белок; и (4) 3'-область гомологии. Участки триспецифического антигенсвязывающего белка конструировали для получения типичного триспецифического антигенсвязывающего белка, который будет связываться с антигеном-мишенью, например, GPC3.

ПРИМЕР 37B: Генерация домена связывания scFv CD3

Каноническая последовательность эпсилон-цепи CD3-человека имеет номер доступа Uniprot P07766. Каноническая последовательность гамма-цепи CD3 человека имеет номер доступа Uniprot P09693. Каноническая последовательность дельта-цепи CD3 человека имеет номер доступа Uniprot P043234. Антитела к CD3эпсилон, CD3гамма или CD3дельта генерировали с помощью известных технологий, таких как созревание аффинности. Когда в качестве исходного материала использовали антитела к CD3 мыши, гуманизация антител к CD3 мыши желательна для клинических условий, когда специфичные для мышей остатки могут индуцировать ответ человека против мышиного антигена (HAMA) у субъектов, получающих лечение триспецифическим антигенсвязывающим белком, описанным в данном документе. Гуманизация достигается путем прививки CDR-областей анти-CD3-антитела мыши на соответствующие каркасы акцептора зародышевой линии человека, необязательно включая другие модификации в CDR и/или каркасные области.

Поэтому человеческие или гуманизированные анти-CD3-антитела используют для создания последовательностей scFv для доменов связывания 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 (т . е. ориентация VL-VH или VH-VL), и три копии субъединицы «G4S» или «G_4S» $(G_4S)_3$ соединяют вариабельные домены для создания домена scFv. Плазмидные конструкции scFv к CD3 могут иметь необязательные Flag, His или другие аффинные метки, и их электропорируют 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.

ПРИМЕР 37C: Создание связывающего домена scFv Глипикан-3 (GPC3)

Глипикан-3 (GPC3) является одним из белков клеточной поверхности, присутствующих в гепатоцеллюлярной карциноме, но не в здоровой нормальной ткани печени. Часто наблюдается повышение его уровня при гепатоцеллюлярной карциноме, что связано с неблагоприятным прогнозом для пациентов с ГЦК. Известно, что он активирует передачу сигналов Wnt. Были созданы антитела к GPC3, включая MDX-1414, HN3, GC33 и YP7.

scFv, связывающийся с GPC-3 или другим антигеном-мишенью, создавали аналогично описанному выше способу создания scFv-связывающего домена с CD3.

ПРИМЕР 37D: Экспрессия триспецифических антигенсвязывающих белков in vitro

Использзовали систему экспрессии клеток CHO (Flp-In®, Life Technologies), производную клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao and Puck, Proc. Natl. Acad Sci USA 1968; 60(4):1275-81). Адгезивные клетки пересевали в соответствии со стандартными протоколами культивирования клеток, предоставленными Life Technologies.

Для адаптации к росту в суспензии клетки отделяли от флаконов с тканевой культурой и помещали в бессывороточную среду. Адаптированные к суспензии клетки криоконсервировлаи в среде с 10% ДМСО.

Рекомбинантные клеточные линии CHO, стабильно экспрессирующие секретируемые триспецифические антигенсвязывающие белки, получали путем трансфекции адаптированных к суспензии клеток. Во время селекции с помощью антибиотика гигромицина В дважды в неделю измеряли плотность жизнеспособных клеток, клетки центрифугировали и ресуспендировали в свежей селекционной среде при максимальной плотности $0{,}1\times10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Пулы клеток, стабильно экспрессирующие триспецифические антигенсвязывающие белки, выделяли через 2-3 недели селекции, после чего клетки переносили в стандартную культуральную среду во встряхиваемых колбах. Экспрессию рекомбинантных секретируемых белков подтверждали с помощью электрофореза в белковом геле или проточной цитометрии. Стабильные клеточные пулы криоконсервировали в среде, содержащей ДМСО.

Триспецифические антигенсвязывающие белки продуцировали в 10-дневных культурах стабильно трансфицированных клеточных линий CHO путем секреции в супернатант клеточной культуры. Супернатанты клеточных культур собирали через 10 дней при жизнеспособности культур обычно >75%. Образцы собирали из культур через день и оценивали плотность и жизнеспособность клеток. В день сбора супернатанты клеточных культур очищали центрифугированием и вакуумным фильтрованием перед дальнейшим использованием.

Титры экспрессии белков и целостность продукта в супернатантах клеточных культур анализировали с помощью SDS-PAGE.

ПРИМЕР 37E: Очистка триспецифических антигенсвязывающих белков

Триспецифические антигенсвязывающие белки очищали из супернатантов клеточной культуры CHO с помощью двухстадийной процедуры. Конструкции подвергают аффинной хроматографии на первой стадии с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (SEC) на Superdex 200 на второй стадии. Буфер в образцах заменяли и образцы концентрировали ультрафильтрованием до типичной концентрации >1 мг/мл Чистоту и однородность (обычно >90%) окончательных образцов оценивали с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с последующим иммуноблоттингом с использованием анти-(домена продления периода полужизни) или

анти-идиотипического антитела, а также с помощью аналитической SEC, соответственно. Очищенные белки хранили аликвотами при температуре -80°C до использования.

ПРИМЕР 38

Экспрессия сконструированной кольцевой РНК с доменом продления периода полужизни имеет улучшенные фармакокинетические параметры, чем без домена продления периода полужизни.

Триспецифический антигенсвязывающий белок, кодируемый молекулой кольцРНК из примера 23, вводили яванским макакам в виде 0,5 мг/кг болюсного введения внутримышечно. Другая группа яванских макак получала сравнимый по размеру белок, кодируемый молекулой кольцРНК, с доменами связывания с CD3 и GPC-3, но без домена продления периода полужизни. Третья и четвертая группы получали белок, кодируемый молекулой кольцРНК, с доменами связывания CD3 и домена продления периода полужизни, и белок с доменами GPC-3 и доменом продления периода полужизни, соответственно. Оба белка, кодируемые кольцРНК, были сопоставимы по размеру с триспецифическим антигенсвязывающим белком. Каждая тестовая группа состояла из 5 обезьян. Образцы сыворотки отбирали в указанные моменты времени, серийно разводили и определяли концентрацию белков с помощью связывания ИФА с CD3 и/или GPC-3.

Фармакокинетический анализ проводили с использованием концентраций испытуемого препарата в плазме. Средние групповые данные по плазме для каждого тестируемого препарата 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 элиминирования. Общее уравнение для наилучшего соответствия данных для внутривенного введения: $c(t)=Ae^{-at}+Be^{-pt}$, где c(t) - концентрация в плазме во время t, A и B - точки пересечения на оси Y, а a и β - кажущиеся константы скорости первого порядка для фаз распределения и элиминирования, соответственно. A-фаза представляет собой начальную фазу клиренса и отражает распределение белка во всей внеклеточной жидкости животного, тогда как вторая, или β-фаза, часть кривой затухания представляет собой истинный плазменный клиренс. Способы подгонки таких уравнений хорошо известны в данной области техники. Например, A=D/V(a-k21)/(a-p), B=D/V(p-k21)/(a-p), a и β (для $\alpha>\beta$) являются корнями квадратного уравнения: $r^2+(k12+k21+k10)r+k21k10=0$ используя расчетные параметры V=объем распределения, k10=константа элиминирования, k12=константа переноса из отдела 1 в отдел 2 и k21=константа переноса из отдела 2 в отдел 1, и D= введенная доза.

Анализ данных: Графики зависимости концентрации от времени построены с использованием KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Рединг, Пенсильвания). Значения, о которых сообщается, что они ниже регистрируемых (LTR), не включали в фармакокинетический анализ и не представляли графически. Фармакокинетические параметры определяли с помощью компартментального анализа с использованием программного обеспечения WinNonlin

(WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation.Маунтэйн-Вью, Калифорния). Фармакокинетические параметры рассчитывали, как описано в Ritschel W A and Kearns G L, 1999, EST: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 5th edition, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D C.

Ожидается, что триспецифический антигенсвязывающий белок, кодированный молекулой кольцРНК из примера 23, имеет улучшенные фармакокинетические параметры, такие как увеличение периода полувыведения, по сравнению с белками, не имеющими домена продления периода полужизни.

ПРИМЕР 39

Цитотоксичность триспецифического антигенсвязывающего белка

Триспецифический антигенсвязывающий белок, кодируемый молекулой кольцРНК из примера 23, оценивали in vitro в отношении опосредованной им цитотоксичности Т-клеток к GPC-3+ клеткам-мишеням.

Флуоресцентномеченные клетки-мишени GPC3, инкубировали с изолированными МКПК случайных доноров или Т-клетками в качестве эффекторных клеток в присутствии триспецифического антигенсвязывающего белка Примера 23. После инкубации в течение 4 ч при 37°C во влажном инкубаторе выделение флуоресцентного красителя из клеток-мишеней в супернатант определяли на спектрофлуориметре. Клетки-мишени, инкубированные без триспецифического антигенсвязывающего белка из Примера 23, и клетки-мишени, полностью лизированные добавлением сапонина в конце инкубации, служили в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

На основании измеренных оставшихся живых клеток-мишеней процент специфического клеточного лизиса рассчитывали по следующей формуле: [1-(число живых клеток-мишеней(пример)/число живых клеток-мишеней(спонтанно))] x 100%. Сигмоидальные кривые доза-эффект и значения EC50 рассчитывали нелинейной регрессионной/4-параметровой логистической подгонкой с помощью программного обеспечения GraphPad. Значения лизиса, полученные для данной концентрации антитела, использовали для расчета сигмоидальных кривых доза-реакция с помощью анализа логистической подгонки по 4 параметрам с использованием программного обеспечения Prism.

ПРИМЕР 40

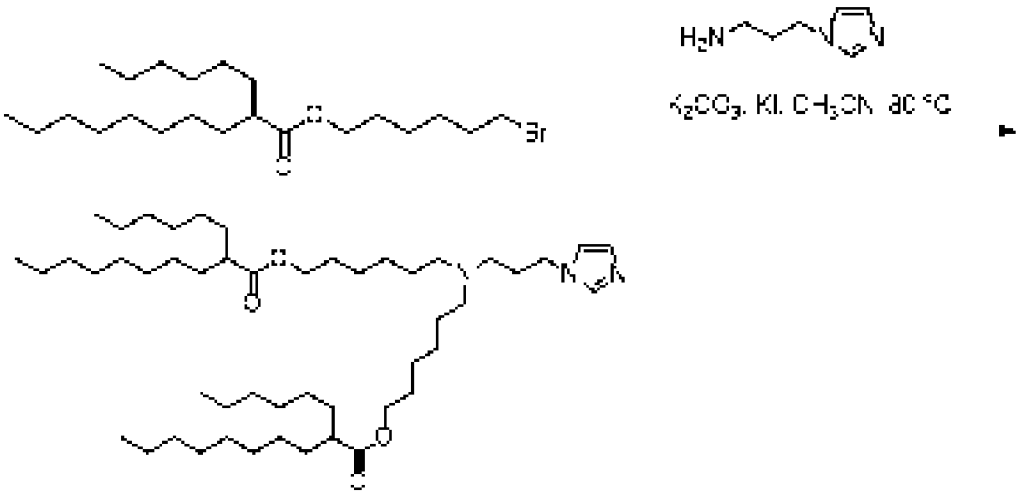
Синтез ионизируемых липидов

40.1 Синтез ((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоата)(**Липид 10a-27**) и ((3 -(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоата))(**Липид 10a-26**)

В круглодонную колбу на 100 мл, соединенную с холодильником, помещали 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-гексилдеканоат (737,2 мг, 1,757 ммоль), карбонат калия (485 мг, 3,515 ммоль) и йодид калия (13 мг, 0,08 ммоль) и смешивали в ацетонитриле (30 мл) и реакционную смесь нагревали до 80°C в течение 48 часов. Смесь

охлаждали до комнатной температуры и фильтровали сквозь слой целита. Фильтрат разбавляли насыщенным водным раствором хлорида натрия, и затем экстрагировали этилацетатом. После этого органические слои промывали водой, насыщенным водным раствором хлорида натрия и сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель выпаривали, и неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2=100-10% метанола в CH_2Cl_2) и получали бесцветный маслянистый продукт (92 мг, 15%). Молекулярная формула ((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоат)) $C_{50}H_{95}N_3O_4$ и молекулярная масса (M_w) составляет 801,7.

Схема реакции синтеза ((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоата)) (Липида 10a-26).



Характеристика Липида 10a-26 была выполнена с помощью ЖХ-МС. На Фиг. 27A-C показаны характеристики Липида 10a-26. На Фиг. 27A показан протонный ЯМР, наблюдаемый для Липида 10a-26. На Фиг. 27B показан репрезентативный ЖХ/МС для Липида 10a-26 с полными ионами и УФ-хроматограммами.

40. 2 Синтез Л**ипида 22-S14**

40.2.1 Синтез 2-(тетрадецилтио)этан-1-ола

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. ТСХ (этилацетат/петролейный эфир=25/1, R_f=0,3, окрашивание I_2), показало, что исходный материал полностью израсходован и образовалось новое основное пятно. Реакционную смесь фильтровали, осадок на фильтре промывали ацетонитрилом (50 мл), затем фильтрат концентрировали в вакууме, получая остаток, который очищали на колонке с силикагелем (этилацетат/петролейный эфир=1/100 до 1/25) с получением 2-(тетрадецилтио)этан-1-ола (14 г, выход 64,28%) в виде белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (ET36387-45-P1A, 400 Мгц, Хлороформ-d) δ 0,87-0,91 (м, 3 H) 1,27 (с, 20 H) 1,35-1,43 (м, 2 H) 1,53-1,64 (м, 2 H) 2,16 (уш с, 1 H) 2,49-2,56 (м, 2 H) 2,74 (т, J=5,93 Гц, 2 H)

3,72 (уш д, J=4,89 Гц, 2 Н). На Фиг. 28 показан соответствующий спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

40.2.2 Синтез 2-(тетрадецилтио)этилакрилата

К раствору 2-(тетрадецилтио)этан-1-ола (14 г, 51,00 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (240 мл) 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.) по каплям при 0°C в атмосфере азота. Реакционную смесь нагревали до 25°C и перемешивали в течение 12 ч. ТСХ (этилацетат/петролейный эфир=25/1, Rf=0,5, окрашивание I_2), показало, 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=1/100 до 1/25) с получением 2-(тетрадецилтио)этилакрилата (12 г, выход 71,61%) в виде бесцветного масла.

^{1}Н ЯМР (ET36387-49-P1A, 400 МГц, Хлороформ-d) δ 0,85-0,93 (м, 3Н) 1,26 (с, 19Н) 1,35-1,43 (м, 2Н) 1,53-1,65 (м, 2Н) 2,53-2,62 (м, 2 Н) 2,79 (т, J=7,03 Гц, 2 Н) 4,32 (т, J=7,03 Гц, 2 Н) 5,86 (дд, J=10,39, 1,47 Гц, 1Н), 6,09-6,19 (м, 1Н) 6,43 (дд, J=17:30, 1,41 Гц, 1 Г). На Фиг. 29 показан соответствующий спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

40.2.3 Синтез бис(2-(тетрадецилтио)этил) 3,3'-((3-(2-метил-1Н-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (Липид 22-S14)

В колбу загружали 3-(2-метил-1Н-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (300 мг, 2,16 ммоль) и 2-(тетрадецилтио)этилакрилат (1,70 г, 5,17 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 80 °C и перемешивали в течение 48 часов. ТСХ (этилацетат, R_f=0,3, окрашивание I_2 с добавлением одной капли гидроксида аммония) показало, что исходный материал полностью израсходован и образовалось новое основное пятно. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (4 мл) и очищали на колонке с силикагелем (этилацетат/петролейный эфир=3/1 до 0/1, добавляли 0,1% гидроксида аммония) с получением бис(2-(тетрадецилтио)этил) 3,3'-((3-(2-метил-1Н-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (501 мг, выход 29,1%) в виде бесцветного масла.

^{1}Н ЯМР (ET36387-51-P1A, 400 Мгц, Хлороформ-d) δ 0,87 (т, J=6,73 Гц, 6 Н) 1,25 (с, 40 Н) 1,33-1,40 (м,, 4 Н) 1,52-1,61 (м, 4 Н) 1,81-1,90 (м, 2 Н) 2,36 (с, 3 Н) 2,39-2,46 (м, 6 Н) 2,53 (т, J=7,39 Гц, 4 Н) 2,70-2,78 (м, 8 Н) 3,84 (т, J=7,17 Гц, 2 Н) 4,21 (т, J=6,95 Гц, 4 Н) 6,85 (с, 1 Н) 6,89 (с, 1 Н). На Фиг. 30 показан соответствующий спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

40.3 Синтез бис(2-(тетрадецилтио)этил) 3,3'-((3-(1Н-имидазол-1-ил)пропил)азандиил)дипропионата (Липид 93-S14)

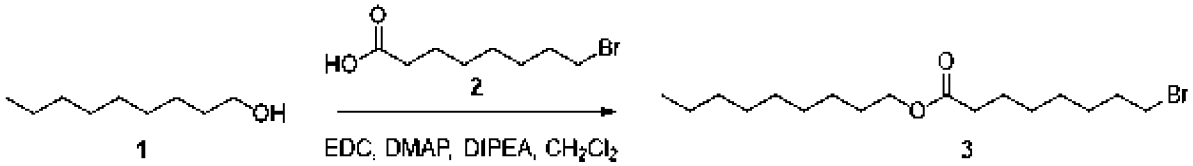
В колбу загружали 3-(1Н-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (300 мг, 2,40 ммоль, 1 экв.) и 2-(тетрадецилтио)этилакрилат (1,89 г, 5,75 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь нагревали до 80 °C и перемешивали в течение 48 часов. ТСХ (этилацетат, R_f=0,3, окрашивание I_2 с добавлением одной капли гидроксида аммония) показало, что исходный материал полностью израсходован и образовалось новое основное пятно. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (4 мл) и очищали на колонке с силикагелем

(этилацетат/петролейный эфир=1/20 до 0/100, добавляли 0,1% гидроксида 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.

^{1}H ЯМР (ET36387-54-P1A, 400 МГц, Хлороформ-d) δ 0,89 (т, J=6,84 Гц, 6 H) 1,26 (с, 40 H) 1,34-1,41 (м, 4 H) 1,58 (уш т, J=7,50 Гц, 4 H) 1,92 (т, J=6,62 Гц, 2 H) 2,36-2,46 (м, 6 H) 2,55 (т, J=7,50 Гц, 4 H) 2,75 (кв, J=6,84 Гц, 8 H) 3,97 (т, J=6,95 Гц, 2 H) 4,23 (т, J=6,95 Гц, 4H) 6,95 (с, 1H) 7,06 (с, 1H) 7,51 (с, 1H). На Фиг. 31 показан соответствующий спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

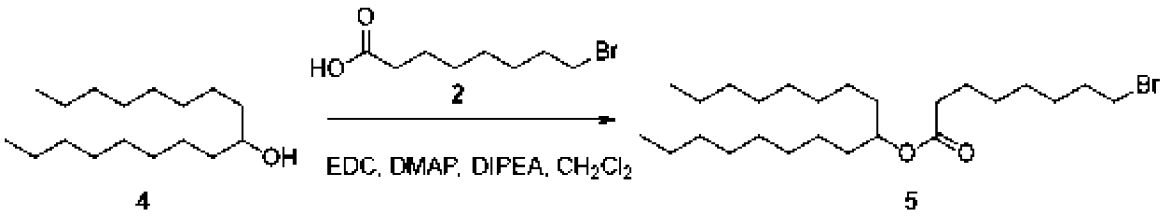
40.4 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (**Липид 10a-54)**

40.4.1 Синтез нонил-8-бромоктаноата (**3**)



К смеси 8-бромоктановой кислоты (2) (18,6 г, 83,18 ммоль) и нонан-1-ола (1) (10г, 69,32 ммоль) в CH_2Cl_2 (500 мл) добавляли ДМАП(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 н. HCl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4. Растворитель выпаривали, а неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2:гексан=100% до 30% EtOAc в гексане) иполучали бесцветный масляный продукт3(9 г, 37%).

40.4.2 Синтез гептадекан-9-ил 8-бромоктаноата (**5**)

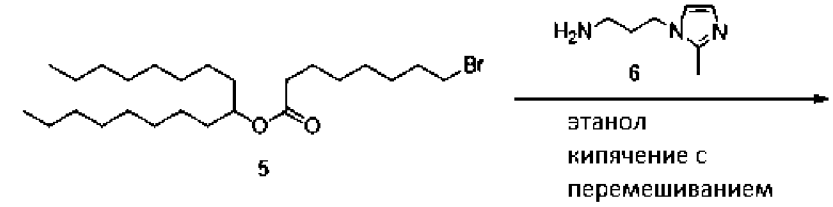


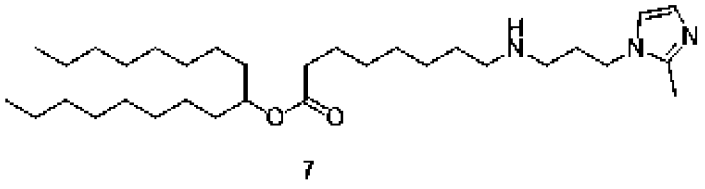
К смеси 8-бромоктановой кислоты (2) (10 г, 44,82 ммоль) и гептадекан-9-ола (4) (9,6 г, 37,35 ммоль) в CH_2Cl_2 (300 мл) добавляли ДМАП(900 мг, 7,48 ммоль), DIPEA (26 мл, 149,7 ммоль)и EDC (10,7 г, 56,03 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После концентрирования реакционной смеси неочищенный остаток растворяли в этилацетате (300 мл), промывали 1 н. HCl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4. Растворитель выпаривали, а неочищенный остаток очищали флэш-

хроматографией (SiO_2:гексан=100% до 30% EtOAc в гексане) и получали бесцветный масляный продукт **5** (5 г, 29%).

^{1}H ЯМР (300 Мгц, $CDCl_3$): δ м.ч. 4,86 (м, 1H), 3,39 (т, J=7,0 Гц, 2H), 2,27 (т, J=7,6 Гц, 2H), 1,84 (м, 2H), 1,62 (м, 2H), 1,5-1,4 (м, 8H),1,35-1,2 (м, 26H) 0,87 (т, J=6,7 Гц, 6H).

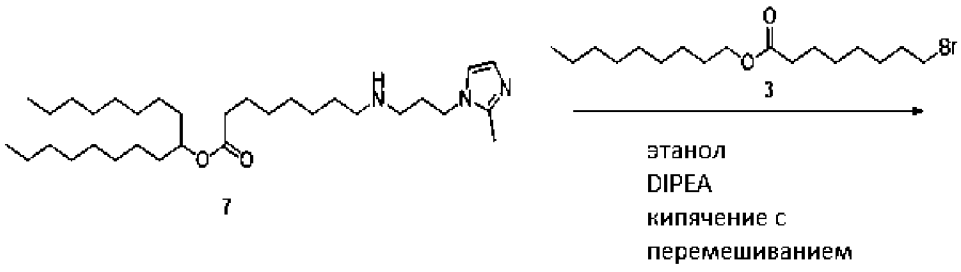
40.4.3Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)амино)октаноата (7)

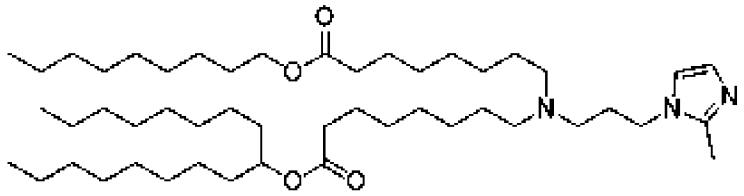




В круглодонную колбу на 100 мл, соединенную с холодильником, помещали гептадекан-9-ил 8-бромоктаноат (5) (860 мг, 1,868 ммоль) и 3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (6) (1,3 г, 9,339 ммоль) и смешивали с этанолом (10 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. МС (ХИАД) показала ожидаемый продукт. Смесь концентрировали при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2= от 100% до 10% метанола+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) и получали бесцветный маслянистый продукт **7** (665 мг, 69%).

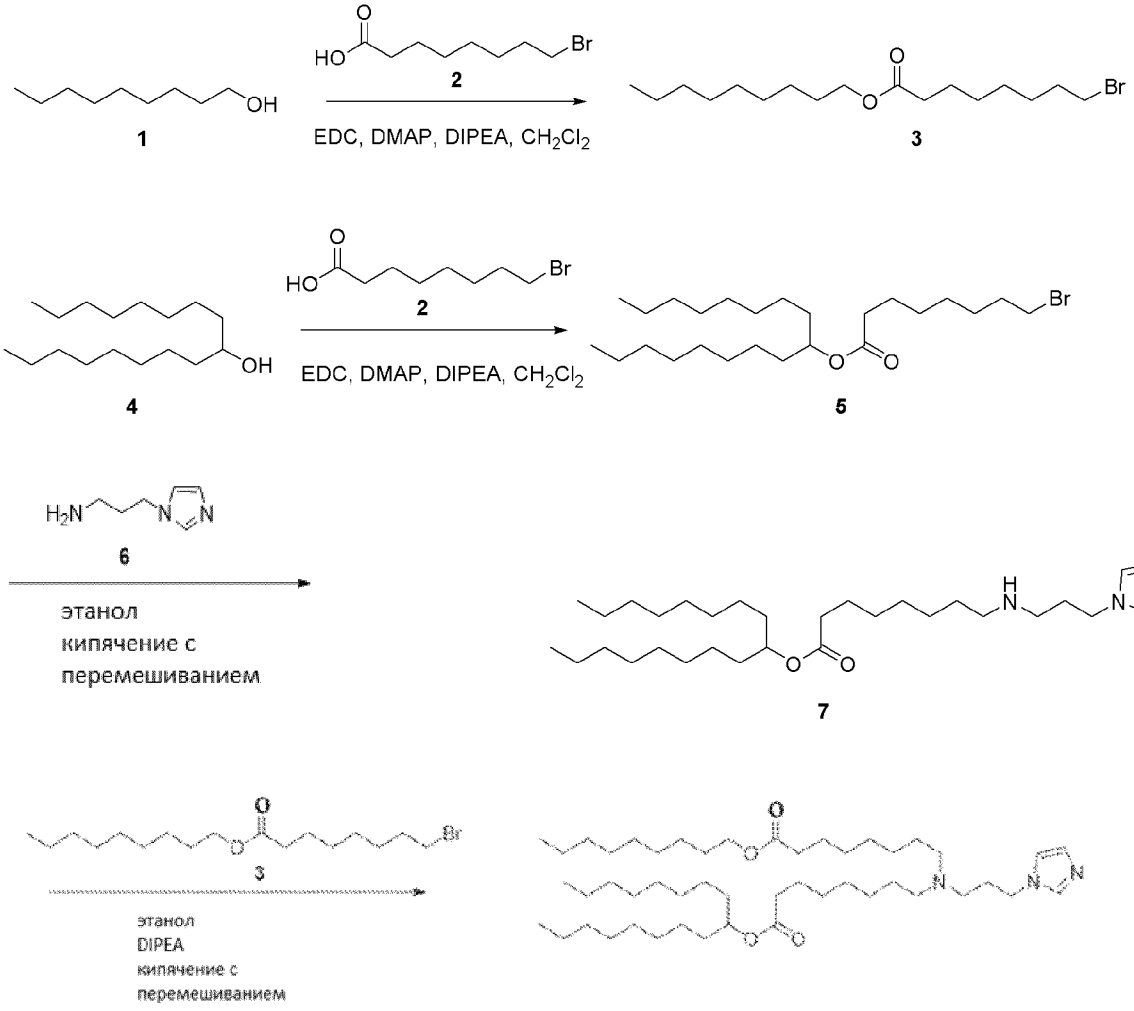
40.4.4 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (Липид 10a-54)





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) добавляли этанол (10 мл), и затем добавляли DIPEA (0,55 мл, 3,198 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. И МС (ХИАД), и ТСХ (10%MeOH+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) показали наличие продукта и некоторого количества непрореагировавшего исходного материала. Смесь концентрировали при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2= от 100% до 10% метанола+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) и получали бесцветный маслянистый продукт (170 мг, 17%).

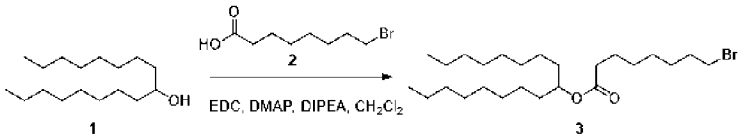
40.5 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (**Липид 10a-53**)



Липид 10a-53 синтезировали по приведенной выше схеме. Условия реакции идентичны таковым для липида 10a-54, за исключением 3-(1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амина в качестве имидазоламина.

40.6 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (**Липид 10a-45**)

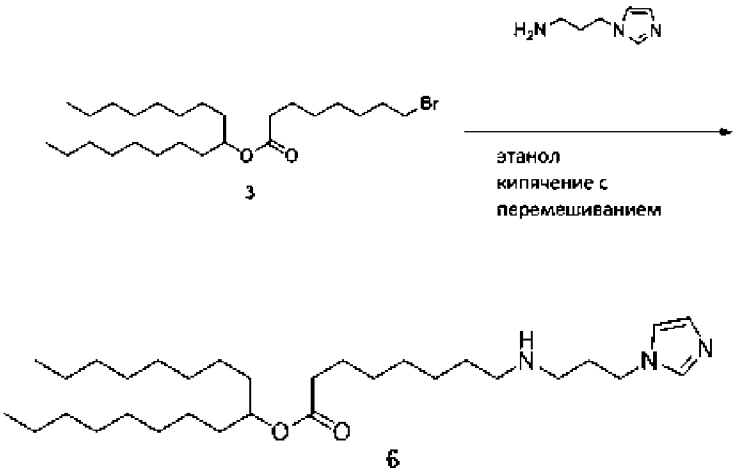
40.6.1 Синтез гептадекан-9-ил 8-бромооктаноата (**3**)



К смеси 8-бромоктановой кислоты (**2**) (10 г, 44,82 ммоль) и гептадекан-9-ола (**1**) (9,6 г, 37,35 ммоль) в CH_2Cl_2 (300 мл) добавляли ДМАП(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 н. HCl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4. Растворитель выпаривали, а неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2:гексан=100% до 30% EtOAc в гексане) и получали бесцветный масляный продукт **3** (5 г, 29%).

^{1}H ЯМР (300 Мгц, $CDCl_3$): δ м.ч. 4,86 (м, 1H), 3,39 (т, J=7,0 Гц, 2H), 2,27 (т, J=7.6 Гц, 2H), 1,84 (м, 2H), 1,62 (м, 2H), 1,5-1,4 (м, 8H),1,35-1,2 (м, 26H) 0,87 (т, J=6,7 Гц, 6H).

40.6.2 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)амино)октаноата (**6**)

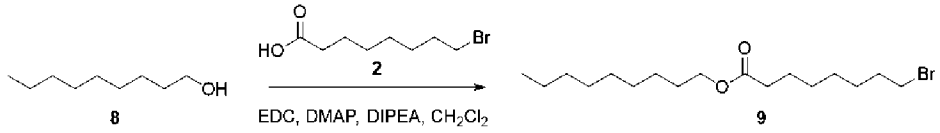


В круглодонной колбе на 100 мл, соединенной с холодильником, смешивали гептадекан-9-ил 8-бромоктаноат (**3**) (1 г, 2,167 ммоль) и 3-(1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (**4**) (1,3 мл, 10,83 ммоль) в этаноле (10 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. МС (ХИАД) показала ожидаемый продукт. Смесь концентрировали при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2= от 100% до 10%

метанола+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) и получали бесцветный маслянистый продукт **6** (498 мг, 45%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ м.ч. 7,47 (с, 1H), 7,04 (с, 1H), 6,91 (с, 1H), 4,85 (м, 1H), 4,03 (т, J=7,0 Гц, 2H), 2,56 (дд, J=14,5, 7,4 Гц, 4H), 2.27 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,92 (м, 2H), 1,60 (м, 2H), 1,48 (м, 6H), 1,30-1,20 (м, 31H), 0,86 (т, J=6,6 Гц, 6H). МС (ХИАД $^+$): 506,4 (M+1).

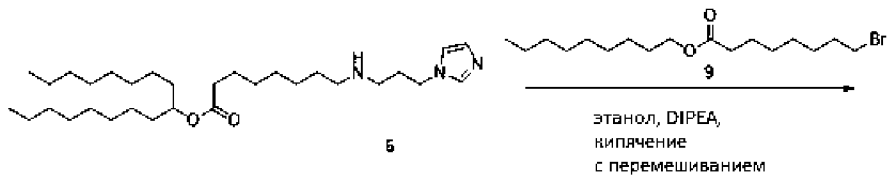
40.6.3 Синтез нонил-8-бромоктаноата (**9**)

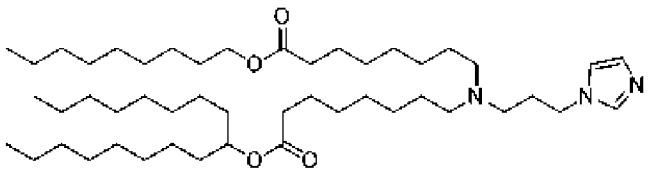


К смеси 8-бромоктановой кислоты (2) (18,6 г, 83,18 ммоль) и нонан-1-ола (8) (10г, 69,32 ммоль) в CH_2Cl_2 (500 мл) добавляли ДМАП(1,7 г, 13,86 ммоль), DIPEA (48 мл, 277,3 ммоль)и EDC (16 г, 83,18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После концентрирования реакционной смеси неочищенный остаток растворяли в этилацетате (500 мл), промывали 1 н. HCl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4. Растворитель выпаривали, а неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2:гексан=100% до 30% EtOAc в гексане) и получали бесцветный масляный продукт **9** (9 г, 37%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ м.ч. 4,05 (т, J=7,0 Гц, 2H), 3,39 (т, J=7,0 Гц, 2H), 2,29 (т, J=7,6 Гц, 2H), 1,84 (м, 2H), 1,62-1,56 (м, 6H), 1,40-1,20 (м, 16H), 0,87 (т, J=6,7 Гц, 3H).

40.6.4 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата



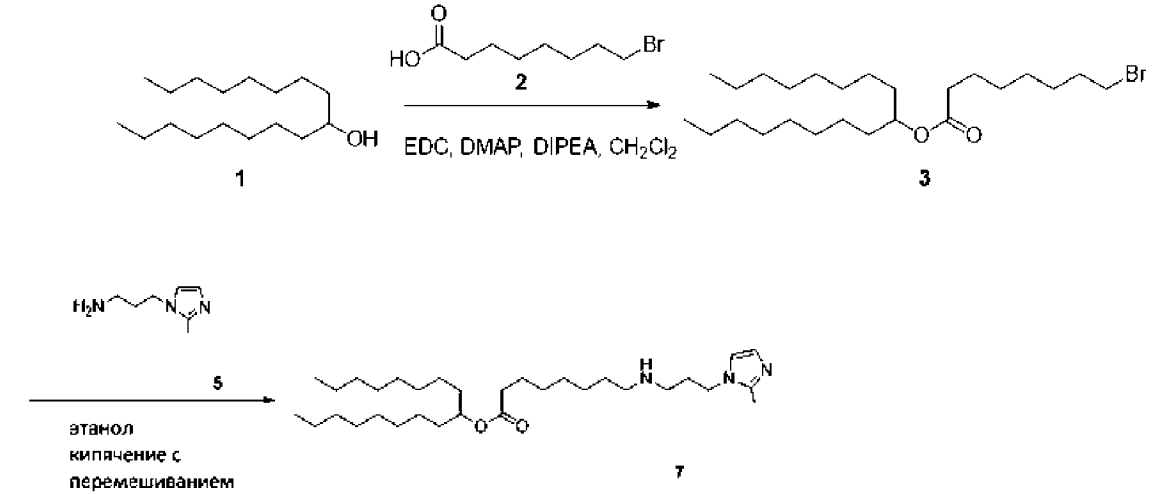


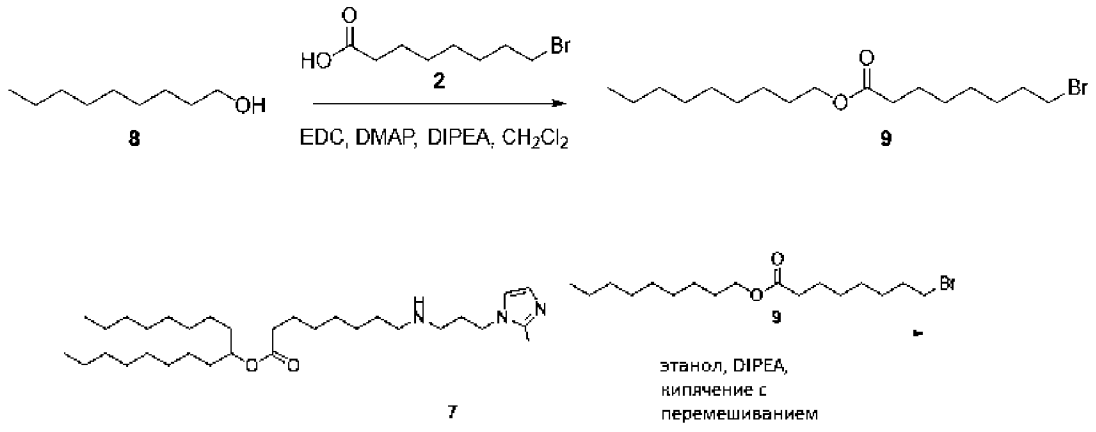
В круглодонную колбу на 100 мл, соединенную с холодильником, помещали гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)амино)октаноат (**6**) (242 мг, 0,478 ммоль) и нонил 8-бромоктаноат 9 (200 мг, 0,574 ммоль) и смешивали их с этанолом (10 мл), затем добавляли DIPEA (0,2 мл, 1,196 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. И МС (ХИАД), и ТСХ (10%MeOH+1%NH4OH в CH_2Cl_2) показали наличие продукта и некоторого количества непрореагировавшего исходного

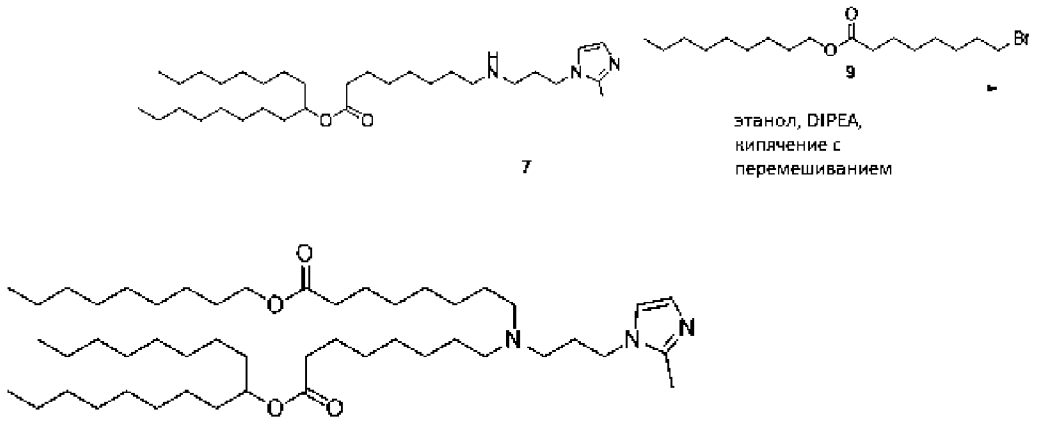
материала. Смесь концентрировали при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2= от 100% до 10% метанола+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) и получали бесцветный маслянистый продукт (35 мг, 10%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, CDCl3): δ м.ч. 7,46 (с, 1H), 7,05 (с, 1H), 6,90 (с, 1H), 4,85 (м, 1H), 4,04 (т, J=6,6 Гц, 2H), 4,01 (т, J=6,6 Гц, 2H), 2,38 (м, 6H), 2,27 (т, J=3,8 Гц, 4H), 1,89 (м, 2H), 1,60-1,58 (м, 12H), 1,48 (м, 6H), 1,30-1,20 (м, 47H), 0,87 (т, J=7,1 Гц, 9H). МС (ХИАД+): 774,6 (M+1).

40.7 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (**Липид 10a-46**)





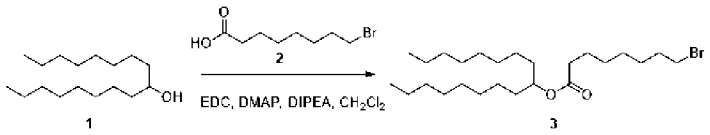


Липид 10a-46 синтезировали по приведенной выше схеме. Условия реакции идентичны таковым для липида 10a-45, за исключением 3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амина в качестве имидазоламина.

^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ м.ч. 6,89 (с, 1H), 6,81 (с, 1H), 4,86 (м, 1H), 4,04 (т, J=6,8 Гц, 2H), 3,85 (т, J=7,4 Гц, 2H), 2,38-2,36 (м, 9H), 2,28 (м, 4H), 1,82 (м, 2H), 1,72-1,56 (м, 12H), 1,48 (м, 4H), 1,30-1,20 (м, 46H), 0,86 (т, J=6,6 Гц, 9H). МС (ХИАД+): 789,7 (M+1).

40.8 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-оксо-8-(ундекан-3-илокси)октил)амино)октаноата (Липид 10a-137)

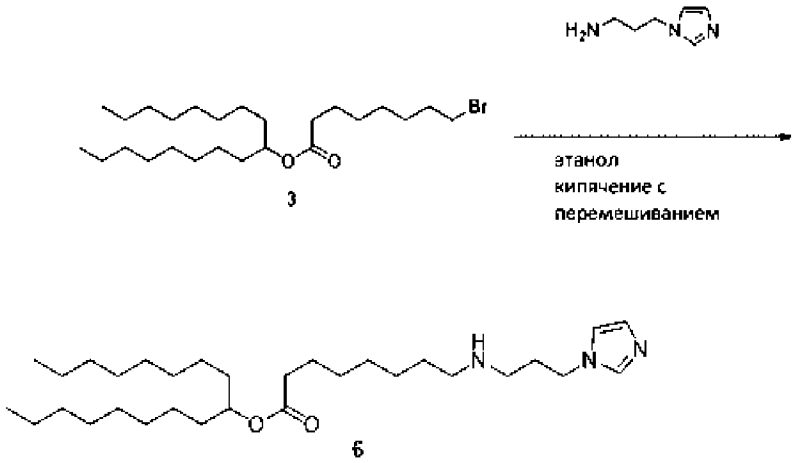
40.8.1 Синтез гептадекан-9-ил 8-бромоктаноата (**3**)



К смеси 8-бромоктановой кислоты (**2**) (10 г, 44,82 ммоль) и гептадекан-9-ола (**1**) (9,6 г, 37,35 ммоль) в CH_2Cl_2 (300 мл) добавляли ДМАП(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 н. HCl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4. Растворитель выпаривали, а неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2:гексан=100% до 30% EtOAc в гексане) и получали бесцветный масляный продукт **3** (5 г, 29%).

1H ЯМР (300 Мгц, CDCl3): δ м.ч. 4,86 (м, 1H), 3,39 (т, J=7,0 Гц, 2H), 2,27 (т, J=7,6 Гц, 2H), 1,84 (м, 2H), 1,62 (м, 2H), 1,5-1,4 (м, 8H),1,35-1,2 (м, 26H) 0,87 (т, J=6,7 Гц, 6H).

40.8.2 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)амино)октаноата (**6**)

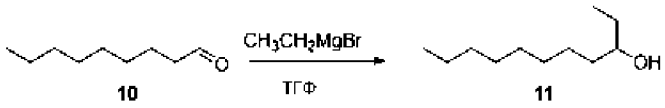


В круглодонной колбе на 100 мл, соединенной с холодильником, смешивали гептадекан-9-ил 8-бромоктаноат (**3**) (1 г, 2,167 ммоль) и 3-(1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амин (**4**) (1,3 мл, 10,83 ммоль) в этаноле (10 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным

холодильником в течение ночи. МС (ХИАД) показала ожидаемый продукт. Смесь концентрировали при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2= от 100% до 10% метанола+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) и получали бесцветный маслянистый продукт **6** (498 мг, 45%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ м.ч. 7,47 (с, 1H), 7,04 (с, 1H), 6,91 (с, 1H), 4,85 (м, 1H), 4,03 (т, J=7,0 Гц, 2H), 2,56 (dd, J=14,5, 7,4 Гц, 4H), 2,27 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,92 (м, 2H), 1,60 (м, 2H), 1,48 (м, 6H), 1,30-1,20 (м, 31H), 0,86 (т, J=6,6 Гц, 6H). МС (ХИАД+): 506,4 (M+1).

40.8.3 Синтез ундекан-3-ола (**11**)

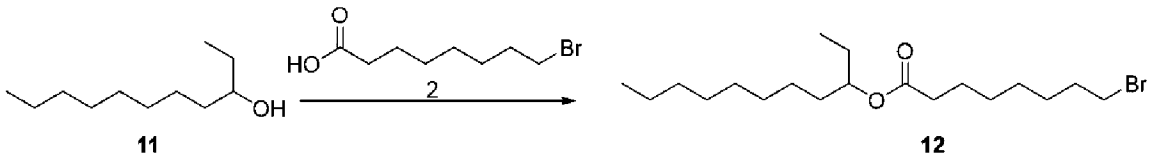


10 **11**

К смеси нонаналя (**10**) (5 г, 35,2 ммоль), в безводном ТГФ (100 мл) при 0°C на бане со льдом и водой по каплям добавляли этилмагнийбромид (47 мл, 42,2 ммоль, 0,9 М в ТГФ). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию гасили льдом и разбавляли этилацетатом (500 мл), промывали 1 н. HCl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4. Растворитель выпаривали, а неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2:гексан=100% до 50% EtOAc в гексане) и получали бесцветный масляный продукт **11** (4 г, 66%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ м.ч. 3,52 (м, 1H), 1,56-1,3 (м, 4H), 1,3-1,20 (м, 12H), 0,93 (т, J=7,4 Гц, 3H), 0,87 (т, J=7,4 Гц, 3H).

40.8.4 Синтез ундекан-3-ил 8-бромоктаноата (**12**)

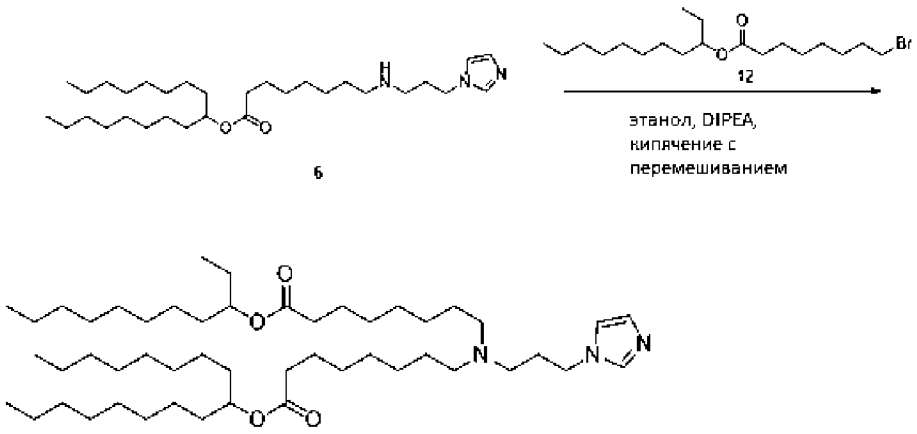


11 **12**

К смеси 8-бромоктановой кислоты (**2**) (6,2 г, 27,9 ммоль) а также ундекан-3-ола (**11**) (4 г, 23,2 ммоль) в CH_2Cl_2 (100 мл) добавляли ДМАП (567,2 мг, 4,64 ммоль), DIPEA (16,2 мл, 92,9 ммоль) и EDC (6,7 г, 34,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После концентрирования реакционной смеси неочищенный остаток растворяли в этилацетате (500 мл), промывали 1 н. HCl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4. Растворитель выпаривали, а неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2:гексан=100% до 30% EtOAc в гексане) и получали бесцветный масляный продукт **12** (7,3 г, 83%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ м.ч. 4,80 (м, 1H), 3,39 (т, J=6,8 Гц, 2H), 2,28 (т, J=7,7 Гц, 2H), 1,84 (м, 2H), 1,6-1,35 (м, 8H), 1,35-1,2 (м, 16H), 0,87 (т, J=7,4 Гц, 6H).

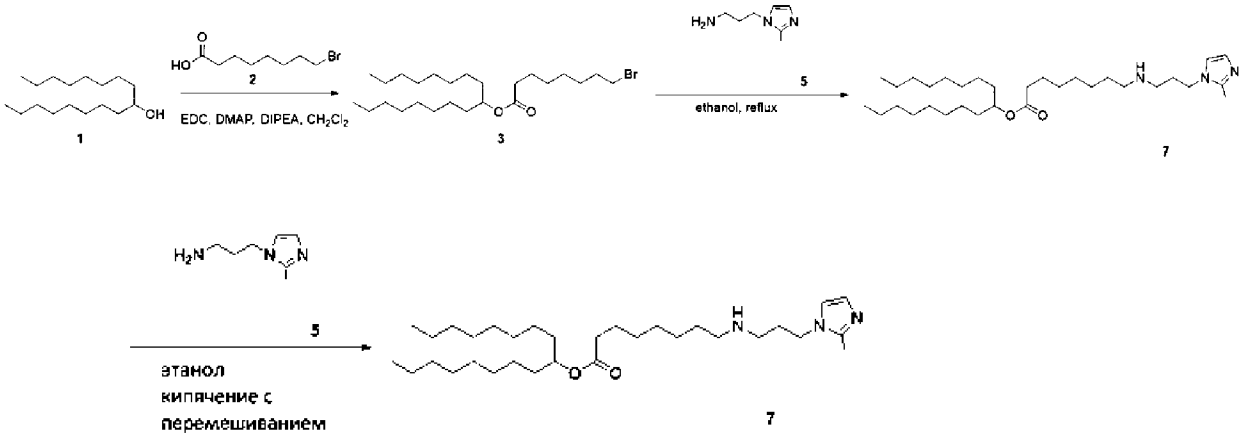
40.8.4 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата

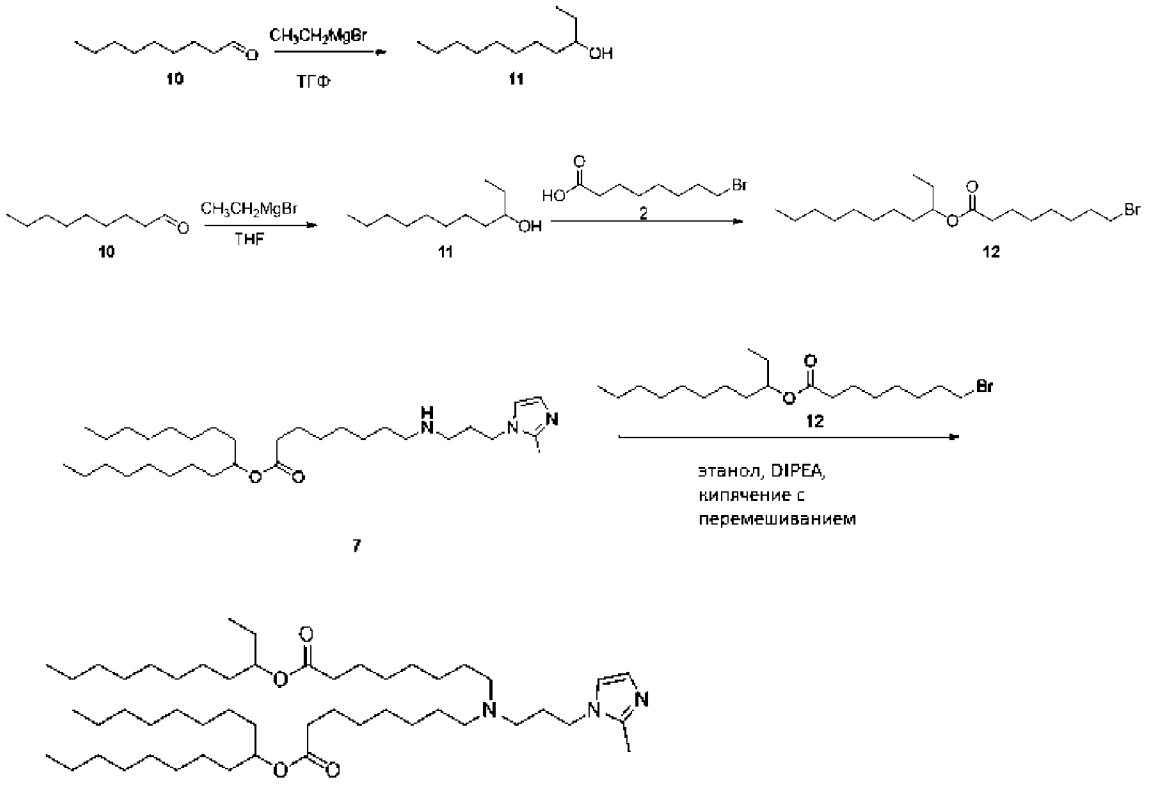


В круглодонной колбе на 100 мл, соединенной с холодильником, смешивали гептадекан-9-ил 8-((3-(1H -имидазол-1-ил)пропил)амино)октаноат (**6**) (242 мг, 0,478 ммоль) и ундекан-3-ил 8-бромоктаноат (**12**) (200 мг, 0,574 ммоль) в этаноле (10 мл), затем добавляли DIPEA (0,2 мл, 1,196 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. И МС (ХИАД), и ТСХ (10%MeOH+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) показали наличие продукта и некоторого количества непрореагировавшего исходного материала. Смесь концентрировали при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2= от 100% до 10% метанола+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) и получали бесцветный маслянистый продукт (35 мг, 10%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, CDCl3): δ м.ч. 7,45 (с, 1H), 7,04 (с, 1H), 6,90 (с, 1H), 4,82 (м, 2H), 3,97 (т, J=6,8 Гц, 2H), 2,35 (м, 6H), 2,27 (т, J=3,8 Гц, 4H), 1,89 (м, 2H), 1,60-1,48 (м, 14H), 1,30-1,20 (м, 50H), 0,87 (м, 12H). МС (ХИАД+): 802,8

40.9 Синтез гептадекан-9-ил 8-((3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноата (**Липид 10a-138**)



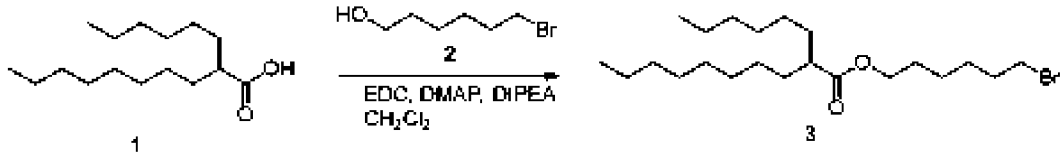


Липид 10a-138 синтезировали по приведенной выше схеме. Условия реакции идентичны таковым для липида 10a-137, за исключением 3-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)пропан-1-амина в качестве имидазоламина.

^{1}H ЯМР (300 МГц, CDCl3): δ м.ч. 6,89 (с, 1H), 6,81 (с, 1H), 4,82 (м, 2H), 3,86 (т, J=7,1 Гц, 2H), 2,38-2,3 (м, 9H), 2,27 (т, J=3,8 Гц, 4H), 1,84 (м, 2H), 1,60-1,37 (м, 14H), 1,30-1,20 (м, 50H), 0,87 (м, 12H). МС (ХИАД+): 816,8 (М+1).

40.10 Синтез (((2-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)этил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоата (Липид **10a-139**)

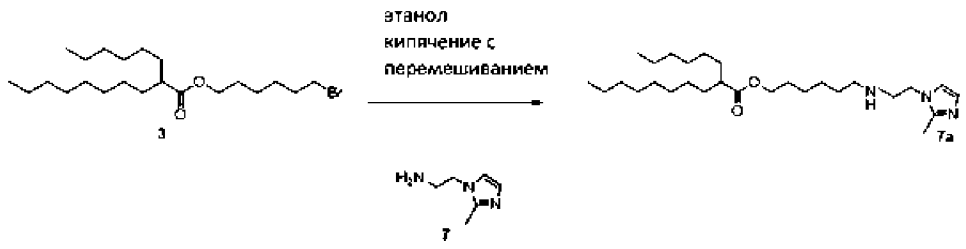
40.10.1 Синтез 6-бромгексил-2-гексилдеканоата (**3**)



К смеси 2-гексилдекановой кислоты (**1**) (102 г, 0,398 моль), 6-бром-1-гексанол (**2**) (60 г, 0,331 моль) в CH_2Cl_2 (1 л) добавляли ДМАП (8,1 г, 66 ммоль), DIPEA (230 мл, 1,325 моль) и EDC (76 г, 0,398 моль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После концентрирования реакционной смеси неочищенный остаток растворяли в этилацетате (1 л), промывали 1 н. HCl, насыщ. $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4. Растворитель выпаривали, а неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2:гексан=100% до 30% EtOAc в гексане) и получали бесцветный масляный продукт **3** (67 г, 48%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ м.ч. 4,06 (т, J=6,6 Гц, 2H), 3,4 (т, J=6,8 Гц, 2H), 2,3 (м, 1H), 1,86 (м, 2H), 1,64 (м, 2H), 1,5-1,4 (м, 2H),1,35-1,2 (м, 26H) 0,87 (т, J=6,7 Гц, 6H).

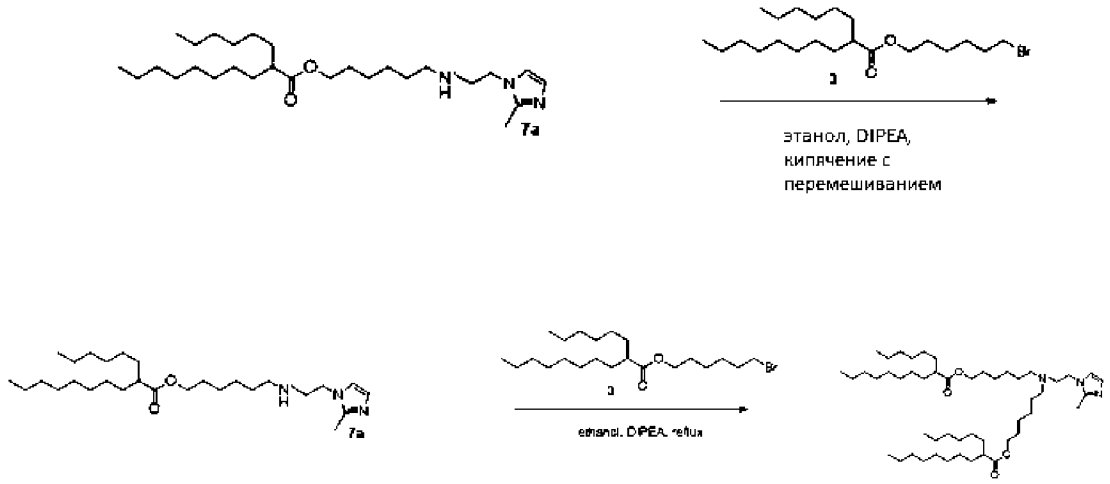
40.10.2 Синтез 6-((3-(1H-имидазол-1-ил)бутил)амино)гексил-2-гексилдеканоата (**7a**)



В круглодонной колбе на 100 мл, соединенной с холодильником, смешивали 6-бромгексил-2-гексилдеканоат (**3**) (1,2 г, 2,87 ммоль) и 3-(1H -имидазол-1-ил)бутан-1-амин (**7**) (2 г, 14,37 ммоль) с этанолом (20 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. МС (ХИАД) показала ожидаемый продукт. Смесь концентрировали при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2= от 100% до 10% метанола+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) и получали бесцветный маслянистый продукт **7a** (626 мг, 46%).

^{1}H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ м.ч. 7,51 (с, 1H), 7,05 (с, 1H), 6,93 (с, 1H), 4,35 (м, 1H), 4,04 (т, J=6,6 Гц, 2H), 2,6-2,4 (м, 4H), 2,29 (м, 1H), 1,94 (тд, J=14, 6,8 Гц, 2H), 1,64-1,56 (м, 4H), 1,47 (с, 3H), 1,42-1,20 (м, 29H), 0,86 (м, 6H). МС (ХИАД+): 478,8 (M+1)

40.10.2 Синтез ((2-(2-метил-1H-имидазол-1-ил)этил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоата)

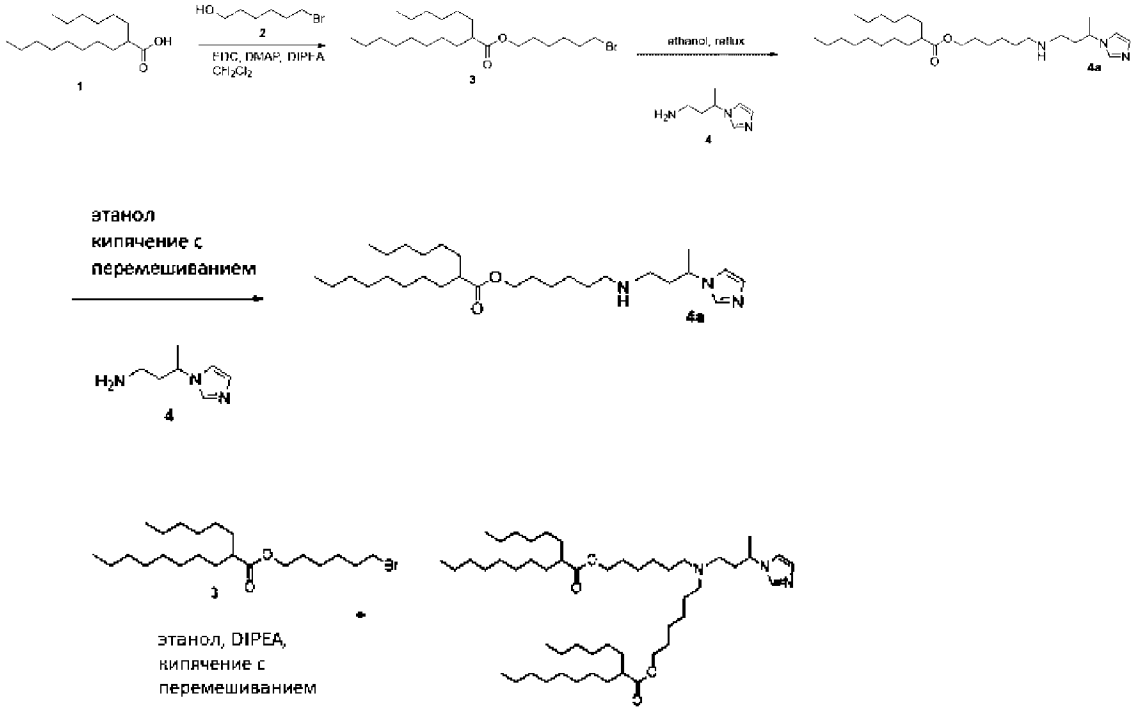


В круглодонной колбе на 100 мл, соединенной с холодильником, смешивали 6-((3-(1H -имидазол-1-ил)бутил)амино)гексил-2-гексилдеканоат (**7a**) (626 мг, 1,31 ммоль) и 6-бромгексил-2-гексилдеканоат (**3**) (550 мг, 1,31 ммоль) с этанолом (20 мл), и затем добавляли DIPEA (0,6 мл, 3,276 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. И МС (ХИАД), и ТСХ (10%MeOH+1%NH_4OH в CH_2Cl_2) показали наличие

продукта и некоторого количества непрореагировавшего исходного материала **7а**. Смесь концентрировали при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (SiO_2: CH_2Cl_2= от 100% до 10% метанола+1%NH_4OH в CH_2Cl_2), а полученный продукт дополнительно очищали обращенно-фазовой хроматографией C18 (H_2O=от 95% до 0,1% ТФК в CH_3CN=100%), получая бесцветное масло (соль ТФК) (140 мг, 13%).

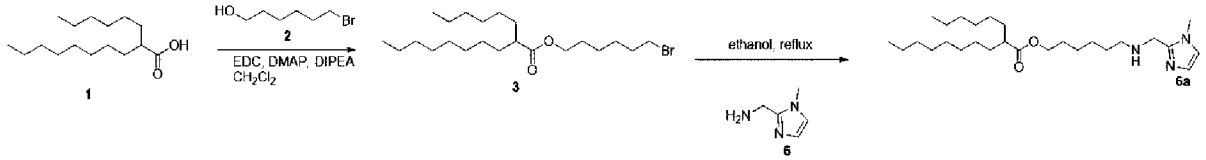
^{1}H-ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 6,87 (с, 1H), 6,83 (с, 1H), 4,05 (т, J=6,7 Гц, 4H), 3,84 (т, J=6,9 Гц, 2H), 2,66 (т, J=6,9 Гц, 2H), 2,45-2,20 (м, 6H), 2,37 (с, 3H), 1,65-1,50 (м, 8H), 1,5-1,1 (м, 56H), 0,86 (т, J=6,5 Гц, 12H). МС (ХИАД$^+$): 802,6 (M+1).

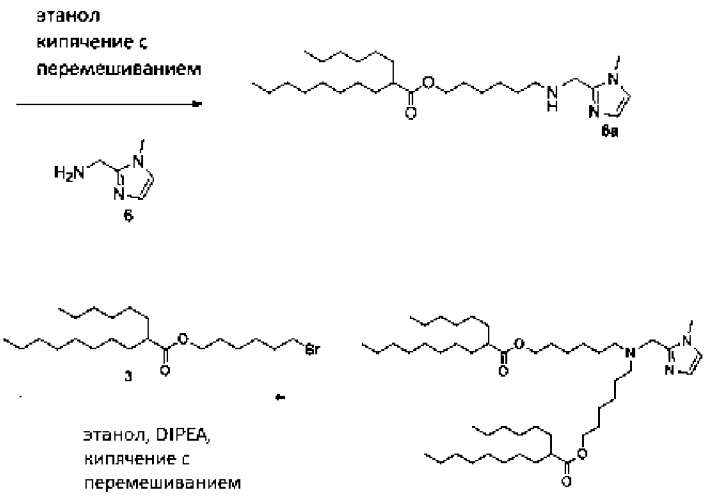
40.11 Синтез (((1-Метил-1H-имидазол-2-ил)метил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоата) (Л**ипид 10a-130**)



Липид 10a-130 синтезировали по приведенной выше схеме. Условия реакции идентичны таковым для липида 10a-139, за исключением 3-(1H -имидазол-1-ил)бутиламина в качестве имидазоламина.

40.12 Синтез (((1-метил-1H-имидазол-2-ил)метил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоата) (Л**ипид 10a-128**)





Липид 10a-128 синтезировали по приведенной выше схеме. Условия реакции идентичны таковым для липида 10a-139, за исключением 1-метил- 1H -имидазол-2-ил)метиламина в качестве имидазоламина.

^{1}H-ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 6,89 (д, J=1,4 Гц, 1H), 6,81 (д, J=1,4 Гц, 1H), 4,03 (т, J=6,7 Гц, 4H), 3,68 (с, 3H), 3,62 (с, 2H), 2,45-2,20 (м, 6H), 1,65-1,50 (м, 8H), 1,5-1,35 (м, 8H), 1,35-1,10 (м, 48H), 0,86 (т, J=6,5 Гц, 12H). МС (ХИАД$^+$): 787,6 (M+1).

ПРИМЕР 41

Состав липидных наночастиц с кольцевой РНК

Липидные наночастицы (LNP) были сформированы с использованием прибора Precision Nanosystems Ignite со смесительной камерой NextGen. Этанольная фаза содержала ионизируемый Липид 10a-26, DSPC, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Липидs Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или же 62:4:33:1 молярном соотношении и ее 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. Составленные LNP подвергали диализу в 1 л воды и заменяли буфер 2 раза в течение 18 часов. Диализованные LNP фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм. Перед дозированием in vivo LNP разводили в ФСБ. Размеры LNP определяли способом динамического светорассеяния. Кювету с 1 мл 20 мкг/мл LNP в ФСБ (pH 7,4) измеряли для определения Z-среднего с использованием Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Регистрировали значение Z-среднего и индекс полидисперсности.

41.1 Состав Липидов 10a-26 и 10a-27

Липидные наночастицы (LNP) были сформированы с использованием прибора Precision Nanosystems Ignite со смесительной камерой NextGen. Этанольная фаза содержала ионизируемый Липид 10a-26 или Липид 10a-27, DOPE, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Липидs Inc.) при массовом соотношении 16:1:4:1 или же 62:4:33:1 молярном соотношении и ее 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. Составленные LNP подвергали диализу в 1 л воды и заменяли буфер 2 раза в течение 18

часов. Диализованные LNP фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм. Перед дозированием in vivo LNP разводили в ФСБ. Размеры LNP определяли способом динамического светорассеяния. Кювету с 1 мл 20 мкг/мл LNP в ФСБ (pH 7,4) измеряли для определения Z-среднего с использованием Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Регистрировали значение Z-среднего и индекс полидисперсности.

39.2 Состав Липидов 10a-53 и 10a-54

Липидные наночастицы (LNP) были сформированы с использованием прибора Precision Nanosystems Ignite со смесительной камерой NextGen. Этанольная фаза содержала ионизируемый Липид 10a-53 или 10a-54, DOPE, холестерин и DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Липидs Inc.) при молярном соотношении 50:10:38,5:1,5, и ее 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. Составленные LNP подвергали диализу в 1 л 1 x ФСБ и заменяли буфер 2 раза в течение 18 часов. Диализованные LNP фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм. Перед дозированием in vivo LNP разводили в ФСБ. Размеры LNP определяли способом динамического светорассеяния. Кювету с 1 мл 20 мкг/мл LNP в ФСБ (pH 7,4) измеряли для определения Z-среднего с использованием Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Регистрировали значение Z-среднего и индекс полидисперсности.

Дзета-потенциал LNP измеряли с помощью 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.

Инкапсуляцию РНК определяли с помощью анализа Ribogreen. Растворы наночастиц разводили в буфере трис-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ТЕ) при теоретической концентрации кольцРНК 2 мкг/мл. Готовили стандартные растворы кольцРНК, разведенные в ТЕ-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 кольцРНК, обнаруженных между лизированными и нелизированными частицами.

Таблица 16a. Характеристика LNP

Ионизируемый липид	**Размер (нм)**	**PDI**	**Эффективность инкапсуляции (%)**	**Данные Зета Потенциал (мВ)**
22-S14	88	0,09	96	3,968
93-S14	119	0,02	96	-6,071
Липид 10a-26	86	0,08	92	-15,24

Таблица 16b. Характеристика LNP

Ионизируемый липид	Z-среднее (нм)	PDI	Захват РНК (%)
22-S14	64	0,05	97
93-S14	74	0,04	95
Липид 10a-26	84	0,04	96

ПРИМЕР 42

Анализ in vivo

Самкам CD-1 или самкам c57BL/6J мышам массой от 22 до 25 г вводили дозу 0,5 мг/кг РНК внутривенно. Через шесть часов после инъекции мышам внутрибрюшинно вводили 200 мкл D-люциферинапри 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 всего тела Липидов 22-S14, 93-S14, Липида 10a-26 представлен на Фиг. 32A. 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. 33A-B, 34A-B, 35A-B) анализировали с использованием программного обеспечения Living Images (Perkin Elmer). Области интереса были нарисованы для получения потока и средней яркости и проанализированы на биораспределение экспрессии белка (Фиг. 32A-B).

На Фиг. 32A проиллюстрирован повышенный общий поток через тело, наблюдаемый от кольцРНК люциферазы с LNP Липида 10a-26 по сравнению с LNP, полученными с липидами 22-S14 и 93-S14. На Фиг. 32B показан ex vivo IVIS-анализ тканей, дополнительно подчеркивающий повышенную общую экспрессию с помощью Липида 10a-26 при сохранении желаемых соотношений в селезенке 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 10a-26, по сравнению с липидами, о которых сообщалось ранее.

Аналогичный анализ, описанный выше, также проводили с кольцРНК, инкапсулированной в LNP, образованных липидом 10b-15 или липидом 10a-53 или 10a-54. На Фиг. 36A-C показан анализ тканей ex vivo IVIS, соответственно выделяющий общую экспрессию с помощью Липидов 10b-15, 10a-53, и 10a-54 при сохранении желаемого соотношения в селезенки и печени, несмотря на значительные структурные изменения, направленные на улучшение экспрессии. На Фиг. 36D показаны результаты контроля ФСБ. Эти данные демонстрируют улучшения, обеспечиваемые липидами 10b-15, 10a-53 и 10a-54 по сравнению с ранее описанными липидами, такими как 93-S14 и 22-S14.

ПРИМЕР 43

Доставка люциферазы

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) (Stemcell Technologies) трансфицировали липидными наночастицами (LNP), инкапсулирующими кольцевую РНК люциферазы светлячка (f.luc), и исследовали на экспрессию люциферазы. МКПК 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% сыворотки человека, IL-2 (10 нг/мл), и 50 мкМ BME. МКПК, инкубированные без LNP, использовали в качестве отрицательного контроля. Через 24 часа клетки лизировали и анализировали на экспрессию люциферазы светлячка на основе биолюминесценции (Promega BrightGlo).

Репрезентативные данные представлены на Фиг. 37A и 37B, демонстрирующие, что протестированные LNP способны доставлять кольцевую РНК в первичные иммунные клетки человека, что приводит к экспрессии белка.

ПРИМЕР 44

Доставка in vitro зеленого флуоресцентного белка (GFP) или химерного антигенного рецептора (CAR)

МКПК человека (Stemcell Technologies) трансфицировали LNP, инкапсулирующим GFP, и исследовали с помощью проточной цитометрии. МКПК от пяти разных доноров (МКПК 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% сыворотка человека, IL-2 (10 нг/мл), и 50 мкМ BME. МКПК, 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 мертвых клеток и полезной нагрузки (GFP или CD19-CAR).

Репрезентативные данные представлены на Фиг. 38A и 38B, демонстрирующие, что протестированные LNP способны доставлять кольцевую РНК в первичные иммунные клетки человека, что приводит к экспрессии белка.

ПРИМЕР 45

Множественные варианты IRES могут опосредовать экспрессию CD19 CAR мыши in vitro

Множественные кольцевые РНК-конструкции, кодирующие анти-CD19 CAR мыши, содержат уникальные последовательности IRES и были липотрансфецированы в клеточные линии 1C1C7. Перед липотрансфекцией клетки 1C1C7 размножали 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 белком мыши CD19 (Sino Biological), затем окрашивали вторичным антителом к His. После этого клетки анализировали с помощью проточной цитометрии.

Репрезентативные данные представлены на Фиг. 39, показывающей, что IRES, полученный из указанного вируса (пикорнавирус apodemus agrarius, кобувирус козы,

парабовирус и саливирус), способен стимулировать экспрессию антимышиного CD19 CAR в мышиных Т-клетках.

ПРИМЕР 46

CD19 CAR мыши опосредует уничтожение опухолевых клеток in vitro

Кольцевую РНК, кодирующую антиCD19 CAR мыши, электропорировали в Т-клетки мыши для оценки цитотоксичности, опосредованной CAR. Для электропорации Т-клетки подвергали электропорации кольцевой РНК, кодирующей анти-CD19 CAR мыши, с использованием системы трансфекции Neon ThermoFisher, затем оставляли на ночь. Для анализа цитотоксичности электропорированные Т-клетки совместно культивировали с клетками-мишенями Fluc+ и клетками, не являющимися мишенями, при 1:1 соотношение в полном RPMI, содержащем 10% FBS, IL-2 (10 нг/мл), и 50 мкМ BME и инкубировали в течение ночи при 37°C. Цитотоксичность измеряли с использованием 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.

Репрезентативные данные представлены на Фиг. 40, показывающей, что антиCD19 CAR мыши, экспрессируемый кольцевой РНК, является функциональным в Т-клетках мыши in vitro.

ПРИМЕР 47

Функциональное истощение В-клеток инкапсулированной в липид кольцевой РНК, кодирующей CD19 CAR мыши

C57BL/6J мышам инъецировали LNP, образованные Липидом 10b-15, инкапсулирующими кольцевую РНК, кодирующую анти-CD19 CAR мыши. В качестве контроля Липид 10b-15, инкапсулирующий кольцевую РНК, кодирующую люциферазу светлячка (f.Luc), вводили другим группам мышей. Самкам C57BL.6J массой 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, TCRvb, B220, CD11b и антимышиный CAR. Через два дня после последней инъекции селезенки собирали и обрабатывали для анализа проточной цитометрией. Спленоциты окрашивали на фиксируемые живые/мертвые, CD45, TCRvb, B220, CD11b, NK1,1, F4/80, CD11c и антимышиный CAR. Данные от мышей, которым вводили анти-CD19 CAR мыши LNP, нормализовали по мышам, которым вводили f.Luc LNP.

Репрезентативные данные представлены на Фиг. 41A, 41B и 41C, демонстрирующие, что антимышиный CD19 CAR, экспрессируемый кольцевой кольцРНК, доставляемой in vivo с LNP, является функциональным в Т-клетках мыши in vivo.

ПРИМЕР 48

CD19 CAR, экспрессируемый из кольцевой РНК, имеет более высокий выход и больший цитотоксический эффект по сравнению с таковым, экспрессируемым из мРНК.

Электропорировали кольцевую РНК, кодирующую химерный антигенный рецептор анти-CD19, который включает, от N-конца к С-концу, scFv, полученный из FMC63, трансмембранный домен CD8, костимулирующий домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3ζ. в периферические Т-клетки человека для оценки поверхностной экспрессии и CAR-опосредованной цитотоксичности. Для сравнения, в этом эксперименте Т-клетки с электропорацией кольцевой РНК сравнивали с Т-клетками с электропорацией мРНК. Для электропорации CD3+ Т-клетки выделяли из МКПК человека с использованием коммерчески доступных наборов для выделения Т-клеток (Miltenyi Biotec) из донорских МКПК человека. После выделения Т-клетки стимулировали анти-CD3/анти-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 РНК, кодирующей античеловеческий CD19 CAR, с использованием системы Neon Transfection System ThermoFisher, и затем оставляли на ночь. Для анализа цитотоксичности электропорированные Т-клетки совместно культивировали с клетками-мишенями Fluc+ и клетками, не являющимися мишенями, при 1:1 соотношение в полном RPMI, содержащем 10% FBS, IL-2 (10 нг/мл), и 50 мкМ BME и инкубировали в течение ночи при 37°C. Цитотоксичность измеряли с использованием 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 фиксируемого окрашивания на живые/мертвые клетки, CD3, CD45 и химерные антигенные рецепторы (FMC63).

Репрезентативные данные представлены на Фиг. 42 и 43. На Фиг. 42A и 42B показано, что античеловеческий CD19 CAR, экспрессируемый из кольцевой РНК, экспрессируется на более высоких уровнях и дольше, чем античеловеческий CD19 CAR, экспрессируемый из линейной мРНК. На Фиг. 43A и 43B показано, что античеловеческий CD19 CAR, экспрессируемый из кольцевой РНК, оказывает большее цитотоксическое действие по сравнению с античеловеческим CD19 CAR, экспрессируемым из линейной мРНК.

ПРИМЕР 49

Функциональная экспрессия двух CAR из одной кольцевой РНК

Кольцевую 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 приобретали (Cellero) и стимулировали с помощью анти-CD3/анти-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 четыре дня после стимуляции Т-клетки подвергали электропорации кольцевой РНК, кодирующей анти-человеческий

CD19 CAR, анти-человеческий CD19 CAR-2A-анти-человеческий BCMA CAR и анти-человеческий CD19 CAR-IRES-анти-человеческий BCMA CAR с использованием ThermoFisher's Neon. Затем систему трансфекции оставляли на ночь. Для анализа цитотоксичности электропорированные Т-клетки совместно культивировали с Fluc+ K562 клетками экспрессирующими антигены CD19 или BCMA человека, при 1:1 соотношение в полном RPMI, содержащем 10% FBS, IL-2 (10 нг/мл), и 50 мкМ BME и инкубировали в течение ночи при 37°C. Цитотоксичность измеряли с использованием системы анализа люциферазы через 24 часа после совместного культивирования (Promega BrightGlo Luciferase System) для обнаружения лизиса клеток-мишеней Fluc+.

Репрезентативные данные представлены на Фиг. 44, демонстрируя, что два CAR могут быть функционально экспрессированы из одной и той же конструкции кольцевой РНК и проявлять цитотоксическую эффекторную функцию.

ПРИМЕР 50

Трансфекция кольцевой РНК in vivo с использованием репортерных мышей Cre

Кольцевые РНК, кодирующие рекомбиназу Cre (Cre), инкапсулировали в липидные наночастицы, как описано ранее. Самкам, возраст 6-8 недель B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Гце/J (Ai9) мышей 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 селезенки в суспензию отдельных клеток и окрашивали различными антителами, конъюгированными с флуорофором, для иммунофенотипирования с помощью проточной цитометрии.

На Фиг. 45A показаны репрезентативные графики FACS с частотами экспрессии tdTomato в различных субпопуляциях иммунных клеток селезенки (CD45+, живых), включая тотальные миелоидные (CD11b+), B-клетки (CD19+), и Т-клетки (TCR-B+) после обработки LNP, образованными Липидом 10a-27 или Липидом 10a-26 или Липидом 10b-15. Мыши Ai9, которым вводили ФСБ, представляли собой популяцию с фоновой флуоресценцией tdTomato. На Фиг. 45B количественно определено долю миелоидных клеток, B-клеток и Т-клеток, экспрессирующих tdTomato (среднее+станд. откл., n=3), что соответствует доле каждой клеточной популяции, успешно трансфицированной кольцевой РНК Cre. LNP, полученные с использованием Липидов 10a-27 и 10a-26, демонстрируют значительно более высокую миелоидную и Т-клеточную трансфекцию по сравнению с Липидом 93-S14, что подчеркивает улучшения, обеспечиваемые модификациями структуры липидов.

На Фиг. 45C показана доля дополнительных популяций иммунных клеток селезенки, экспрессирующих tdTomato с Липидами 10a-27 и 10a-26 (среднее+станд. откл., 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 10a-27 и 10a-26 и липидом 10b-15, эффективны для доставки кольцевых РНК ко многим субпопуляциям иммунных клеток селезенки у мышей и приводят к успешной экспрессии белка из кольцевой РНК в этих клетках.

ПРИМЕР 51

Пример 51A: Встроенные полиА-последовательности и аффинная очистка для получения иммуномолчащей кольцевой РНК

Последовательности полиА (20-30 нуклеотидов) встраивали в 5'- и 3'-концы РНК-конструкции (РНК-предшественник со встроенными последовательностями полиА в интронах). РНК-предшественник и интроны альтернативно могут быть полиаденилированы посттранскрипционно с использованием, например, E. coli. полиА-полимеразы или дрожжевой полиА-полимеразы, которая требует использования дополнительного фермента.

Кольцевую РНК в этом примере циркулировали с помощью транскрипции in vitro (IVT) и аффинно очищали путем промывки на коммерчески доступной смоле oligo-dT для селективного удаления полиА-меченых последовательностей (включая свободные интроны и РНК-предшественники) из реакции сплайсинга. IVT выполняли с помощью коммерческого набора IVT (New England Biolabs) или специально подобранной смеси IVT (Orna Therapeutics), содержащей гуанозинмонофосфат (ГМФ) и гуанозинтрифосфат (ГТФ) в различных соотношениях (ГМФ:ГТФ=8, 12,5 или 13,75). В некоторых вариантах реализации ГМФ при высоком соотношение ГМФ:ГТФ может быть предпочтительно включено в качестве первого нуклеотида, что дает большинство РНК-предшественников, покрытых монофосфатом. Для сравнения, продукт кольцевой РНК альтернативно очищали обработкой Xrn1, РНКазой R и ДНКазой I (ферментная очистка).

Затем оценивали иммуногенность кольцевых РНК, полученных с использованием способа 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 пустыми образцами с помощью количественной ПЦР. 3p-hpRNA, трифосфорилированную РНК, использовалу в качестве положительного контроля.

На Фиг. На 46B и 46C показано, что аффинная очистка с отрицательным отбором удаляет некольцевые продукты из реакций сплайсинга, когда полиА-последовательности 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 свидетельствуют о том, что аффинная очистка с отрицательным отбором эквивалентна или превосходит ферментную очистку для очистки кольцевой РНК, и что индивидуальные условия синтеза кольцевой РНК (условия IVT) могут снизить зависимость от избытка ГМФ для достижения максимального иммуномолчания.

Пример 51B: Специальный сайт связывания и аффинная очистка для получения кольцевой РНК

Вместо полиА-тегов можно включать специфически разработанные последовательности (DBS, выделенный сайт связывания).

Вместо полиА-метки можно использовать специальный сайт связывания (DBS), такой как специально разработанный комплементарный олигонуклеотид, который может связываться со смолой, для селективного истощения РНК-предшественника и свободных интронов. В этом примере последовательности DBS (30 нуклеотидов) были вставлены в 5'- и 3'-концы РНК-предшественника. РНК транскрибировали, и транскрибированный продукт промывали специальным комплементарным олигонуклеотидом, связанным со смолой.

На Фиг. 47B и 47C показано, что включение разработанной последовательности DBS в элементы, которые удаляются во время сплайсинга, позволяет удалять несплайсированные РНК-предшественники и свободные интронные компоненты в реакции сплайсинга посредством очистки с отрицательной аффинностью.

Пример 51C: Получение кольцевой РНК, кодирующей дистрофин

Кольцевую РНК длиной 12 т.п.н. 12000 п.н., кодирующую дистрофин, получали путем транскрипции предшественников РНК in vitro с последующей очисткой фермента с использованием смеси Xrn1, ДНКазы 1 и РНКазы R для деградации оставшихся линейных компонентов. На Фиг. 48 показано, что кольцевая РНК, кодирующая дистрофин, была успешно получена.

ПРИМЕР 52

5'-спейсер между 3'-фрагментом интрона и IRES улучшает экспрессию кольцевой РНК

Сравнивали уровень экспрессии очищенных кольцРНК 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 250 нкг каждого вида РНК.

Дополнительно, сравнивали стабильность очищенных кольцРНК с различными 5'-спейсерами между 3'-интронным фрагментом и IRES в клетках Jurkat. Вкратце, люминесценцию секретируемой люциферазы Gaussia в супернатанте измеряли через 2 дня после электропорации 60000 клеток 250 нкг каждого вида РНК и нормализировали к 1 дню экспрессии.

Результаты показаны на Фиг. 49A и 49B, 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 53

В этом примере описано делеционное сканирование с 5’- или 3’-конца IRES кобувируса 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 созданы с укороченными элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей люциферазу gaussia. У укороченных элементов IRES 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.

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.

Также было замечено, что делеция 6-нуклеотидной престартовой последовательности снижала уровень экспрессии репортерной люциферазы. Замена 6-нуклеотидной последовательности классической последовательностью Козак (GCCACC) не оказала существенного влияния, но, по крайней мере, сохранила экспрессию.

ПРИМЕР 54

В этом примере описаны модификации (например, укорочения) выбранных последовательностей IRES, включая IRES кобувируса козы (CKV), IRES парабовируса, IRES пикорнавируса Apodemus (AP), IRES кобувируса SZAL6, IRES крохивируса B (CrVB), IRES CVB3 и IRES SAFV. Последовательности элементов IRES представлены в SEQ ID NO: 348-389. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были созданы 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.

Как показано на Фиг. 51, усечения имеют разные эффекты в зависимости от идентичности IRES, которые могут 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 CKV IRES. Добавление канонической последовательности Козак в некоторых случаях значительно улучшало экспрессию (как в SAFV, Full vs. Full+K) или снижало экспрессия (как при CKV, 5d40/3d122 vs 5d40/3d122+K).

ПРИМЕР 55

В этом примере описаны модификации последовательностей IRES CK-739, AP-748 и PV-743, включая мутации альтернативных сайтов инициации трансляции. Вкратце,

конструкции кольцевой РНК были созданы 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 1C1C7 клеток с РНК.

CUG был наиболее часто встречающимся альтернативным начальным сайтом, но были охарактеризованы и многие другие. Эти триплеты могут присутствовать в тракте сканирования IRES перед стартовым кодоном и могут влиять на трансляцию правильных полипептидов. Были созданы 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 CK-739 влияли на трансляцию правильных полипептидов, положительно в некоторых случаях и отрицательно в других случаях. Мутация всех альтернативных сайтов инициации трансляции снижала уровень трансляции.

Альтернативные последовательности Козак, за 6 нуклеотидов до стартового кодона, также могут влиять на уровни экспрессии. 6-нуклеотидная последовательность перед стартовым кодоном представляла собой gTcacG, aaagtc, gTcacG, gtcatg, gcaaac и acaacc, соответственно, в CK-739 IRES и образцах № 1-5 в группе «6nt Pre-Start». Как показано на Фиг. 52, замена некоторых 6-нуклеотидных последовательностей перед стартовым кодоном влияла на трансляцию.

Также было замечено, что 5’- и 3’-концевые делеции в последовательностях IRES AP-748 и PV-743 снижали экспрессию. Однако в CK-739 IRES, который имел длинный тракт сканирования, делеции в тракте сканирования относительно не влияли на трансляцию.

ПРИМЕР 56

В этом примере описываются модификации выбранных последовательностей IRES путем вставки 5’ и/или 3’-нетранслируемые области (UTR) и создание гибридов IRES. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были созданы 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 HepG2 клеток с РНК.

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 инициирующим кодоном незначительно увеличивала трансляцию IRES кобувируса козы (CK), но в некоторых случаях останавливала трансляцию IRES саливируса SZ1. Вставка 3’-UTR сразу после стоп-кассеты не влияла на обе последовательности IRES.

Гибридные последовательности CK IRES представлены в SEQ ID NO: 390-401. CK IRES использовали в качестве основы, а отдельные участки CK IRES заменяли аналогичными структурами из других последовательностей IRES, например, SZ1 и AV (Аичивирус). 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, тогда как удаление этих структур полностью останавливает функцию IRES.

ПРИМЕР 57

В этом примере описываются модификации кольцевых РНК путем введения вариантов стоп-кодона или кассеты. Вкратце, кольцевые РНК-конструкции были созданы с элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей люциферазу gaussia, за которыми следовали кассеты вариабельных 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.

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 рамки 1 (рамка считывания кодирующей последовательности люциферазы gaussia), первым из которых является TAA, за которым следуют стоп-кодон рамки 2 и стоп-кодон рамки 3, эффективна для стимулирования функциональной трансляции.

ПРИМЕР 58

В этом примере описываются модификации кольцевых РНК путем вставки вариантов 5'UTR. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были созданы 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.

Последовательности вариантов 5'-UTR представлены в SEQ ID NO: 402-405. Как показано на Фиг. 55, CK IRES с канонической последовательностью Козак (UTR4) был более эффективным, когда была добавлена 36-нуклеотидная неструктурированная/обедненная на GC спейсерная последовательность (UTR2), что свидетельствует о том, что обогащенные на GC последовательности Козак могут мешать фолдингу ядра IRES. Использование с повышенным содержанием-GC/структурированный спейсер с последовательностью Козак не продемонстрировало такой же пользы (UTR3), возможно, из-за вмешательства в упаковку IRES самим спейсером. Мутация последовательности Козак в gTcacG (UTR1) усиливала трансляцию до того же уровня, что и Козак+альтернатива спейсеру без спейсера.

ПРИМЕР 59

В этом примере описывается влияние сайтов-мишеней микроРНК в кольцевых РНК на уровни экспрессии. Вкратце, конструкции кольцевой РНК были созданы с элементами IRES, функционально связанными с последовательностью, кодирующей эритропоэтин человека (hEPO), где в конструкцию были вставлены 2 тандемных сайта-мишени miR-122. Клетки Huh7, экспрессирующие miR-122, трансфицировали кольцевыми РНК. Экспрессию

hEPO в супернатанте оценивали через 24 и 48 часов после трансфекции с помощью сэндвич-ИФА.

Как показано на Фиг. 56, уровень экспрессии hEPO был нарушен, когда сайты-мишени miR-122 были вставлены в кольцевую РНК. Этот результат демонстрирует, что экспрессия кольцевой РНК может регулироваться микроРНК. Таким образом, специфичная для типа клеток или ткани экспрессия может быть достигнута за счет включения сайтов-мишеней микроРНК, экспрессируемых в типах клеток, в которых экспрессия рекомбинантного белка нежелательна.

ПРИМЕР 60

В этом примере показана трансфекция опухолевых клеток человека с помощью LNP in vitro. Клетки SupT1 (линия Т-клеток опухоли человека) и клетки MV4-11 (линия опухоли макрофагов человека) высевали в количестве 100000 клеток/лунку и 100000 клеток/лунку соответственно в 96-луночный планшет в течение ночи. Затем к клеткам добавляли LNP, содержащие кольцевую РНК, кодирующую люциферазу светлячка (FLuc), в количестве 200 нг РНК/лунку. После 24-часовой инкубации люминесценцию количественно определяли с использованием системы анализа люциферазы Bright-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя и вычитали фоновую люминесценцию клеток, не обработанных LNP. **Фиг. 57** количественно оценивает измеренную люминесценцию Firefly, указывая на то, что LNP, содержащие липид 10a-27 (10a-27 (4,5D) LNP, см. Пример 70) или липид 10a-26 (10a-26 (4,5D) LNP, см. Пример 70), могут трансфицировать и экспрессируют кольцРНК как в Т-клетках человека, так и в макрофагальных опухолевых линиях in vitro. 10a-27 (4,5D) LNP приводил к более высокой люминесценции, чем 10a-26 (4,5D) LNP, что свидетельствует о том, что состав может влиять на уровень трансфекции LNP в опухолевые клетки человека.

ПРИМЕР 61

В этом примере показана трансфекция первичных активированных Т-клеток человека in vitro. Первичные Т-клетки человека от независимых доноров стимулировали с помощью aCD3/aCD28 и позволяли пролиферировать в течение 6 дней в присутствии сыворотки человека и IL-2. Затем 100000 клеток высевали в 96-луночный планшет и к клеткам добавляли LNP, содержащие кольцРНК, кодирующую люциферазу светлячка (FLuc), в количестве 200 нг РНК/лунку с аполипопротеином E3 (ApoE3) или без него. После 24-часовой инкубации люминесценцию количественно определяли с использованием системы анализа люциферазы Bright-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя и вычитали фоновую люминесценцию клеток, не обработанных LNP. **Фиг. 58** показывает измеренную люминесценцию Firefly у 4 независимых доноров, демонстрируя, что все протестированные LNP трансфицируют первичные Т-клетки человека in vitro. LNP, содержащие липид 10a-27, обычно вызывали более высокую люминесценцию, чем, содержащие липид 10a-26. Кроме того, добавление ApoE3 обычно увеличивало экспрессию люциферазы в большей степени для 10a-27 (5,7A) и 10a-26 (5,7A) (в среднем в 4,4 раза и 9,3 раза для 4 доноров соответственно) по сравнению с 10a-27 (4,5D)

и 10a-26 (4,5D) (в 3,1 и 2,6 раза соответственно). Это говорит о том, что хелперный липид, ПЭГ-липид и соотношение ионизируемых липидов и фосфатов вносят свой вклад в ApoE-зависимость различных составов, изготовленных с одними и теми же ионизируемыми липидами. (См. Пример 70 для процедуры составления LNP, например, для LNP 10a-27 (5.7A), 10a-26 (5.7A), 10a-27 (4.5D) и 10a-26 (4.5D).)

ПРИМЕР 62

Этот пример показывает, что разный химический состав хвостов LNP приводит к разным механизмам поглощения Т-клетками. Для количественного определения процента Т-клеток человека, экспрессирующих кольцРНК, LNP, содержащие кольцРНК eGFP, добавляли к активированным первичным Т-клеткам человека (полученным, как описано выше в **Примере 61**) в количестве 200 нг РНК/лунку с ApoE3 или без него. После 24-часовой инкубации клетки анализировали с помощью проточной цитометрии и количественно определяли процент живых GFP+ Т-клеток. **На Фиг. 59** представлены графики %GFP+ Т-клеток для 2 независимых доноров, где 5-10% клеток представляют собой GFP+ для LNP, содержащих липид 10a-27 (10a-27 (4.5D) LNP, см. Пример 70) и для LNP, содержащих липид 10a-46. (10a-46 (5.7A) LNP, см. Пример 70). Хотя добавление ApoE3 приводило к усилению трансфекции для 10a-27 (4.5D) LNP, оно, по-видимому, не увеличивало трансфекцию для 10a-46 (5.7A) LNP, предполагая, что различный химический состав хвостов между липидами 10a-27 и 10a-46 может опосредовать Различные механизмы захвата Т-лимфоцитами.

ПРИМЕР 63

В этом примере описывается экспрессия Cre иммунными клетками в модели репортерных мышей Cre.

Мышам Ai9 (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Гце/J, самки, 6-8 недель, n=3 в группе) внутривенно вводили 0,5 мг/кг Cre кольцРНК LNP или ФСБ. Мыши Ai9 транскрибируют и транслируют флуоресцентный репортер tdTomato при рекомбинации Cre; это означает, что клетки, которые являются tdTomato+, были успешно трансфицированы кольцРНК Cre. Через 48 часов мышей подвергали эвтаназии, собирали их селезенки и вручную перерабатывали в суспензии отдельных клеток. Спленоциты окрашивали на мертвые клетки (LiveDead Fixable Aqua, Thermo) и антимышиными антителами (цепь TCR-B, BV421, H57-597; CD45, BV711, 30-F11; CD11b, BV785, ICRF44; NKp46, AF647, 29A1.4; CD19, APC/750, 6D5; TruStain FcX, 93; все антитела от Biolegend) в соотношении 1:200. Проточную цитометрию проводили с использованием проточного цитометра Attune Nxt (Thermo).

Процент клеток tdTomato+ в миелоидных клетках селезенки (CD11b+), В-клетках (CD19+) и Т-клетках (TCR-B+) представлен на **Фиг. 60**. Липид 10a-27 и липид 10a-46 отличаются только химическим составом их хвостов, и составы, приготовленные с липидом 10a-27, трансфицируют значительно больше иммунных клеток селезенки, чем составы, приготовленные с липидом 10a-46. Кроме того, LNP 10a-27 (4.5D) (см. Пример 70), приготовленные с Cre кольцРНК, трансфицировали около в два раза больше Т-клеток, чем

те, которые были приготовлены с Cre линейной мРНК, что позволяет предположить, что кольцРНК может приводить к улучшенной экспрессии белка в Т-клетках селезенки по сравнению с линейными мРНК.

Таблица 17. Характеристика LNP

Формулировка	Z-среднее (нм)	PDI	Эффективность инкапсуляции РНК (%)
10a-27 (4.5D), Исследование 1	65	0,07	96
10a-26 (4.5D), Исследование 1	74	0,06	94
10a-27 (4,5D), с mCre, Исследование 1	75	0,05	93
10a-46 (5.7A), Исследование 2	86	0,01	94

ПРИМЕР 64

В этом примере показана экспрессия кольцРНК mOX40L иммунными клетками у мышей дикого типа.

Мышам C57BL/6 (самкам, 6-8 недель, n=3 или 4 в группе) внутривенно вводили 0,5 мг/кг mOX40L кольцРНК LNP или ФСБ. Через 24 часа мышей подвергали эвтаназии, собирали их селезенки и вручную перерабатывали в суспензии отдельных клеток. Спленоциты окрашивали на мертвые клетки (LiveDead Fixable Aqua, Thermo) и антимышиными антителами (цепь TCR-B, PacBlue, H57-597; CD11b, FITC, ICRF44; B220, PE, RA3-6B2; CD45, PerCP, 30 -F11; mOX40L, AF647, RM134L; NK1.1, APC/750, PK136; TruStain FcX, 93; все антитела от Biolegend) в соотношении 1:200. Проточную цитометрию проводили с использованием проточного цитометра Attune Nxt (Thermo).

Процент клеток mOX40L+ в миелоидных клетках селезенки (CD11b+), Т-клетках (TCR-B+) и NK-клетках (NK1.1+) представлен на **Фиг. 61**. Примечательно, что между одними и теми же составами, введенными внутривенно в разных буферах (гипотонический ФСБ, изотонический ФСБ и изотонический TBS), наблюдаются значительно различающиеся эффективности трансфекции. 10a-27 4,5D LNP в гипотоническом ФСБ приводит к около 14% трансфекции миелоидных клеток, 6% трансфекции Т-клеток и 21% трансфекции NK-клеток в селезенке. Из составов, введенных в изотоническом буфере, 10a-27 DSPC 5.7A LNP демонстрирует миелоидную, Т-клеточную и NK-клеточную трансфекцию в селезенке (9%, 3% и 8% соответственно). (См. Пример 70 для процедуры составления LNP, например, для 10a-27 (4.5D) LNP и 10a-27 DSPC (5.7A) LNP.)

Таблица 18. Характеристика LNP

Формулировка	Z-среднее (нм)	PDI	Эффективность инкапсуляции РНК (%)
10a-27 (4.5D)	63	0,02	93
10a-26 (4.5D)	67	0,07	94

10a-27 DSPC (5.7A)	82	0,05	96

ПРИМЕР 65

В этом примере описано повышение однократной дозы mOX40L кольцРНК-LNP у мышей дикого типа.

Мышам 57BL/6 (самкам, 6-8 недель, n=3 в группе) внутривенно вводили 1 мг/кг или 3 мг/кг mOX40L кольцРНК LNP или контрольный буфер. Через 24 часа мышей подвергали эвтаназии, собирали их селезенки и вручную перерабатывали в суспензии отдельных клеток. Спленоциты окрашивали на мертвые клетки (LiveDead Fixable Blue, Thermo) и окрашивали антимышиными антителами (цепь TCR-B, BV421, H57-597; CD19, BV605, 6D5; CD45, BV711, 30-F11; CD11b, BV785, ICRF44; CD11c, FITC, N418; CD8a, PerCP, 53-6,7; mOX40L, PE, RM134L; NKp46, AF647, 29A1.4; CD4, APC/750, GK1.5; TruStain FcX, 93; все антитела от Biolegend) в 1:200. Проточную цитометрию выполняли с использованием проточного цитометра BD FACSSymphony.

Процент клеток mOX40L+ в Т-клетках селезенки (все TCR-B+), Т-клетках CD4+ (TCR-B+, CD4+), Т-клетках CD8+ (TCR-B+, CD8a+), В-клетках (CD19+), NK-клетках (NKp46+), дендритных клетках (CD11c+) и другие миелоидных клетках (CD11b+, CD11c-) показан на **Фиг. 62A** и **Фиг. 62B**, с соответствующим изменением массы тела мыши через 24 часа, показанным на **Фиг.** 62C. Дозозависимое увеличение трансфекции субпопуляции иммунных клеток наблюдается при дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг для всех групп, за исключением группы 10a-27 (4,5D) LNP 1x ФСБ. В дозе 3 мг/кг три разных LNP (10a-27 (4,5D) в TBS, 10a-26 (4,5D) в ФСБ и 10a-27 DSPC (5,7A) в TBS; см. Пример 70 для получения информации о процедурах составления) достигают 10-20% трансфекции mOX40L в Т-клетках селезенки с аналогичными показателями трансфекции, наблюдаемыми среди субпопуляций CD4+ и CD8+. Эти три состава также приводят к около 20% трансфекции В-клеток, 60-70% дендритных клеток, 60-70% NK-клеток и 30-40% других миелоидных клеток mOX40L в селезенке при дозе 3 мг/кг. Эти три состава приводят лишь к незначительной (0-3%) потере массы тела мыши через 24 часа при однократной дозе 3 мг/кг без сообщений о клинических наблюдениях.

Таблица 19 Характеристика LNP

Состав	Z-среднее (нм)	PDI	Эффективность инкапсуляции РНК (%)
10a-27 (4.5D)	76	0,06	91
10a-26 (4.5D)	67	0,01	88
10a-27 DSPC (5.7A)	77	0,01	93

ПРИМЕР 66

В этом описано показано истощение В-клеток, опосредованное кольцРНК-LNP CAR, у мышей.

Мышам C57BL/6 (самкам, 6-8 недель, n=5 в группе) внутривенно вводили 0,5 мг/кг LNP циклической РНК aCD19-CAR или контрольные LNP кольцевой РНК FLuc в дни 0, 2,

5, 7 и 9. В дни -1, 1, 8 и 12 выполняли подчелюстные кровотечения для сбора крови. 30 мкл крови лизировали лизирующим буфером ACK и промывали буфером MACS для выделения иммунных клеток. На 12 день мышей подвергали эвтаназии, собирали их селезенки и вручную перерабатывали в суспензии отдельных клеток. Для оценки частоты B-клеток в крови и селезенке эти суспензии отдельных клеток окрашивали на наличие мертвых клеток (LiveDead Fixable Aqua, Thermo) и окрашивали антимышиными антителами (цепь TCR-B, PacBlue, H57-597; CD11b, FITC, ICRF44; B220, PE, RA3-6B2; CD45, PerCP, 30-F11; TruStain FcX, 93; все антитела от Biolegend) в соотношении 1:200. Проточную цитометрию проводили с использованием проточного цитометра Attune NxT (Thermo).

На **Фиг. 63A** количественно показано истощение B-клеток, наблюдаемое в этом исследовании, определяемое процентным содержанием B220+ B-клеток живых CD45+ иммунных клеток. Истощение B-клеток в группе LNP aCD19-CAR кольцРНК сравнивали с соответствующим контролем FLuc кольцРНК LNP на 8 и 12 дни (для крови) и на 12 день (для селезенки). В крови LNP aCD19-CAR 10a-27 (4,5D) и 10a-26 (4,5D) приводили к снижению %B220+ живых CD45+ на около 28% и 17% соответственно на 8 день по сравнению с контролем FLuc. В селезенке LNP aCD19-CAR 10a-27 (4,5D) и 10a-26 (4,5D) приводили к около 5% и 9% снижению %B220+ живых CD45+ на 12 день по сравнению с контролем FLuc, как показано на **Фиг.** 63B. В целом эти результаты свидетельствуют о том, что CAR-опосредованное истощение B-клеток происходит у мышей, получавших LNP aCD19-CAR кольцРНК для липидов 10a-27 (4,5D) и липидов 10a-26 (4,5D).

Кроме того, на **Фиг. 63C** показано процентное увеличение массы тела мышей в этом исследовании. У мышей, получавших 10a-27 4.5D или 10a-26 4.5D LNP (5×0,5 мг/кг в течение 9 дней), в среднем не наблюдалось значительной потери массы тела, что позволяет предположить, что эти LNP могут хорошо переноситься мышами в этой дозе и этой схеме введения.

Таблица 20 Характеристика LNP

Состав	Z-среднее (нм)	PDI	Эффективность инкапсуляции РНК (%)
10a-27 (4.5D), oLuc	65	0,03	93
10a-27 (4.5D), oaCD19-CAR	74	0,02	96
10a-26 (4.5D), oLuc	71	0,04	91
10a-26, (4.5D), oaCD19-CAR	71	0,04	93

ПРИМЕР 67

LNP и конструкция кольцевой РНК, содержащая анти-CD19 CAR, снижает количество B-клеток в крови и селезенке in vivo.

Конструкции кольцевой РНК, кодирующие экспрессию анти-CD19 CAR, инкапсулировали в липидные наночастицы, как описано выше. Для сравнения, кольцевые РНК, кодирующие экспрессию люциферазы, инкапсулировали в отдельные липидные наночастицы.

C57BL/6 мышам в возрасте от 6 до 8 недель вводили любой раствор LNP через день, всего 4 инъекции LNP каждой мыши. Через 24 часа после последней инъекции LNP у мышей собирали селезенку и кровь, окрашивали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фиг. **64A** и Фиг. **64B**, мыши, содержащие конструкции LNP-кольцевой РНК, кодирующей анти-CD19 CAR, имели статистически значимое снижение уровня CD19+ B-клеток в периферической крови и селезенке по сравнению с мышами, получавшими LNP-кольцевую РНК, кодирующую люциферазу.

ПРИМЕР 68

Последовательности IRES, содержащиеся в кольцевой РНК, кодирующей CAR, улучшают экспрессию CAR и цитотоксичность Т-клеток.

Активированные Т-клетки мыши подвергали электропорации с 200 нг конструкций кольцевой РНК, содержащих уникальный IRES и экспрессионную последовательность анти-CD19 1D3ζ CAR мыши. IRES, содержащиеся в этих конструкциях, были получены полностью или частично из кобувируса коз, пикорнавируса коз, парабовируса или саливируса. IRES, полученный из кобувируса козы, дополнительно оптимизировали по кодонам. В качестве контроля для сравнения использовали кольцевую РНК, содержащую дикого типа дзета CAR мыши дбез 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 анализ оценивали на цитотоксическое уничтожение клеток Fluc+ A20 через 24 часа после совместного культивирования Т-клеток с клетками-мишенями.

Как видно на **Фиг. 65A**, **65B**, **65C** и **66**, уникальные IRES были способны увеличивать 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 69

Цитозольные и поверхностные белки, экспрессированные кольцевой конструкцией РНК в первичных Т-клетках человека.

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 Thy1.1^{bio}. Первичные Т-клетки человека активировали с помощью анти-CD3/анти-CD28 антитело 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).

Как видно на **Фиг. 67A** и **Фиг. 67B**, цитозольные и поверхностные белки могут экспрессироваться из кольцевой РНК, кодирующей белки в первичных Т-клетках человека.

ПРИМЕР 70

Циклические РНК, содержащие уникальные последовательности IRES, обладают улучшенной трансляционной экспрессией по сравнению с линейными мРНК.

Конструкции кольцевой РНК содержали уникальный IRES вместе с последовательностью экспрессии люциферазы Firefly (FLuc).

Т-клетки человека от 2 доноров были обогащены и стимулированы анти-CD3/анти-CD28 антителами. После нескольких дней пролиферации активированные Т-клетки собирали и подвергали электропорации с равным молярным содержанием либо мРНК, либо кольцевой РНК, экспрессирующих полезные нагрузки FLuc. Различные последовательности IRES, в том числе полученные из кобувируса коз, пикорнавируса Apodemus и парабовируса, были изучены для оценки уровня экспрессии и продолжительности экспрессии полезной нагрузки в течение 7 дней. В течение 7 дней Т-клетки лизировали с помощью Promega Brightglo для оценки биолюминесценции.

Как показано на **Фиг. 68C**, **68D**, **68E**, **68F, и 68G**, присутствие IRES в кольцевой РНК может увеличить трансляцию и экспрессию цитозольного белка на несколько порядков и может улучшить экспрессию по сравнению с линейной мРНК. Это было обнаружено у нескольких доноров Т-клеток человеа.

ПРИМЕР 71

Пример 71A: LNP-кольцевая РНК, кодирующая анти-CD19, опосредует уничтожение Т-клетками человека клеток K562.

Конструкции кольцевой РНК содержали последовательность, кодирующую анти-CD19-антитела. Затем кольцевые конструкции РНК инкапсулировали в липидные наночастицы (LNP).

Т-клетки человека стимулировали анти-CD3/анти-CD28 и оставляли для размножения до 6 дней. На 6 день LNP-кольцевую РНК и ApoE3 (1мкг/мл) добавляли и культивировали совместно с Т-клетками для опосредования трансфекции. Через 24 часа клетки Fluc+ K562 подвергали электропорации с 200 нг кольцевой РНК, кодирующей анти-CD19-антитела, а затем совместно культивировали на 7 день. Через 48 часов после совместного культивирования оценивали экспрессию CAR и цитотоксическое уничтожение клеток K562 посредством оценки экспрессии Fluc.

Как показано на **Фиг. 69A** и **Фиг. 69B**, имеется Т-клеточная экспрессия анти-CD19 CAR в результате LNP-опосредованной доставки CAR in vitro в Т-клетки и присутствует способность лизировать опухолевые клетки специфическим, антиген-зависимым образом в сконструированных клетках K562.

Пример 71B: LNP-кольцевая РНК, кодирующая антитело к BCMA, опосредует уничтожение Т-клетками человека клеток K562.

Конструкции кольцевой РНК содержали последовательность, кодирующую анти-BCMA антитела. Затем кольцевые конструкции РНК инкапсулировали в липидные наночастицы (LNP).

Т-клетки человека стимулировали анти-CD3/анти-CD28 и оставляли для размножения до 6 дней. На 6 день LNP-кольцевую РНК и ApoE3 (1мкг/мл) добавляли и культивировали совместно с Т-клетками для опосредования трансфекции. Через 24 часа клетки Fluc+ K562 подвергали электропорации с 200 нг кольцевой РНК, кодирующей анти-BCMA антитела, а затем совместно культивировали на 7 день. Через 48 часов после совместного культивирования оценивали экспрессию CAR и цитотоксическое уничтожение клеток K562 посредством экспрессии Fluc.

Как показано на **Фиг. 69B**, имеется Т-клеточная экспрессия BCMA CAR в результате LNP-опосредованной доставки CAR in vitro в Т-клетки и присутствует способность лизировать опухолевые клетки специфическим, антиген-зависимым образом в сконструированных клетках K562.

ПРИМЕР 72

Анти-CD19 CAR Т-клетки проявляют противоопухолевую активность in vitro.

Т-клетки человека активировали с помощью анти-CD3/анти-CD28 и однократно подвергали электропорации с 200 нг кольцевой РНК, экспрессирующей анти-CD19 CAR. Электропорированные Т-клетки культивировали совместно с клетками-мишенями FLuc+ Nalm6 и нецелевыми 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.

Как показано на **Фиг. 70A** и **70B**, 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 73

Эффективная трансфекция LNP кольцевой РНК, опосредованная ApoE3

Т-клетки человека стимулировали анти-CD3/анти-CD28 и оставляли для размножения до 6 дней. На 6 день липидную наночастицу (LNP) и кольцевую РНК, экспрессирующую раствор зеленого флуоресцентного белка, с или без ApoE3 (1мкг/мл) культивировали совместно с Т-клетками. Через 24 часа Т-клетки окрашивали на живые/мертвые Т-клетки и живые Т-клетки анализировали на экспрессию GFP на проточном цитометре.

Как показано на **Фиг. 71A**, **71B**, **71C**, **72D** и **71E**, эффективная трансфекция LNP может быть опосредована ApoE3 на активированных Т-клетках с последующей значительной экспрессией полезной нагрузки. Эти результаты были продемонстрированы у нескольких доноров.

ПРИМЕР 74

Пример 74A: Процедура составления липидных наночастиц

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания) можно использовать для определения размера частиц, индекса полидисперсности (PDI) и дзета-потенциала композиций переносчиков в 1×ФСБ при определении размера частиц и 15 мМ ФСБ при определении дзета-потенциала.

Ультрафиолетово-видимая спектроскопия может быть использована для определения концентрации терапевтического средства и/или профилактического средства (например, кольцРНК) в композициях переносчиков. 100 мкл разбавленного состава в 1×ФСБ добавляли к 900 мкл 4:1 (v/v) смесь метанола и хлороформа. После смешивания регистрировали спектр поглощения раствора, например, между 230 нм и 330 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Брэа, Калифорния). Концентрация терапевтического средства и/или профилактического средства в композиции переносчика может быть рассчитана на основе коэффициента экстинкции терапевтического средства и/или профилактического средства, используемого в композиции, и разницы между поглощением при длине волны, например, 260 нм, и исходным значением при длине волны, для например, 330 нм.

Для композиций переносчика, включающих РНК, можно использовать анализ РНК QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) для оценки инкапсуляции РНК композицией переносчика. Образцы разбавляли до концентрации около 5 мкг/мл или 1 мкг/мл в буферном растворе ТЕ (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5). 50 мкл разведенных образцов переносили в полистироловый 96-луночный планшет и в лунки добавляют либо 50 мкл ТЕ-буфера, либо 50 мкл 2-4%-ного раствора Тритона X-100. Планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 15 минут. Реактив RIBOGREEN® разводили 1:100 или же 1:200 в буфере ТЕ и в каждую лунку добавляли по 100 мкл этого раствора. Интенсивность флуоресценции можно измерить с помощью флуоресцентного планшетного ридера (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, Массачусетс) при длине волны возбуждения, например, около 480 нм, и при длине волны испускания, например, около 520 нм. Значения флуоресценции холостой пробы реагента вычитают из значений каждого из образцов и определяют процент свободной РНК путем деления интенсивности флуоресценции интактного образца (без добавления Тритона X-100) на значение флуоресценции разрушенного образца (вызвано добавлением Тритон X-100).

Пример 74B: Инкапсуляция РНК, общий поток и процентная экспрессия in vitro для состава ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:DSPE-PEG (2000) в соотношении 62:4:33:1.

Липидные наночастицы были приготовлены с использованием липидов 10a-27, 10a-26, 10a-46 или 10a-45 в соотношении ионизируемый липид:DOPE:холестерин:DSPE-PEG (2000) 62:4:33:1 мол.%, и инкапсулировали молекулу РНК при соотношении липид-азот-фосфат (N:P) 4,5. Экспрессия РНК присутствовала во всех составах. Присутсвовал более высокий общий поток и процент экспрессии внутри селезенки как показано на **Фиг. 72A** и **72B,** соответственно.

Состав	Ионизируемый липид	Вспомогательный липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид: Вспомогательный липид: Холестерин: ПЭГ-липид (мол. %)	Z-среднее (нм)	PDI	Эффективность инкапсуляции РНК (%)
10a-27 (4.5D)	Липид 10a-27	DOPE	ДСПЭ-ПЭГ (2000)	62:4:33:1	71	0,02	94
10a-26 (4.5D)	Липид 10a-26	DOPE	ДСПЭ-ПЭГ (2000)	62:4:33:1	71	0,04	92
10a-46 (4.5D)	Липид 10a-26	DOPE	ДСПЭ-ПЭГ (2000)	62:4:33:1	110	0,1	93
10a-45 (4.5D)	Липид 10a-25	DOPE	ДСПЭ-ПЭГ (2000)	62:4:33:1	157	0,13	83

Пример 74C: Инкапсуляция РНК, общий поток и процентная экспрессия in vitro для состава ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:ДМГ-ПЭГ (2000) в соотношении 50:10:38,5:1,5.

Липидные наночастицы были приготовлены с использованием липида 10a-46 или 10a-45 в соотношении ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:ДМГ-ПЭГ (2000) 50:10:38,5:1,5 мол.%, и инкапсулировали молекулу РНК при соотношение липид-азот - фосфат (N:P) 5,7. Экспрессия РНК присутствовала во всех составах. Присутсвовал более высокий общий поток и процент экспрессии внутри селезенки как показано на **Фиг. 72C** и **72D** соответственно.

Состав	Ионизируемый липид	Вспомогательный липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид: DOPE: Холестерин: ПЭГ-липид (мол. %)	Z-среднее (нм)	PDI	Эффективность инкапсуляции РНК (%)
10a-45 (5.7A)	Липид 10a-45	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	74	0,04	95

10a-46 (5.7A)	Липид 10a-46	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	84	0,04	96

Пример 74D: Инкапсуляция РНК, общий поток и процентная экспрессия in vitro для состава ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:ДМГ-ПЭГ (2000) в соотношении 50:10:38,5:1,5 или для ионизируемых липидов: Соотношение состава DSPC:холестерин:C_{14}-ПЭГ (2000) 35:16:46.2.5.

Липидные наночастицы были составлены с использованием Липида 10a-45 или 10a-46 в соотношении ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:ДМГ-ПЭГ (2000) 50:10:38,5:1,5 мол.% или в ионизируемом липиде: DSPC:холестерин:C_{14} -ПЭГ (2000) в соотношении 35:16:46,2,5 мол.% и инкапсулировали молекулу РНК при соотношении липид-азот-фосфат (N:P) 5,7 или 4,5. Экспрессия РНК присутствовала во всех составах. Присутсвовал более высокий общий поток и процент экспрессии внутри селезенки как показано на **Фиг. 72E** и **72F** соответственно.

Состав	Ионизируемый липид	Вспомогательный липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид: Вспомогательный липид: Холестерин: ПЭГ-липид (мол. %)	Z-среднее (нм)	PDI	Эффективность инкапсуляции РНК (%)
10a-45 DSPC (5.7E)	Липид 10a-45	DSPC	C_{14}-ПЭГ(2000)	35:16:46.2.5	56	0,22	94
10a-46 DSPC (5.7E)	Липид 10a-46	DSPC	C_{14}-ПЭГ(2000)	35:16:46.2.5	68	0,02	95
10a-46 (4.5A)	Липид 10a-46	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	91	0,13	93
10a-46 (5.7A)	Липид 10a-46	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	76	0,06	93

Пример 74E: Инкапсуляция РНК, общий поток и процентная экспрессия in vitro для ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:DSPE-PEG(2000) в соотношении 62:4:33:1 или для ионизируемых липидов:DSPC:холестерин:DMG-PEG(2000) соотношение состава 50:10:38,5:1,5.

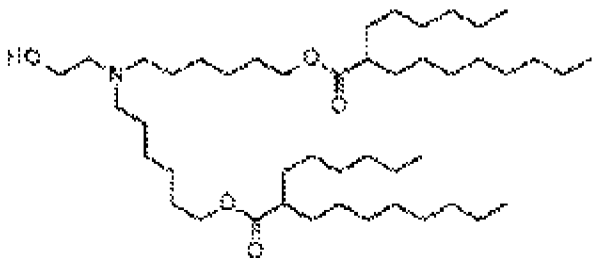
Липидные наночастицы были приготовлены с использованием Липида 10a-26 или 10a-27 в соотношении ионизируемый липид:DOPE:холестерин:DSPE-PEG (2000) 62:4:33:1 мол.% (инкапсулируя молекулу РНК при соотношении N:P 4,5) или соотношение

ионизируемых липидов:DSPC:холестерин:DMG-ПЭГ (2000) 50:10:38,5:1,5 мол.% (инкапсулируя молекулу РНК при соотношении N:P 5,7). Экспрессия РНК присутствовала во всех составах. Присутсвовал более высокий общий поток и процент экспрессии внутри селезенки как показано на **Фиг. 72G** и **72H** соответственно.

Состав	Ионизируемый липид	Вспомогательный липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид: Вспомогательный липид: Холестерин: ПЭГ-липид (мол. %)	Z-среднее (нм)	PDI	Эффективность инкапсуляции (EE) (%)
10a-27 (4.5D)	Липид 10a-27	DOPE	ДСПЭ-ПЭГ (2000)	62:4:33:1	82	0,06	94
10a-26 (4.5D)	Липид 10a-26	DOPE	ДСПЭ-ПЭГ (2000)	62:4:33:1	68	0,08	91
10a-27 DSPC (5.7A)	Липид 10a-27	DSPC	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	79	0,06	96
10a-26 DSPC (5.7A)	Липид 10a-26	DSPC	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	79	0,05	93

Пример 74F: Инкапсуляция РНК, общий поток и процентная экспрессия in vitro для состава ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:ДМГ-ПЭГ (2000) в соотношении 50:10:38,5:1,5.

Липидные наночастицы были составлены с использованием Липида 10a-26, 10a-27 или 10a-130 и/или Липида 3-III-1 (обозначенного



) в ионизируемом липиде: DSPC:холестерин:DMG-PEG (2000) в соотношении 50:10:38,5:1,5 мол.% и инкапсулируя молекулу РНК при соотношении N:P 5,7. Экспрессия РНК присутствовала во всех составах.

Присутсвовал более высокий общий поток и процент экспрессии внутри печени как показано на **Фиг. 72I** и **72J,** соответственно.

Также рассчитывали TNS и pK_a частицы. 5 мкл 60 мкг/мл 2-(п-толуидино)нафталин-6-сульфоновой кислоты (THC) и 5 мкл 30 мкг РНК/мл липидных наночастиц добавляли в лунки с буфером HEPES в диапазоне pH от 2 до 12. Затем смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 5 минут и определяли флуоресценцию (возбуждение 322 нм, эмиссия 431 нм) с использованием планшет-ридера. Точку перегиба сигнала флуоресценции рассчитывали для определения pK_a частицы.

Состав	Ионизируемый липид	Вспомогательный липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид: Вспомогательный липид: Холестерин: ПЭГ-липид (мол. %)	Z-среднее	PDI	EE (%)	Конц. (мкг/мл)	pKa
10a-27/III-1 (5.7A)	Соотношение Липид 10a-27/Липид 3-III-1 3:1	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	74	0	96	55,8	7,4
10a-27III-1 (5.7A)	Соотношение Липид 10a-27/Липид 3-III-11:3	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	85	0,1	93	51,9	6,3
10a-26/III-1 (5.7A)	Соотношение Липид 10a-26/Липид 3-III-13:1	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	87	0,1	94	51,7	6,8
10a-26/III-1 (5.7A)	Соотношение Липид 10a-26/Липид 3-III-11:3	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	97	0,1	90	53,1	6,2
10a-130 (5.7A)	Липид 10a-130	DOPE	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	60	0,1	89	53,8	6,7

Пример 74G: Инкапсуляция РНК, общий поток и процентная экспрессия in vitro для ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:DSPE-PEG(2000) в соотношении 62:4:33:1 или

для ионизируемых липидов:DSPC:холестерин:DMG-PEG(2000) соотношение состава 50:10:38,5:1,5.

Липидные наночастицы были приготовлены с использованием Липида 10a-139 в соотношении ионизируемый липид:DOPE:холестерин:DSPE-PEG (2000) 62:4:33:1 мол.% (инкапсулируя молекулу РНК при соотношении N:P 4,5) или соотношение ионизируемых липидов:DOPE:холестерин:DMG-ПЭГ (2000) 50:10:38,5:1,5 мол.% (инкапсулируя молекулу РНК при соотношении N:P 5,7). Экспрессия РНК присутствовала во всех составах. Присутсвовал более высокий общий поток и процент экспрессии внутри печени как показано на **Фиг. 72K** и **72L,** соответственно.

Состав	Ионизируемый липид	Вспомогательный липид	ПЭГ-липид	Ионизируемый липид: Вспомогательный липид: Холестерин: ПЭГ-липид (мол. %)	Z-среднее (нм)	PDI	EE (%)
10a-139 (4.5D)	Липид 10a-139	DOPE	ДСПЭ-ПЭГ (2000)	62:4:33:1	93	0,01	79
10a-139 (5.7A)	Липид 10a-139	DSPC	ДМГ-ПЭГ (2000)	50:10:38,5:1,5	122	0,02	95

ПРИМЕР 75

Этот пример иллюстрирует экспрессию спайкового белка SARS-CoV2 in vitro. Кольцевую РНК, кодирующую стабилизированный спайк белок SARS-CoV2, трансфицировали в клетки 293 с использованием реагента для трансфекции MessengerMax. Через 24 часа после трансфекции клетки 293 окрашивали первичным антителом против спайк белка CR3022 и вторичным антителом, меченным APC.

На Фиг. 73A показана эффективность циркуляризации около 4,5 т.п.н. стабилизированной SARS-Cov2 РНК, кодирующей спайк белок, полученной в результате реакции транскрипции in vitro. На **Фиг. 73B** и **Фиг. 73C** показана экспрессия спайк белка, стабилизированного SARS-CoV2, на клетках 293 после трансфекции кольцевой РНК трансфекционным реагентом MessengerMax по сравнению с имитацией трансфекции клеток.

На **Фиг. 77A** и **Фиг. 77B** показана экспрессия стабилизированного спайк белка SARS-CoV2 в процентах клеток и gMFI на 293 клетках после трансфекции панели кольцевых РНК, содержащих вариабельные последовательности IRES, кодон-оптимизированные кодирующие области и стабилизированные спайк белки SARS-CoV2, с использованием реагента для трансфекции MessengerMax. На **Фиг. 77C** показана взаимосвязь между MFI и процентом.

ПРИМЕР 76

В этом примере показан цитокиновый ответ in vivo после внутривенной инъекции 0,2 мг/кг препаратов кольцРНК, инкапсулированных в составе липидных наночастиц. Реакции сплайсинга кольцРНК, синтезированных с использованием GTP в качестве инициатора предшественника РНК и нуклеотида сплайсинга, вызывали более сильные цитокиновые ответы, чем очищенная кольцРНК и линейная m1ψ-мРНК, из-за присутствия трифосфорилированных 5'-концов в реакции сплайсинга. Уровни IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70, RANTES, TNFα измеряли в крови, взятой через 6 часов после внутривенной инъекции препарата кольцРНК, содержащего LNP. Мышей, которым вводили ФСБ, использовали в качестве контроля.

Как видно на **Фиг. 74**, реакции сплайсинга кольцРНК, синтезированные с использованием GTP в качестве инициатора предшественника РНК и нуклеотида сплайсинга, вызывают более сильные цитокиновые ответы, чем очищенная кольцРНК и линейная m1ψ-мРНК из-за присутствия трифосфорилированных 5'-концов в реакции сплайсинга.

ПРИМЕР 77

Этот пример иллюстрирует внутримышечную доставку различных доз липидных наночастиц, содержащих кольцевые РНК. Мышам вводили 0,1 мкг, 1 мкг или 10 мкг кольцРНК, приготовленной в виде липидных наночастиц. Снимки IVIS всего тела проводили через 6 часов после инъекции люциферина (Фиг. **75A** и **ФИГ. 75B**). Визуализацию IVIS ex vivo проводили через 24 часа. Значения потока для печени, четырехглавой мышцы и икры показаны на **Фиг.** 75C. **На Фиг. 76B** и **Фиг. 76C** показано, что экспрессия кольцевой РНК присутствует в мышечной ткани мышей.

ПРИМЕР 78

Этот пример иллюстрирует экспрессию множественных кольцевых РНК в составах LNP. Конструкции кольцевой РНК, кодирующие либо hEPO, либо fLuc, дозировали в одиночный и смешанный набор LNP. Определяли концентрацию hEPO в сыворотке (**Фиг. 76A**) и общий поток с помощью визуализации IVIS (**Фиг. 76B**). Результаты показывают, что конструкции кольцевой РНК hEPO или fLuc эффективно экспрессируют белок в индивидуальном или совместном составе.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПО ССЫЛКЕ

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент и заявка на патент была конкретно и индивидуальна указана как включенная посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке:

a. фрагмент 3’-конца интрона группы I,

b. участок внутренней посадки рибосомы (IRES),

c. экспрессионную последовательность, кодирующую один или более антигенов, адъювантов, антигенподобных или адъювантоподобных полипептидов или их фрагментов, и

d. фрагмент 5’-конца интрона группы I.

2. Полинуклеотид кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке:

a. фрагмент 3’-конца интрона группы I,

b. участок внутренней посадки рибосомы (IRES),

c. некодирующую экспрессионную последовательность, и

d. фрагмент 5’-конца интрона группы I.

3. Полинуклеотид кольцевой РНК, полученный в результате транскрипции вектора, содержащий в следующем порядке:

a. 5’-конец дуплексообразующей области,

b. фрагмент 3’-конца интрона группы I,

c. участок внутренней посадки рибосомы (IRES),

d. экспрессионную последовательность, кодирующую один или более антигенов, адъювантов, антигенподобных или адъювантоподобных полипептидов или их фрагментов,

e. фрагмент 5’-конца интрона группы I, и

f. 3’-конец дуплексообразующей области.

4. Полинуклеотид кольцевой РНК, полученный в результате транскрипции вектора, содержащий в следующем порядке:

a. 5’-конец дуплексообразующей области,

b. фрагмент 3’-конца интрона группы I,

c. участок внутренней посадки рибосомы (IRES),

d. некодирующую экспрессионную последовательность, и

e. фрагмент 5’-конца интрона группы I, и

f. 3’-конец дуплексообразующей области.

5. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 3 или 4, содержащий первый спейсер между 5’-концом дуплексобразующей области и фрагментом 3’-конца интрона группы I, и второй спейсер между фрагментом 5’-конца интрона группы I и 3’-концом дуплексобразующей области.

6. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 5, отличающийся тем, что длина каждого из первого и второго спейсеров составляет от около 10 до около 60 нуклеотидов.

7. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 3-6, отличающийся тем, что каждая из первой и второй дуплексообразующих областей имеет длину от около 9 до около 19 нуклеотидов.

8. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 3-6, отличающийся тем, что каждая из первой и второй дуплексообразующих областей имеет длину около 30 нуклеотидов.

9. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что IRES имеет последовательность IRES из вируса синдрома Таура, вируса триатомы, вируса энцефаломиелита Тейлера, обезьяньего вируса 40, вируса Solenopsis invicta 1, вируса Rhopalosiphum padi, вируса ретикулоэндотелиоза, полиовируса человека 1, кишечного вируса Plautia stali, вируса кашмирской пчелы, риновируса человека 2, вируса Homalodisca coagulata-1, вируса иммунодефицита человека типа 1, вируса Homalodisca coagulata-1, вируса Himetobi P, вируса гепатита C, вируса гепатита A, вируса гепатита GB, вируса ящура, энтеровируса человека 71, вируса ринита лошадей, пикорноподобного вируса Ectropis obliqua, вируса энцефаломиокардита, вируса дрозофилы C, вируса коксаки человека B3, тобамовируса крестоцветных, вируса паралича сверчков, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 1, вируса клеток черной королевы, вируса летального паралича тли, вируса птичьего энцефаломиелита, вируса острого паралича пчел, вирус хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса, вируса классической чумы свиней, FGF2 человека, SFTPA1 человека, AML1/RUNX1 человека, вируса 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, n.myc человека, Gtx мыши, p27kipl человека, PDGF2/c-sis человека, p53 человека, Pim-1 человека, Rbm3 мыши, Drosophila reaper, Canine Scamper, Drosophila Ubx, UNR человека, UtrA мыши, VEGF-A человека, XIAP человека, безволосой дрозофилы, S. cerevisiae TFIID, S. cerevisiae YAP1, вируса гравировки табака, вируса морщинистости репы, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, пикобирнавируса, HCV QC64, козавируса человека E/D, козавируса человека F, козавируса человека JMY, риновируса NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, саливируса A SH1, саливируса FHB, саливируса NG-J1, пареховируса человека 1, крохивируса B, Yc -3, розавируса M-7, шанбавируса A, пасивируса A, пасивируса A 2, эховируса E14, пареховируса человека 5, вируса Аичи, вируса гепатита A HA16, фопивируса, CVA10, энтеровируса C, энтеровируса D, энтеровируса J, пегивируса человека 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, пегивируса A 1220, пасивируса A 3, сапеловируса, розавируса B, бакунзавируса, тремовируса A, пасивируса свиней 1, PLV-CHN, пасивируса A, сицинивируса, гепацивируса K, гепацивируса A, BVDV1, вируса пограничной болезни, BVDV2, CSFV-PK15C, дицистровируса SF573, пикорноподобного вируса Хубэй, CRPV, саливируса A BN5, саливируса A BN2, саливируса A 02394, саливируса A GUT, саливируса A CH, саливируса A SZ1, саливируса FHB, CVB3, CVB1, эховируса 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 или аптамера к eIF4G.

10. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-9, состоящий из природных нуклеотидов.

11. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что экспрессионная последовательность оптимизирована по кодонам.

12. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что полинуклеотид кольцевой РНК имеет длину от около 100 нуклеотидов до около 10 тысяч оснований.

13. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-12, имеющий продолжительность терапевтического действия in vivo у человека по меньшей мере около 20 часов.

14. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-13, имеющий функциональный период полужизни по меньшей мере около 20 часов.

15. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-14, имеющий продолжительность терапевтического действия в клетке человека, превышающую или равную продолжительности действия эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего ту же экспрессионную последовательность.

16. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-15, имеющий продолжительность функционального периода полужизни в клетке человека, превышающую или равную продолжительности действия эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего ту же экспрессионную последовательность.

17. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-16, имеющий продолжительность терапевтического действия in vivo у человека больше, чем у эквивалнтного полинуклеотида линейной РНК, содержащего ту же экспрессионную последовательность.

18. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-17, имеющий период функциональной полужизни in vivo у человека больше, чем у эквивалентного полинуклеотида линейной РНК, содержащего ту же экспрессионную последовательность.

19. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1, 3 и 5-18, отличающийся тем, что адъювант или адъювантоподобный полипептид выбран из группы, включающей лиганд толл-подобного рецептора, цитокин, FLt3-лиганд, антитело, хемокины, химерный белок, эндогенный адъювант, высвобождаемый из умирающей опухоли, и белки, ингибирующие контрольные точки.

20. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1, 3 и 5-19, отличающийся тем, что адъювант или адъювантоподобный полипептид выбран из группы, включающей BCSP31, MOMP, FomA, MymA, ESAT6, PorB, PVL, Porin, OmpA, PepO, OmpU, лумазинсинтазу, Omp16, Omp19, CobT, RpfE, Rv0652, HBHA, NhhA, DnaJ, пневмолизин, фалгелин, IFN-альфа, IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF, IL-1b, IL-6, TNF-a, IL-7, IL-17, IL-1бэта, анти-CTLA4, анти-PD1, анти-41BB, PD-L1, Tim-3, Lag-3, TIGIT, GITR и andti-CD3.

21. Полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1, 3 и 5-20, отличающийся тем, что адъювант или адъювантоподобный полипептид выбран из Таблицы 10.

22. Полинуклеотид РНК, содержащий в следующем порядке фрагмент 3’-конца интрона и трифосфорилированный 5’-конец.

23. Полинуклеотид РНК по п. 22, содержащий 5’-спейсер, расположенный выше фрагмента 3’-конца интрона и ниже трифосфорилированного 5’-конца.

24. Полинуклеотид РНК, содержащий в следующем порядке фрагмент 3’-конца интрона и монофосфорилированный 5’-конец.

25. Полинуклеотид РНК по п. 24, содержащий 5’-спейсер, расположенный выше фрагмента 3’-конца интрона и ниже монофосфорилированного 5’-конца.

26. Полинуклеотид РНК, содержащий фрагмент 5’-конца интрона и трифосфорилированный 5’-конец.

27. Полинуклеотид РНК по п. 26, содержащий 5’-спейсер, расположенный ниже фрагмента 5’-конца интрона.

28. Полинуклеотид РНК, содержащий фрагмент 5’-конца интрона и монофосфорилированный 5’-конец.

29. Полинуклеотид РНК по п. 28, содержащий 5’-спейсер, расположенный ниже фрагмента 5’-конца интрона.

30. Полинуклеотид РНК по любому из пп. 22-29, дополнительно содержащий метку очистки полиА.

31. Полинуклеотид РНК по любому из пп. 22-30, дополнительно содержащий инициирующую последовательность.

32. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 3 или 4, отличающийся тем, что вектор дополнительно содержит трифосфорилированный 5’-конец.

33. Полинуклеотид кольцевой РНК по п. 3 или 4, отличающийся тем, что вектор дополнительно содержит монофосфорилированный 5’-конец.

34. Полинуклеотид РНК по любому из пп. 24-25 и 28-29, дополнительно содержащий трифосфорилированный 5’-конец.

35. Полинуклеотид РНК по любому из пп. 22-23 и 26-27, дополнительно содержащий монофосфорилированный 5’-конец.

36. Состав РНК, содержащий:

a. полинуклеотид кольцевой РНК по п. 1, п. 2 или оба; и

b. полинуклеотид линейной РНК, содержащий по меньшей мере одно из следующего:

i. 3’-концевой интронный полинуклеотид, содержащий монофосфорилированный 5’-конец и фрагмент 3’-конца интрона;

ii. 5’-концевой интронный полинуклеотид, содержащий монофосфорилированный 5’-конец и фрагмент 5’-конца интрона;

iii. 3’-концевой интронный полинуклеотид, содержащий трифосфорилированный 5’-конец и фрагмент 3’-конца интрона; и

iv. 5’-концевой интронный полинуклеотид, содержащий трифосфорилированный 5’-конец и фрагмент 3’-конца интрона,

при этом полинуклеотид кольцевой РНК составляет по меньшей мере 90% состава РНК.

37. Состав РНК по п. 36, отличающийся тем, что 3'-концевой интронный полинуклеотид или 5'-концевой интронный полинуклеотид содержит спейсер.

38. Состав РНК по п. 36, отличающийся тем, что 3'-концевой интронный полинуклеотид или 5'-концевой интронный полинуклеотид содержит полиА-последовательность.

39. Состав РНК по любому из пп. 36-38, отличающийся тем, что 3'-концевой интронный полинуклеотид или 5'-концевой интронный полинуклеотид содержит UTR.

40. Состав РНК по любому из пп. 39, отличающийся тем, что 3'-концевой интронный полинуклеотид или 5'-концевой интронный полинуклеотид содержит IRES.

41. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-21, разбавитель и необязательно солевой буфер.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая состав РНК по любому из пп. 36-40, разбавитель и необязательно солевой буфер.

43. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-21 и поликатионное, катионное или полимерное соединение.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая состав РНК по любому из пп. 36-40 и поликатионное, катионное или полимерное соединение.

45. Фармацевтическая композиция по п. 43 или 44, отличающаяся тем, что поликатионное или катионное соединение выбрано из группы, состоящей из: катионных пептидов или белков, основных полипептидов, пептидов, проникающих в клетку (CPP), пептидов, полученных из Tat, пенетратина, пептидов, полученных из VP22, или пептидов-аналогов, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA или доменов белковой трансдукции (PTD), PpT620, пептидов, богатых пролином, пептидов, богатых аргинином, пептидов, богатых лизином, MPG-пептида(ов), Pep-1, L-олигомеров, пептида(ов) кальцитонина, пептидов, полученных из Antennapedia, pAntp, pIsl, FGF, лактоферрина, транспортана, буфорина-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, пептидов, полученных из hCT, SAP, гистонов, катионных полисахаридов, катионных полимеров, катионных липидов, дендримеров, полиимина, полиаллиламина, олигофектамина или катионных или поликатионных полимеров, полимеров на основе сахарного остова, полимеров на основе силанового остова, модифицированных полиаминокислот, модифицированных акрилатов, модифицированного полибетаминоэфира (PBAE), модифицированных амидоаминов, дендримеров, блок-полимеров, состоящих из комбинации одного или более катионных блоков и одного или более гидрофильных или гидрофобных блоков.

46. Фармацевтическая композиция по п. 43 или 44, отличающаяся тем, что полимерное соединение выбрано из группы, состоящей из: полиаминов, простых полиэфиров, полиамидов, сложных полиэфиров, поликарбаматов, полимочевины, поликарбонатов, полистиролов, полиимидов, полисульфонов, полиуретанов, полиацетиленов, полиэтиленов, полиэтилениминов, полиизоцианатов, полиакрилатов, полиметакрилатов, полиакрилонитрилов и полиарилатов. Например, полимер может включать поли(капролактон) (PCL), полимер этиленвинилацетата (EVA), поли(молочную

кислоту) (PLA), поли(L-молочную кислоту) (PLLA), поли(гликолевую кислоту) (PGA), поли(молочная кислота-гликолевая кислота) (PLGA), поли(L-молочная кислота-гликолевая кислота) (PLLGA), поли(D, L-лактид) (PDLA), поли(L-лактид) (PLLA), поли(D, L-лактид-со-капролактон), поли(D, L-лактид-со-капролактон-согликолид), поли(D, L-лактид-со-ПЭО-со-D, L-лактид), поли(D, L-лактид-со-ПФО-со-D, L-лактид), полиалкилцианоакрилат, полиуретан, поли-L-лизин (PLL), гидроксипропилметакрилат (HPMA), полиэтиленгликоль, поли-L-глутаминовая кислота, поли(оксикислоты), полиангидриды, полиортоэфиры, поли(эфирамиды), полиамиды, поли(эфирные эфиры), поликарбонаты, полиалкилены, такие как полиэтилен и полипропилен, полиалкиленгликоли, такие как поли(этиленгликоль) (ПЭГ), полиалкиленоксиды (ПЭО), полиалкилентерефталаты, такие как поли(этилентерефталат), поливиниловые спирты (ПВС), поливиниловые эфиры, поливинилэфиры сложные эфиры, такие как поли(винилацетат), поливинилгалогениды, такие как поли(винилхлорид) (ПВХ), поливинилпирролидон (ПВП), полисилоксаны, полистирол, полиуретаны, производные целлюлозы, такие как алкилцеллюлозы, гидроксиалкилцеллюлозы, простые эфиры целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы, нитро целлюлозы, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, полимеры акриловых кислот, такие как поли(метил(мет)акрилат) (ПММА), поли(этил(мет)акрилат), поли(бутил(мет)акрилат), 363 5 10 15 20 25 30 35 WO 2021/076805 PCT/US2020/055844 поли(изобутил(мет)акрилат), поли(гексил(мет)акрилат), поли(изодецил(мет)акрилат), поли(лаурил(мет)акрилат), поли(фенил(мет)акрилат). поли(метилакрилат), поли(изопропилакрилат), поли(изобутилакрилат), поли(октадецилакрилат) и их сополимеры и смеси, полидиоксанон и его сополимеры, полигидроксиалканоаты, полипропиленфлимарат, полиоксиметилен, полоксамеры, полоксамины, поли(орто)эфиры, поли(масляная кислота), поли(валериановая кислота), поли(лактид-со-капро олактон), триметиленкарбонат, поли(N-акрилоилморфолин) (PAcM), поли(2-метил-2-оксазолин) (PMOX), поли(2-этил-2-оксазолин) (PEOZ) и полиглицерин.

47. Фармацевтическая композиция по п. 43 или 44, отличающаяся тем, что поликатионное или катионное соединение выбрано из группы, включающей: протамина, нуклеолина, спермина или спермидина, поли-L-лизина (PLL), полиаргинина, ВИЧ-связывающих пептидов, ВИЧ-1 Tat (ВИЧ), полиэтиленимина (ПЭИ), DOTMA: [1-(2,3-сиолеилокси)пропил)]-N, N,N-триметиламмоний хлорид, DMRIE, ди-C14-амидина, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Диолеилфосфатидилэтаноламина, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Диоктадециламидоглицилспермина, DIMRI: Бромид димиристооксипропилдиметилгидроксиэтиламмония, DOTAP: диолеоилокси-3-(триметиламмонио)пропана, DC-6-14: O, O-дитетрадеканоил-N-α-триметиламмониоацетил)диэтаноламина хлорида, CLIP 1: rac-[(2,3-диоктадецилоксипропил)(2-гидроксиэтил)]-диметиламмоний хлорида, CLIP6: rac-[2(2,3 -дигексадецилоксипропилоксиметилокси)этил]-триметиламмоний, CLIP9: rac-[2(2,3-дигексадецилоксипропилоксисукцинилокси)этил]-триметиламмоний, полимеры бета-

аминокислот или обращенные полиамиды, PVP (поли(N-этил-4-винилпиридиния бромид)), pDMAEMA (поли(диметиламиноэтилметилакрилат)), pAMAM (поли(амидоамин)), модифицированный диамином концевой полимер 1,4-бутандиолдиакрилат-со-5-амино-1-пентанол, полипропиламиновые дендримеры или дендримеры на основе pAMAM, полиимин(ы), PEI: поли(этиленимин), поли(пропиленимин), полиаллиламин, полимеры на основе циклодекстрина, полимеры на основе декстрана, хитозан и сополимеры PMOXA-PDMS.

48. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-21, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая состав РНК по любому из пп. 36-40, наночастицу и, необязательно, целевой фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

50. Фармацевтическая композиция по п. 48 или 49, отличающаяся тем, что наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка, биоразлагаемую наночастицу, биоразлагаемую липидную наночастицу, полимерную наночастицу или биоразлагаемую полимерную наночастицу.

51. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 41-50, содержащая нацеливающий фрагмент, причем нацеливающий фрагмент опосредует опосредованный рецептором эндоцитоз или прямое слияние с выбранными клетками выбранной клеточной популяции или ткани в отсутствие выделения или очистки клеток.

52. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 48-51, отличающаяся тем, что нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, полинуклеотидный аптамер, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или их фрагмент.

53. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 41-5257-57, отличающаяся тем, что полинуклеотид кольцевой РНК или состав РНК находится в количестве, эффективном для лечения или предотвращения инфекции у нуждающегося в этом человека.

54. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 41-53, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция имеет повышенный профиль безопасности по сравнению с фармацевтической композицией, содержащей векторы, содержащие экзогенную ДНК, кодирующую тот же антиген.

55. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 41-54, отличающаяся тем, что менее чем 1% по массе полинуклеотидов в композиции представляют собой двухцепочечную РНК, фрагменты ДНК или трифосфорилированную РНК.

56. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 41-55, отличающаяся тем, что менее чем 1% по массе полинуклеотидов и белков в фармацевтической композиции представляют собой двухцепочечную РНК, фрагменты ДНК, трифосфорилированную РНК, белки-фосфатазы, протеинлигазы и кэпирующие ферменты.

57. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 48-56, отличающаяся тем, что наночастица содержит один или более 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 комбинации.

58. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-21, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

59. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей состав РНК по любому из пп. 36-40, наночастицу и, необязательно, нацеливающий фрагмент, функционально связанный с наночастицей.

60. Способ по п. 58 или 59, отличающийся тем, что нацеливающий фрагмент представляет собой scFv, нанотело, пептид, минитело, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или их фрагмент.

61. Способ по любому из пп. 58-60, отличающийся тем, что наночастица представляет собой липидную наночастицу, наночастицу ядро-оболочка или биоразлагаемую наночастицу.

62. Способ по любому из пп. 58-61, отличающийся тем, что наночастица содержит один или более катионных липидов, ионизируемых липидов или сложных поли-β-аминоэфиров.

63. Способ по любому из пп. 58-62, отличающийся тем, что наночастица содержит один или более некатионных липидов.

64. Способ по любому из пп. 58-63, отличающийся тем, что наночастица содержит один или более липидов, модифицированных ПЭГ, липидов полиглутаминовой кислоты или липидов гиалуроновой кислоты.

65. Способ по любому из пп. 58-64, отличающийся тем, что наночастица содержит холестерин.

66. Способ по любому из пп. 58-65, отличающийся тем, что наночастица содержит арахидоновую кислоту или олеиновую кислоту.

67. Способ по любому из пп. 58-66, отличающийся тем, что композиция содержит нацеливающий фрагмент, при этом нацеливающий фрагмент опосредует опосредованный рецептором эндоцитоз в выбранных клетках выбранной клеточной популяции в отсутствие выделения или очистки клеток.

68. Способ по любому из пп. 58-67, отличающийся тем, что наночастица инкапсулирует более одного кольцевого полинуклеотида РНК.

69. Вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке: 5’-конец дуплексообразующей области, фрагмент 3’-конца интрона

группы I, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), экспрессионную последовательность, кодирующую один или более адъювантов, антигены, адъювантоподобные или антигенподобные полипептиды или их фрагменты, фрагмент 5'-конца интрона группы I и 3'-конец дуплексобразующей области.

70. Вектор для получения полинуклеотида кольцевой РНК, содержащий в следующем порядке 5'-конец дуплексообразующей области, фрагмент 3'-конца интрона группы I после сплайсинга, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), некодирующую последовательность, фрагмент 5'-конца интрона группы I после сплайсинга и 3'-конец дуплексообразующей области.

71. Вектор по п. 69 или 70, содержащий первый спейсер между 5'-концом дуплексообразующей области и фрагментом 3'-конца интрона группы I, и второй спейсер между фрагментом 5'-конца интрона группы I и 3'-концом дуплексообразующей области.

72. Вектор по любому из пп. 69-71, отличающийся тем, что каждый из первого и второго спейсеров имеет длину от около 20 до около 60 нуклеотидов.

73. Вектор по любому из пп. 69-72, отличающийся тем, что каждый из первого и второго спейсеров содержит неструктурированный участок длиной по меньшей мере 5 нуклеотидов.

74. Вектор по любому из пп. 69-73, отличающийся тем, что каждый из первого и второго спейсеров содержит структурированную область длиной по меньшей мере 7 нуклеотидов.

75. Вектор по любому из пп. 69-74, отличающийся тем, что каждая из первой и второй дуплексообразующих областей имеет длину от около 9 до 50 нуклеотидов.

76. Вектор по любому из пп. 69-75, отличающийся тем, что вектор оптимизирован по кодонам.

77. Вектор по любому из пп. 69-76, в котором отсутствует по меньшей мере один сайт связывания микроРНК, присутствующий в эквивалентном полинуклеотиде предварительной оптимизации.

78. Прокариотическая клетка, содержащая вектор по любому из пп. 69-77.

79. Эукариотическая клетка, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-21.

80. Эукариотическая клетка по п. 79, отличающаяся тем, что эукариотическая клетка представляет собой клетку человека.

81. Эукариотическая клетка по п. 79 или 80, отличающаяся тем, что эукариотическая клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку.

82. Вакцина, содержащая: по меньшей мере один полинуклеотид кольцевой РНК, имеющий экспрессионную последовательность, кодирующую по меньшей мере один вирусный антигенный полипептид, адъювант или адъювантоподобный полипептид, или его иммуногенный фрагмент, в составе липидной наночастицы.

83. Вакцина по п. 82, отличающаяся тем, что адъювант или адъювантоподобный полипептид выбран из Таблицы 10.

84. Вакцина по п. 82 или 83, отличающаяся тем, что антигенный полипептид представляет собой вирусный полипептид из аденовируса; простого герпеса, типа 1; простого герпеса, типа 2; вируса энцефалита, папилломавируса, вируса ветряной оспы; вируса Эпштейна-Барра; цитомегаловируса человека; вируса герпеса человека, типа 8; вируса папилломы человека; вируса ВК; вируса JC; оспы; вируса полиомиелита; вируса гепатита В; бокавируса человека; парвовируса В19; астровируса человека; вируса Норуолк; коксакивируса; вируса гепатита А; полиовируса; риновируса; вируса тяжелого острого респираторного синдрома; вируса гепатита С; вируса желтой лихорадки; вируса денге; вируса Западного Нила; вируса краснухи; вируса гепатита Е; вируса иммунодефицита человека (ВИЧ); вируса гриппа; вируса гуанарито; вируса Хунин; вируса Ласса; вируса Мачупо; вируса Сабиа; вируса конго-крымской геморрагической лихорадки; вируса Эбола; вируса Марбург; вируса кори; вируса эпидемического паротита; вируса парагриппа; Респираторно-синцитиального вируса; вируса метапневмо человека; вируса Хендра; вируса Нипах; вируса бешенства; гепатита D; ротавируса; орбивируса; кольтивируса; вируса Банна; энтеровируса человека; Ханта вируса; вируса Западного Нила; Ближневосточного респираторного синдрома Коронавируса; вируса японского энцефалита; везикулярного экзантернавируса; SARS-CoV-2; Восточного лошадиного энцефалита или сочетания любых двух или более из вышеперечисленных.

85. Вакцина по любому из пп. 82-84, отличающаяся тем, что вирусный антигенный полипептид или его иммуногенный фрагмент выбран или получен из любой из SEQ ID NO: 325-336.

86. Вакцина по любому из пп. 82-85, отличающаяся тем, что вирусный антигенный полипептид или его иммуногенный фрагмент имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 325-336, и при этом вирусный антигенный полипептид или его иммуногенный фрагмент обладает активностью слияния мембран, присоединяется к клеточным рецепторам, вызывает слияние клеточных мембран вируса и клеток млекопитающих и/или отвечает за связывание вируса с инфицированной клеткой.

87. Вакцина по любому из пп. 82-86, отличающаяся тем, что экспрессионная последовательность оптимизирована по кодонам.

88. Вакцина по любому из пп. 82-87, отличающаяся тем, что вакцина является поливалентной.

89. Вакцина по любому из пп. 82-88, приготовленная в количестве, эффективном для получения антигенспецифического иммунного ответа.

90. Вакцина по любому из пп. 82-89, отличающаяся тем, что полинуклеотид кольцевой РНК содержит первую экспрессионную последовательность, кодирующую первый вирусный антигенный полипептид, и вторую экспрессионную последовательность, кодирующую второй вирусный антигенный полипептид.

91. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту вакцины по любому из пп. 82-90 в количестве, эффективном для индукции антиген-специфического иммунного ответа у субъекта.

92. Способ по п. 91, отличающийся тем, что антигенспецифический иммунный ответ включает Т-клеточный ответ или В-клеточный ответ.

93. Способ по п. 91 или 92, отличающийся тем, что субъекту вводят одну дозу вакцины.

94. Способ по любому из пп. 91-93, отличающийся тем, что субъекту вводят бустерную дозу вакцины.

95. Способ по любому из пп. 91-94, отличающийся тем, что вакцину вводят субъекту путем интраназального введения, внутрикожной инъекции или внутримышечной инъекции.

96. Способ по любому из пп. 91-95, отличающийся тем, что титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, увеличивается по меньшей мере на 1 log относительно заранее определенного порогового уровня.

97. Способ по любому из пп. 91-96, отличающийся тем, что титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, увеличивается по меньшей мере на 1-3 log относительно заранее определенного порогового уровня.

98. Способ по любому из пп. 91-97, отличающийся тем, что титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, увеличивается по меньшей мере в 2 раза относительно заранее определенного порогового уровня.

99. Способ по любому из пп. 91-98, отличающийся тем, что титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, увеличивается по меньшей мере в 2-10 раз относительно заранее определенного порогового уровня.

100. Способ по любому из пп. 91-99, отличающийся тем, что заранее определенный пороговый уровень представляет собой титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, которому не вводили вакцину, содержащую антигенный полипептид.

101. Способ по любому из пп. 91-100, отличающийся тем, что заданный пороговый уровень представляет собой титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, которому вводили живую аттенуированную вакцину или инактивированную вакцину, содержащую антигенный полипептид.

102. Способ по любому из пп. 91-101, отличающийся тем, что заданный пороговый уровень представляет собой титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, которому вводили рекомбинантную белковую вакцину или очищенную белковую вакцину, содержащую антигенный полипептид.

103. Вакцина против SARS-CoV2, содержащая: по меньшей мере один полинуклеотид кольцевой РНК, имеющий экспрессионную последовательность, кодирующую по меньшей мере один вирусный антигенный полипептид SARS-CoV2 или его иммуногенный фрагмент, в составе липидной наночастицы.

104. Вакцина против SARS-CoV2 по п. 102, отличающаяся тем, что вирусный антигенный полипептид SARS-CoV2 выбран из: спайк белка SARS-CoV2, Nsp1-Nsp16, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORFb, ORF8, ORF10, оболочечного белка SARS-CoV2, мембранного белка SARS-CoV2, нуклеокапсидного белка SARS-CoV2 или любого антигенного пептида SARS-CoV2 или фрагмента пептида SARS-CoV2.

105. Вакцина против SARS-CoV2 по п. 102103 или 104, отличающаяся тем, что вирусный антигенный полипептид SARS-CoV2 получен из штамма G вируса SARS-CoV2, штамма GR, штамма GH, штамма L, штамма V или их комбинации.

106. Вакцина против SARS-CoV2 по любому из пп. 103-105, отличающаяся тем, что экспрессионная последовательность оптимизирована по кодонам.

107. Вакцина против SARS-CoV2 по любому из пп. 103-106, отличающаяся тем, что вакцина является поливалентной.

108. Вакцина против SARS-CoV2 по любому из пп. 103-107, составленная в количестве, эффективном для получения антиген-специфического иммунного ответа.

109. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту вакцины против SARS-CoV2 по любому из пп. 103-108 в количестве, эффективном для индукции антиген-специфического иммунного ответа у субъекта.

110. Способ по п. 109, отличающийся тем, что антиген-специфический иммунный ответ включает Т-клеточный ответ или В-клеточный ответ.

111. Способ по п. 109 или 110, отличающийся тем, что субъекту вводят одну дозу вакцины.

112. Способ по любому из пп. 109-111, отличающийся тем, что субъекту вводят бустерную дозу вакцины.

113. Способ по любому из пп. 109-112, отличающийся тем, что вакцину вводят субъекту путем интраназального введения, внутрикожной инъекции или внутримышечной инъекции.

114. Способ по любому из пп. 109-113, отличающийся тем, что титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, увеличивается по меньшей мере на 1 log относительно заранее определенного порогового уровня.

115. Способ по любому из пп. 109-114, отличающийся тем, что титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, увеличивается на 1-3 log относительно заранее определенного порогового уровня.

116. Способ по любому из пп. 109-115, отличающийся тем, что титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, увеличивается по меньшей мере в 2 раза относительно заранее определенного порогового уровня.

117. Способ по любому из пп. 109-116, отличающийся тем, что титр антител к антигенным полипептидам, вырабатываемому у субъекта, увеличивается в 2-10 раз относительно заранее определенного порогового уровня.

118. Способ по любому из пп. 109-117, отличающийся тем, что заранее определенный пороговый уровень представляет собой титр антител к антигенному

полипептиду, вырабатываемых у субъекта, которому не вводили вакцину, содержащую антигенный полипептид.

119. Способ по любому из пп. 109-118, отличающийся тем, что заранее определенный пороговый уровень представляет собой титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, которому вводили живую аттенуированную вакцину или инактивированную вакцину, содержащую антигенный полипептид.

120. Способ по любому из пп. 109-119, отличающийся тем, что заранее определенный пороговый уровень представляет собой титр антител к антигенному полипептиду, вырабатываемому у субъекта, которому вводили рекомбинантную белковую вакцину или очищенную белковую вакцину, содержащую антигенный полипептид.

121. Полинуклеотид кольцевой РНК, имеющий экспрессионную последовательность, кодирующую по меньшей мере один вирусный антигенный полипептид, адъювант или адъювантоподобный полипептид, или его иммуногенный фрагмент.

122. Вектор экспрессии, содержащий сконструированную нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один полинуклеотид кольцевой РНК по любому из пп. 1-21.

123. Вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК, содержащая полинуклеотид кольцевой РНК по п. 121, составленная в виде липидной наночастицы.

124. Вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК по п. 123, отличающаяся тем, что наночастица имеет средний диаметр 50-200 нм.

125. Вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК по п. 123 или 124, отличающаяся тем, что липидная наночастица содержит катионный липид, ПЭГ-модифицированный липид, стерол и некатионный липид.

126. Вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК по любому из пп. 123-125, отличающаяся тем, что носитель липидных наночастиц содержит около 20-60% катионного липида, 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида, 25-55% стерола и 25% не-катионного липида.

127. Вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК по любому из пп. 123-126, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой ионизируемый катионный липид, а некатионный липид представляет собой нейтральный липид, и стерол представляет собой холестерин.

128. Вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК по любому из 123-127, отличающаяся тем, что катионный липид выбран из 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA) и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоата (L319).

129. Вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК по любому из пп. 123-128, отличающаяся тем, что наночастица имеет значение полидисперсности менее 0,4.

130. Вакцина из полинуклеотида кольцевой РНК по любому из пп. 123-129, отличающаяся тем, что наночастица имеет суммарный нейтральный заряд при нейтральном значении pH.

131. Фармацевтическая композиция для вакцинации субъекта, содержащая эффективную дозу полинуклеотида кольцевой РНК, кодирующего по меньшей мере один вирусный антиген или адъювант, или адъювантоподобный полипептид, или его иммуногенный фрагмент, при этом эффективная доза достаточна для получения 1000-10000 титра нейтрализации, продуцируемого нейтрализующим антителом к указанному антигену или адъюванту, или адъювантоподобному полипептиду, или его иммуногенному фрагменту, измеренного в сыворотке субъекта через 1-72 часа после введения.

132. Фармацевтическая композиция для вакцинации субъекта, содержащая эффективную дозу кольцевой мРНК, кодирующей по меньшей мере один вирусный антиген, или адъювант, или адъювантоподобный полипептид, или его иммуногенный фрагмент, при этом эффективная доза достаточна для получения обнаруживаемых уровней антигена или адъюванта, или адъювантоподобного полипептида, или его иммуногенного фрагмента, измеренного в сыворотке субъекта через 1-72 часа после введения.

133. Способ индукции, выработки или усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 131 или 132 в количестве, эффективном для индукции, выработки или усиления антиген-специфического иммунного ответа у субъекта.

134. Способ по п. 133, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция обеспечивает иммунизацию субъекта против вируса на срок до 2 лет.

135. Способ по п. 133 или 134, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция обеспечивает иммунизацию субъекта против вируса на срок более 2 лет.

136. Способ по любому из пп. 133-135, отличающийся тем, что субъект подвергся воздействию вируса, при этом субъект инфицирован вирусом или при этом субъект подвержен риску заражения вирусом.

137. Способ по любому из пп. 133-136, отличающийся тем, что субъект имеет ослабленный иммунитет.

138. Вакцина по любому из пп. 82-90, 103-108 и 123-130 или фармацевтическая композиция по п. 131 или 132 для применения в способе индукции антигенспецифического иммунного ответа у субъекта, причем способ включает введение субъекту вакцины или фармацевтическую композиции в количестве, эффективном для получения антиген-специфического иммунного ответа у субъекта.

139. Применение вакцины по любому из пп. 82-90, 103-108 и 123-130, или фармацевтической композиции по п. 131 или 132 в производстве лекарственного средства для применения в способе индукции антигенспецифического иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту вакцины в количестве, эффективном для индукции антигенспецифического иммунного ответа у субъекта.

140. Способ индукции перекрестной реактивности против различных вирусов или штаммов вируса у млекопитающего, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, вакцины по любому из предшествующих пунктов или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов.

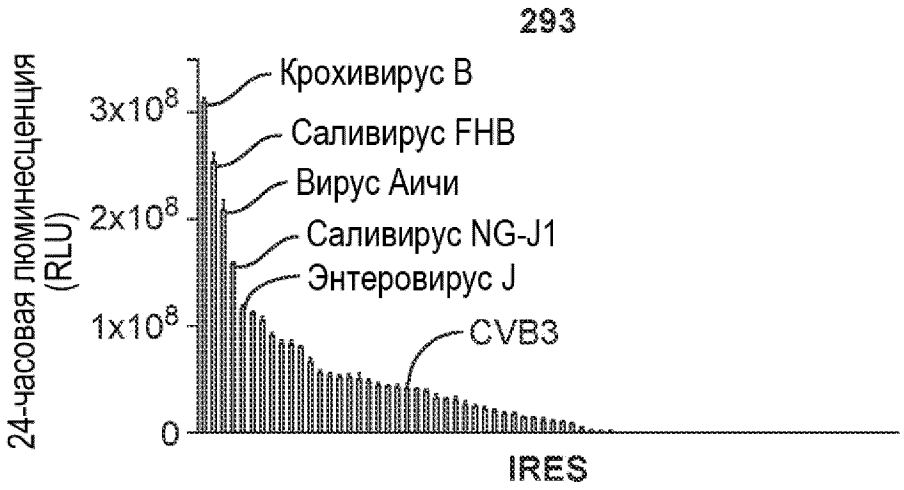
141. Способ по п. 140, отличающийся тем, что млекопитающему отдельно вводят по меньшей мере два полинуклеотида кольцевой РНК, каждый из которых кодирует консенсусный вирусный антиген.

142. Способ по п. 140 или 141, отличающийся тем, что млекопитающему одновременно вводят по меньшей мере два полинуклеотида кольцевой РНК, каждый из которых кодирует консенсусный вирусный антиген.

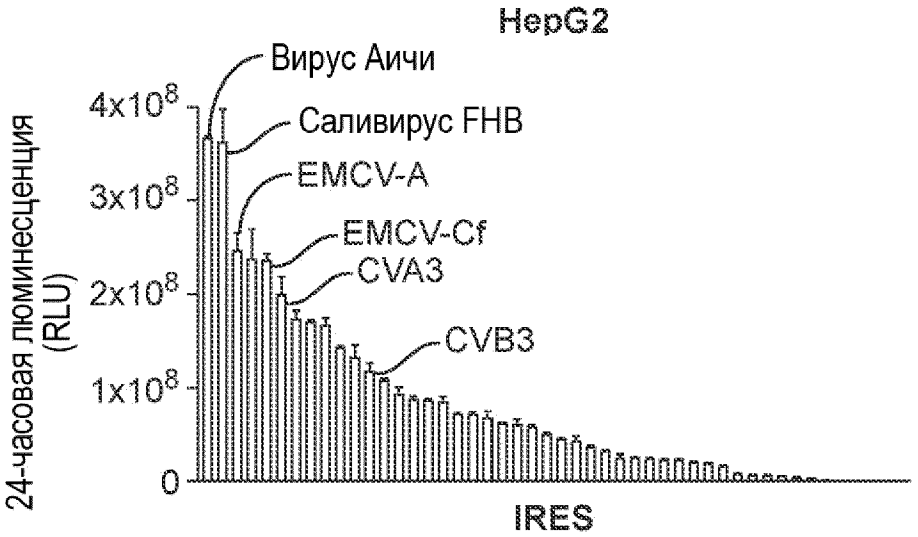
143. Вакцина по любому из пп. 82-90, 103-108 и 123-130, отличающаяся тем, что полинуклеотид кольцевой РНК объединен с адъювантом в одной и той же наночастице.

144. Вакцина по любому из пп. 82-90, 103-108, 123-130 и 143, отличающаяся тем, что адъювант представляет собой CpG, имихимод, алюминий или адъювант Фрейнда.

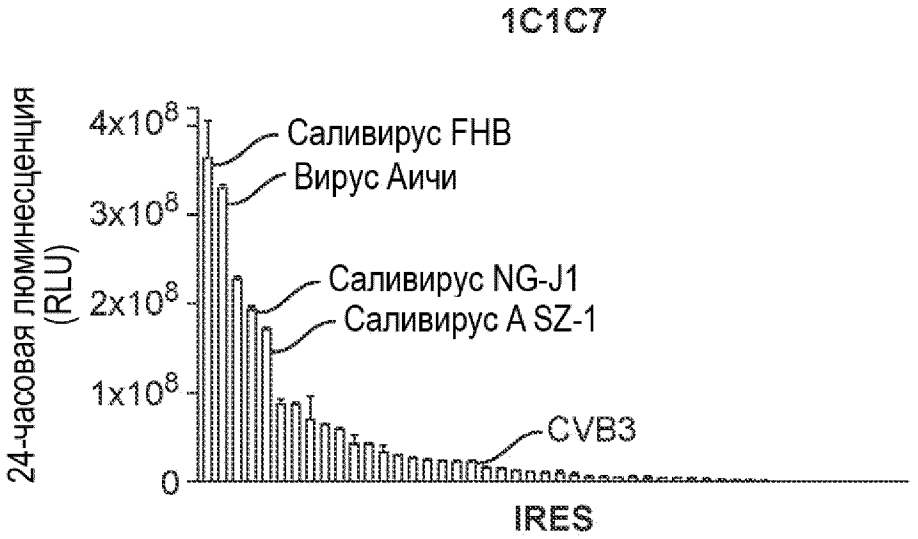
По доверенности



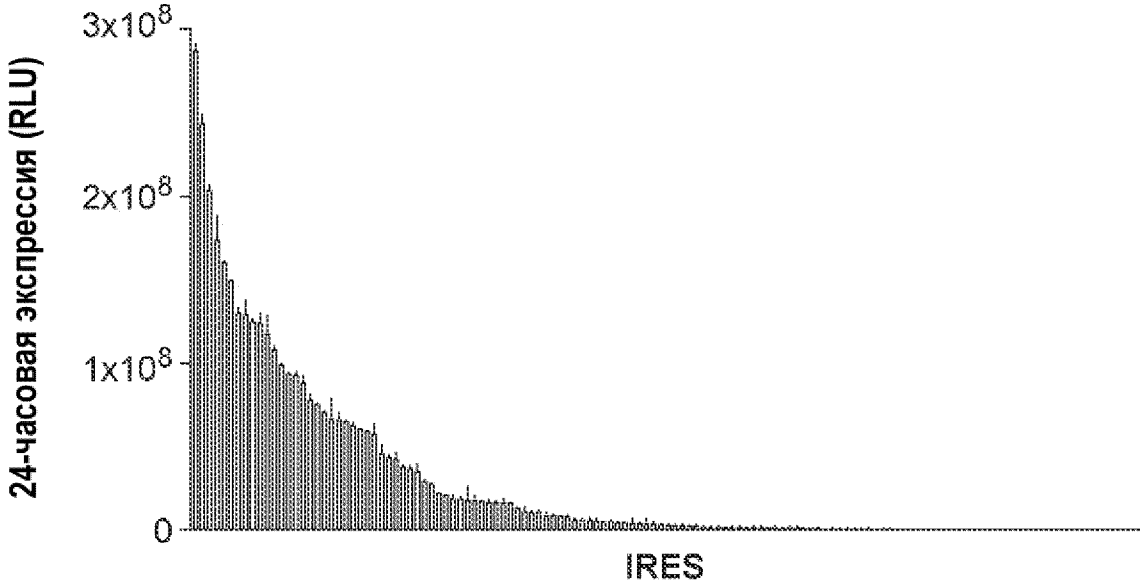
Фиг. 1A



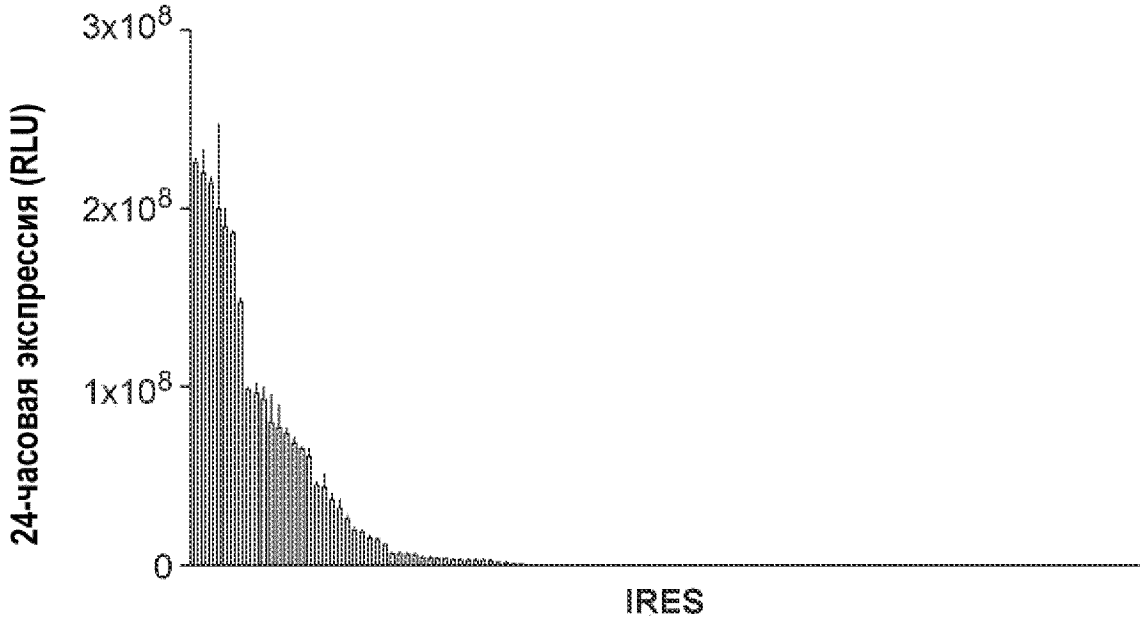
Фиг. 1B



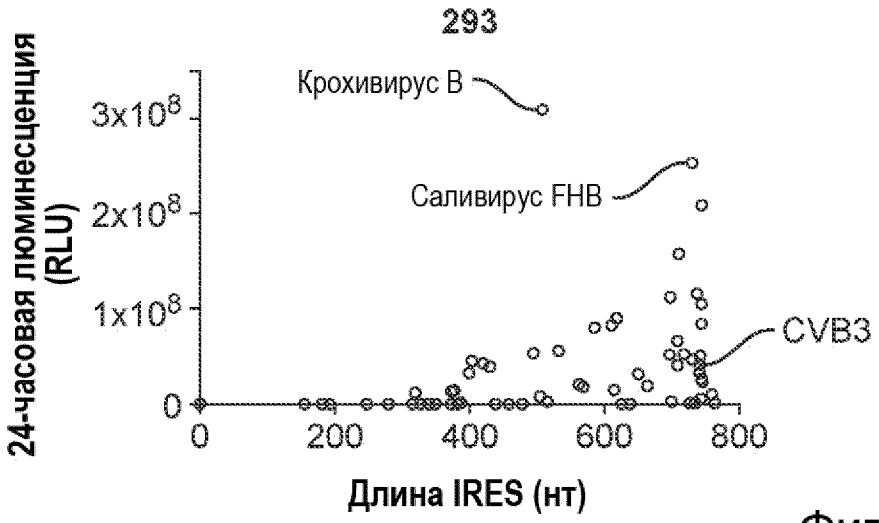
Фиг. 1C


24-часовая экспрессия (RLU)
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
IRES

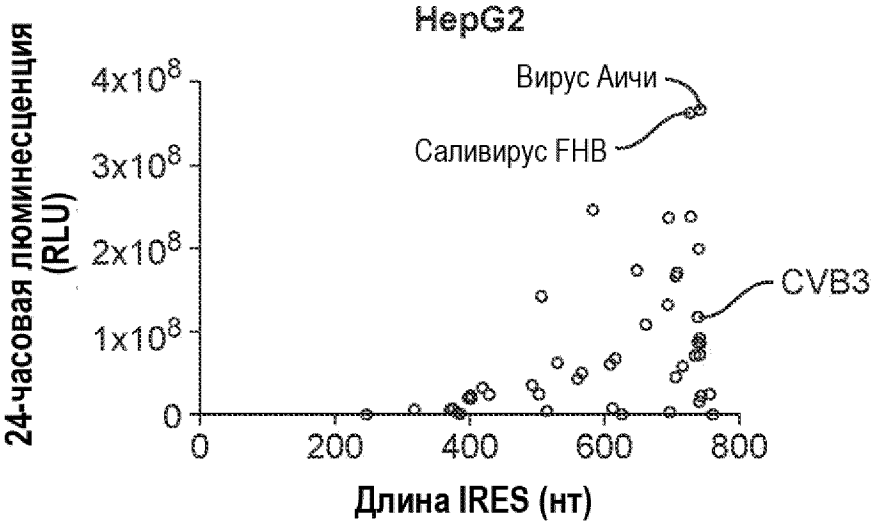
Фиг. 1D


24-часовая экспрессия (RLU)
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
IRES

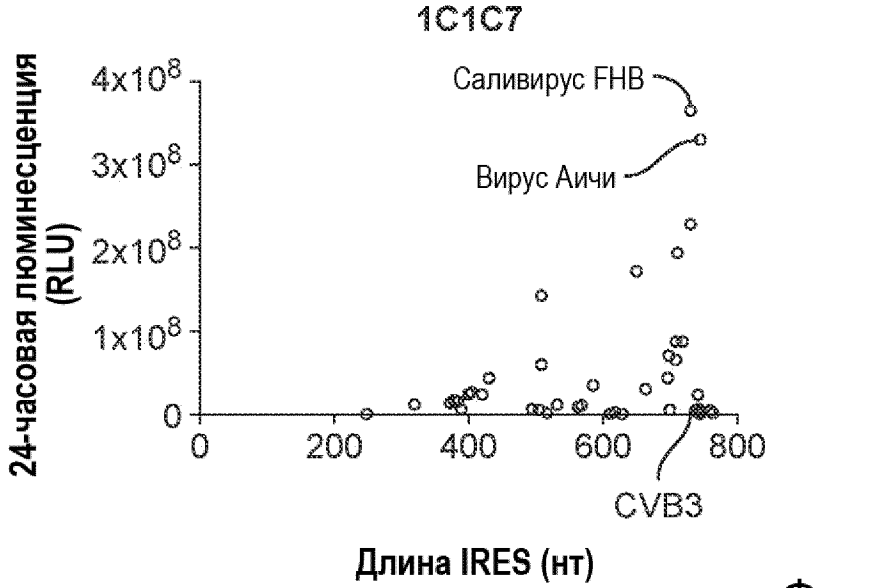
Фиг. 1E



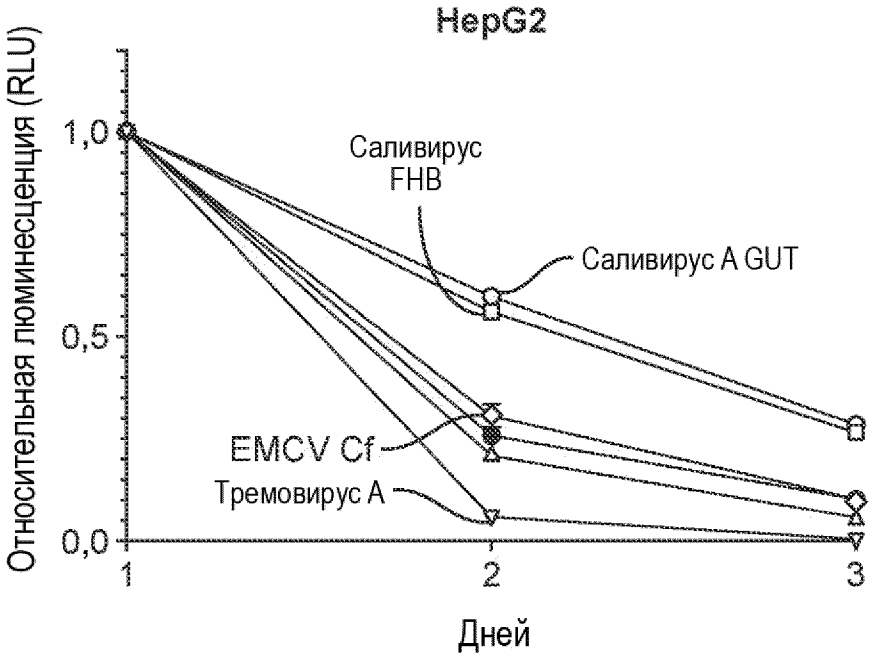
Фиг. 2A



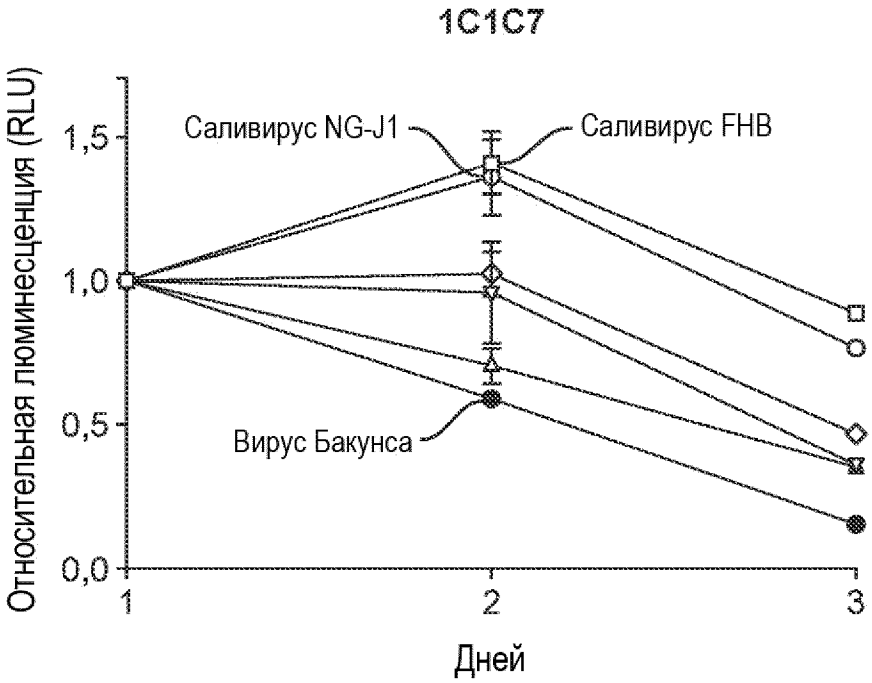
Фиг. 2B



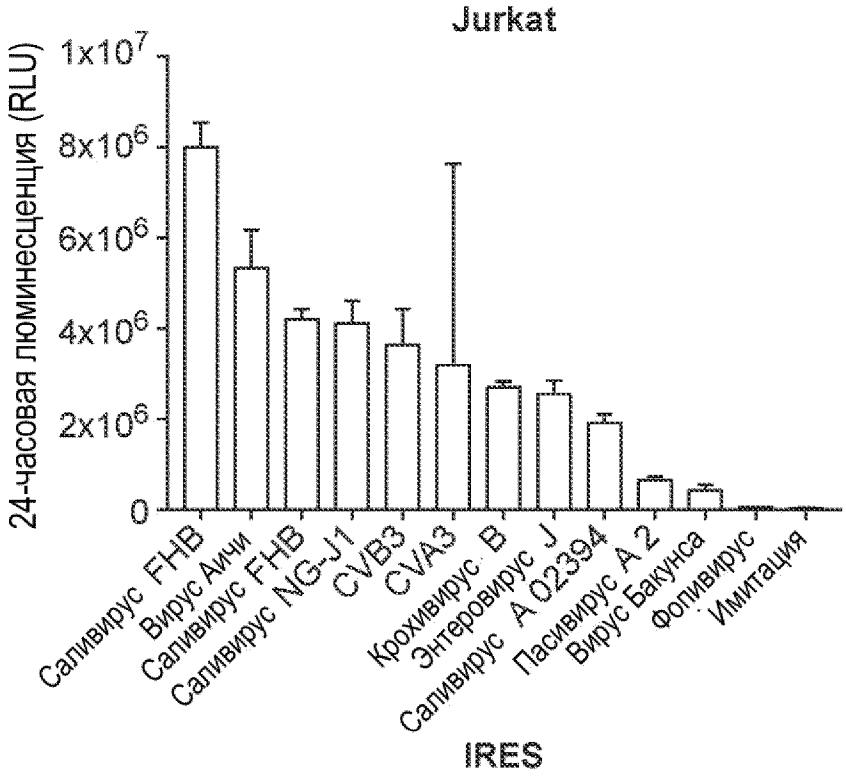
Фиг. 2C


HepG2
Относительная люминесценция (RLU)
1,0
0,5
0,0
1
2
3
Дней
Саливирус FHB
Саливирус A GUT
EMCV Cf
Тремовирус A

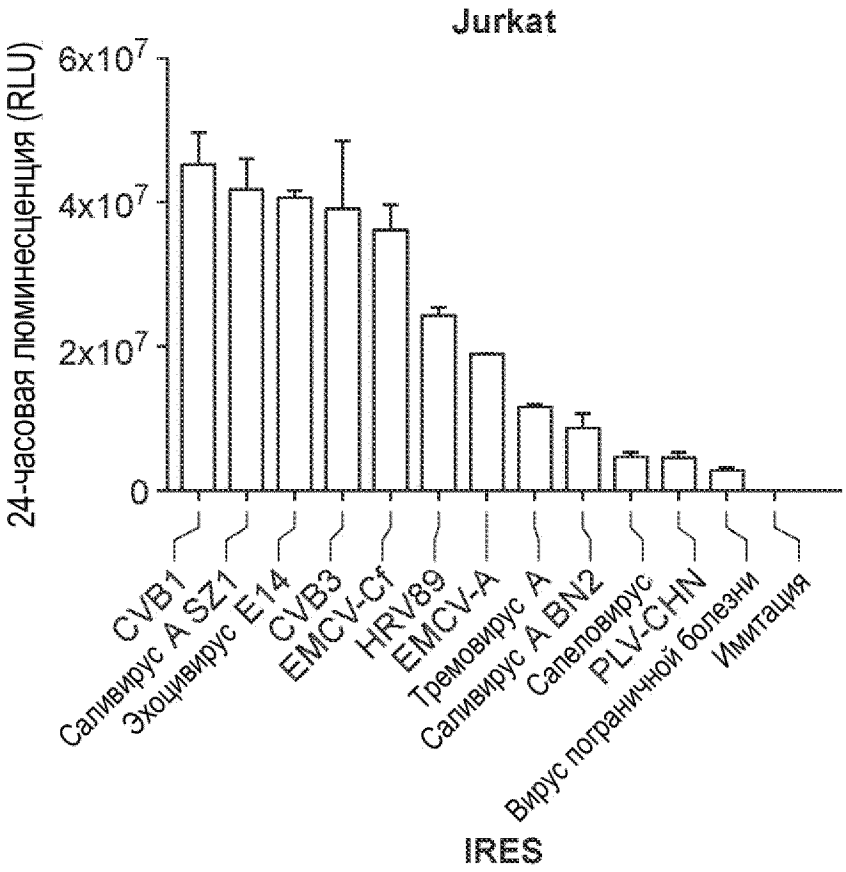
Фиг. 3A


1C1C7
Относительная люминесценция (RLU)
1,5
1,0
0,5
0,0
1
2
3
Дней
Саливирус NG-J1
Саливирус FHB
Вирус Бакунса

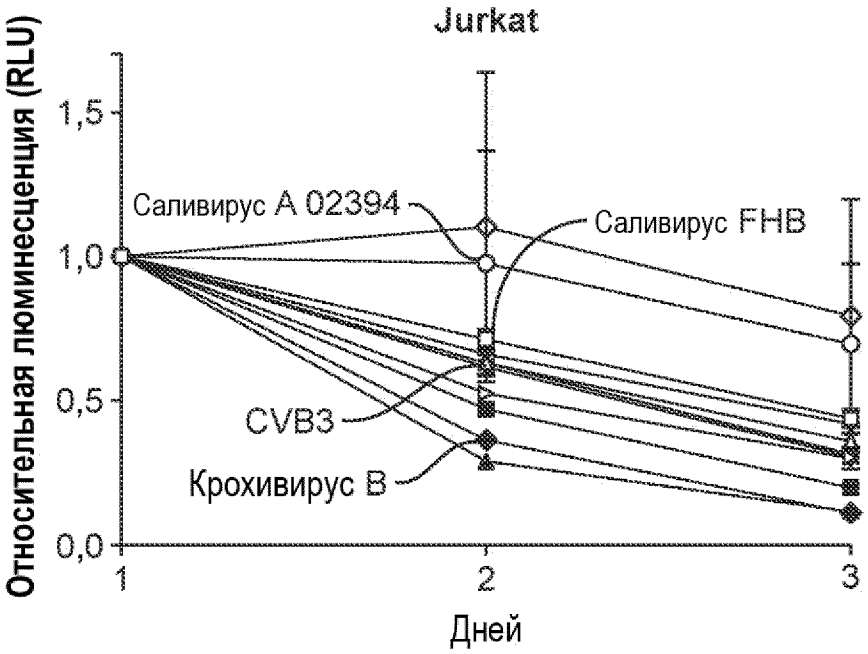
Фиг. 3B


Jurkat
24-часовая люминесценция (RLU)
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
Саливирус FHB
Вирус Аичи
Саливирус FHB
Саливирус NG-J1
CVB3
CVA3
Крохивирус B
Энтеровирус J
Саливирус A 02394
Пасивирус A 2
Вирус Бакунса
Фопивирус
Имитация
IRES

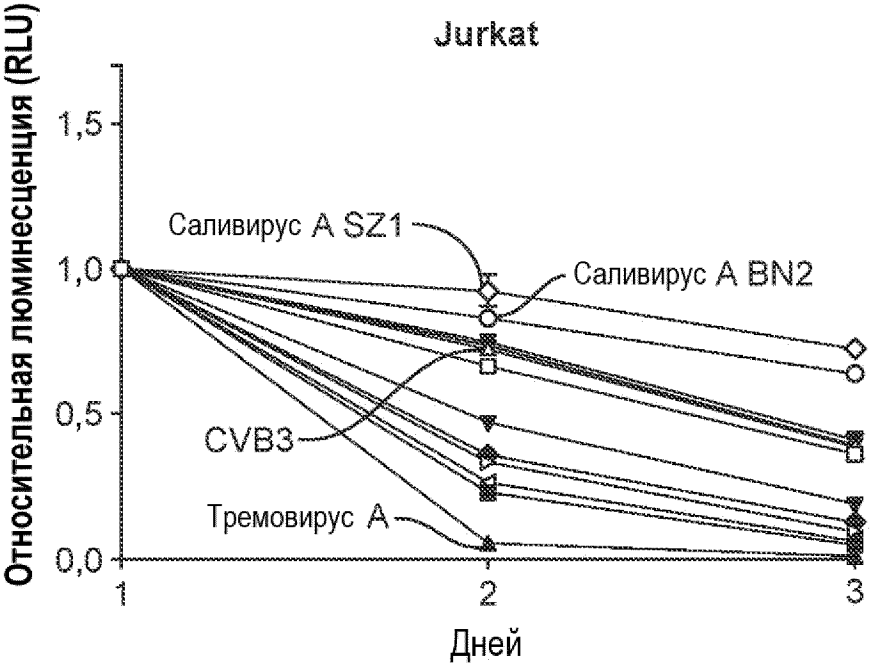
Фиг. 4A


Jurkat
24-часовая люминесценция (RLU)
6x10^7
4x10^7
2x10^7
0
CVB1
Саливирус A SZ1
Эхоцивирус E14
CVB3
EMCV-Cf
HRV89
EMCV-A
Тремовирус A
Саливирус A BN2
Сапеловирус
PLV-CHN
Вирус пограничной болезни
Имитация
IRES

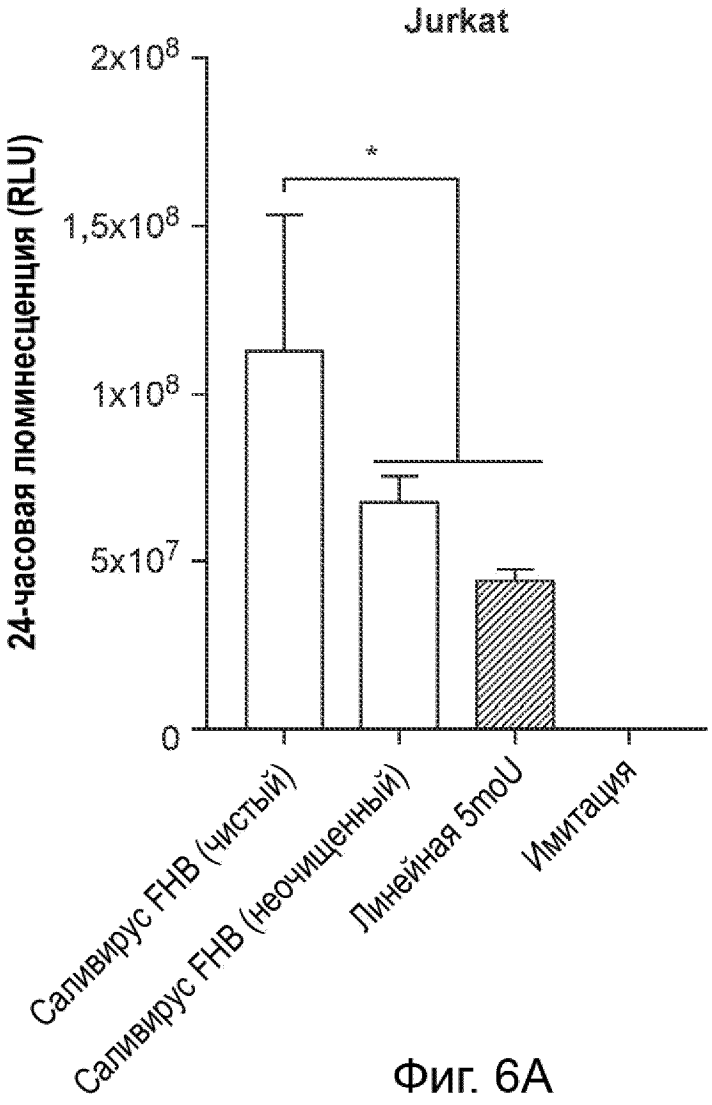
Фиг. 4B


Jurkat
Относительная люминесценция (RLU)
1,5
1,0
0,5
0,0
Саливирус A 02394
Саливирус FHB
CVB3
Крохивирус B
1
2
3
Дней

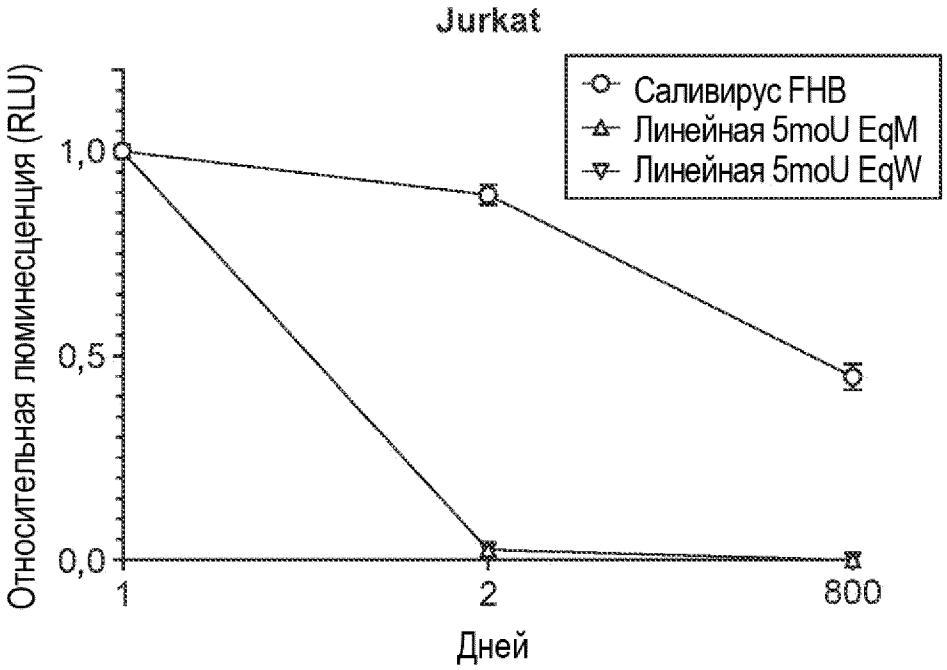
Фиг. 5A


Jurkat
Относительная люминесценция (RLU)
1,5
1,0
0,5
0,0
Саливирус A SZ1
Саливирус A BN2
CVB3
Тремовирус A
1
2
3
Дней

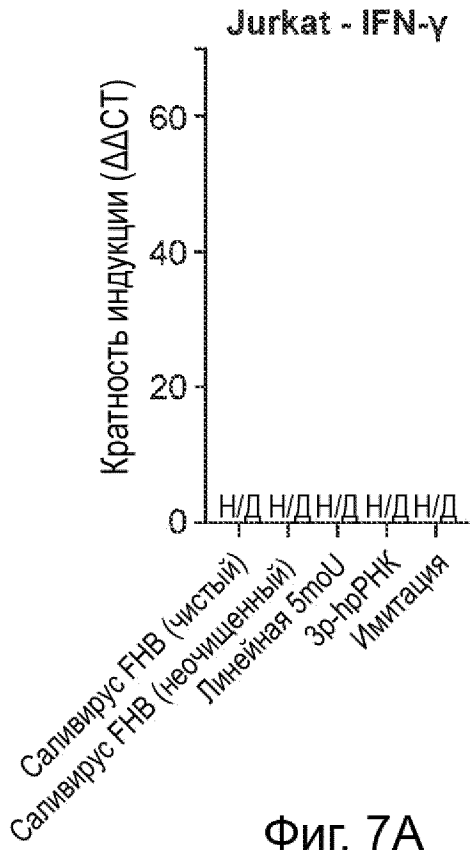
Фиг. 5B


Jurkat
24-часовая люминесценция (RLU)
2x10^8
1,5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
*
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
Имитация

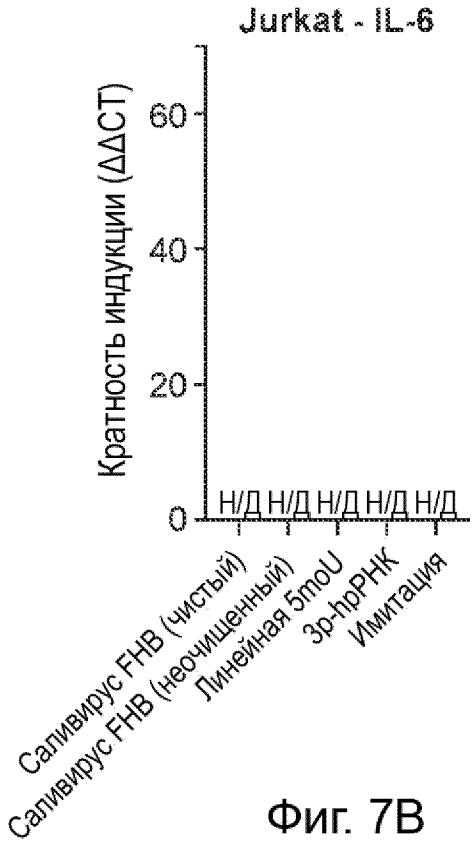
Фиг. 6A


Jurkat
Саливирус FHB
Линейная 5moU EqM
Линейная 5moU EqW
Относительная люминесценция (RLU)
1,0
0,5
0,0
1
2
800
Дней

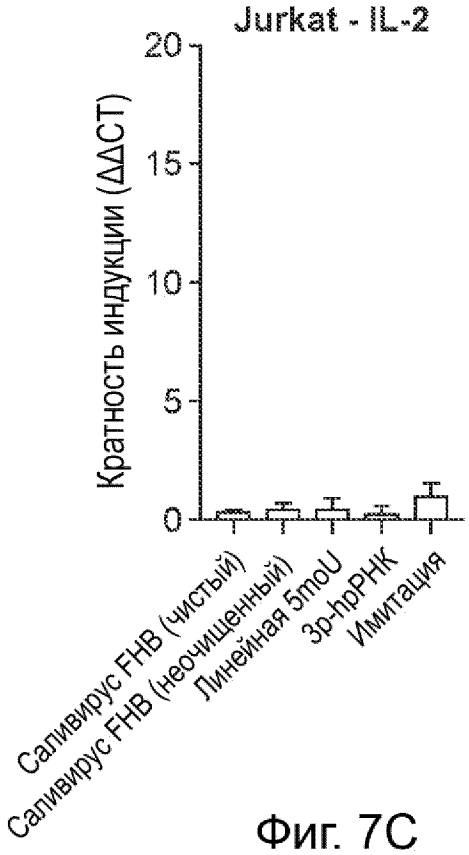
Фиг. 6B


Jurkat - IFN-γ
Кратность индукции (ΔΔCT)
60
40
20
0
Н/Д Н/Д Н/Д Н/Д Н/Д
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpPHK
Имитация

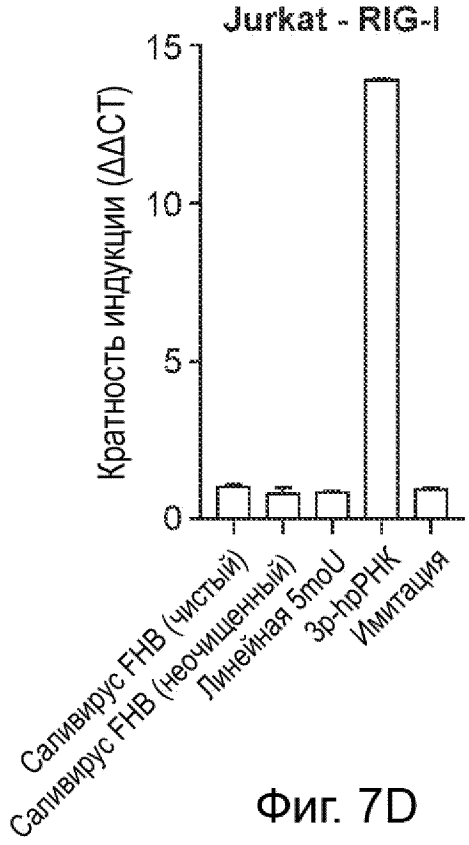
Фиг. 7A


Jurkat - IL-6
Кратность индукции (ΔΔCT)
60
40
20
0
Н/Д Н/Д Н/Д Н/Д Н/Д
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpPHK
Имитация

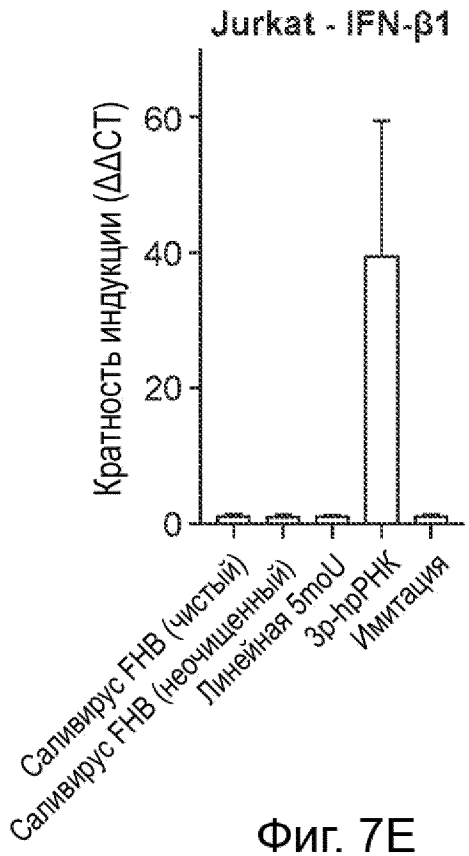
Фиг. 7B


Jurkat - IL-2
Кратность индукции (ΔΔCT)
20
15
10
5
0
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpРНК
Имитация

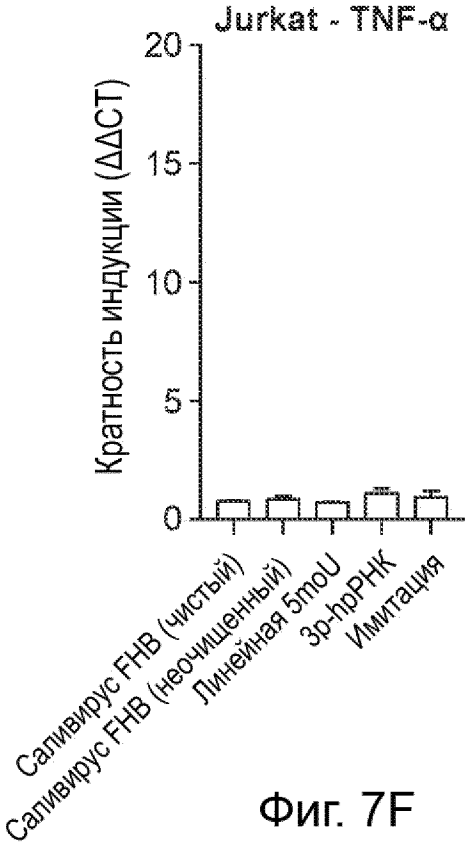
Фиг. 7C


Jurkat - RIG-I
Кратность индукции (ΔΔCT)
15
10
5
0
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpРНК
Имитация

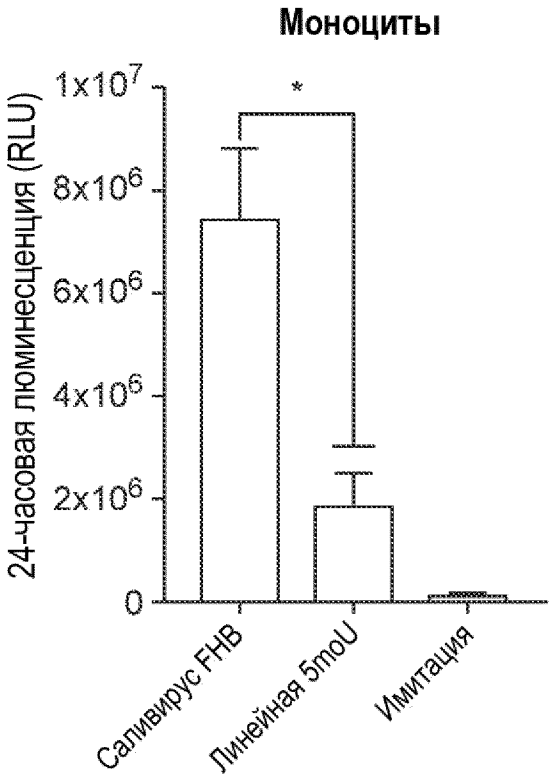
Фиг. 7D


Jurkat - IFN-β1
Кратность индукции (ΔΔCT)
60
40
20
0
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpРНК
Имитация

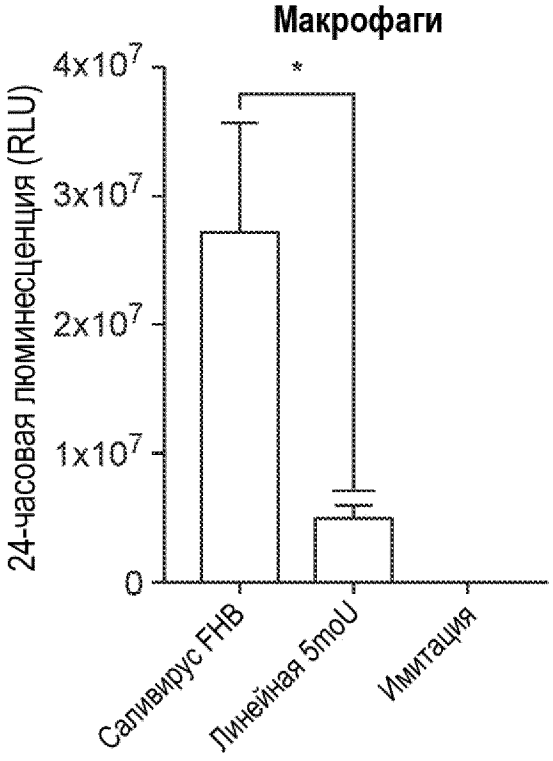
Фиг. 7E


Jurkat - TNF-α
Кратность индукции (ΔΔCT)
20
15
10
5
0
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpРНК
Имитация

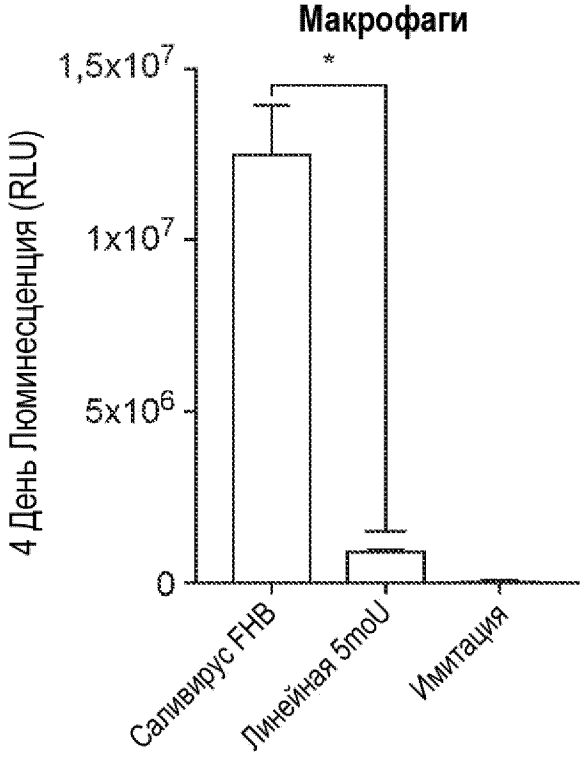
Фиг. 7F


Моноциты
24-часовая люминесценция (RLU)
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
*
Саливирус FHB
Линейная 5moU
Имитация

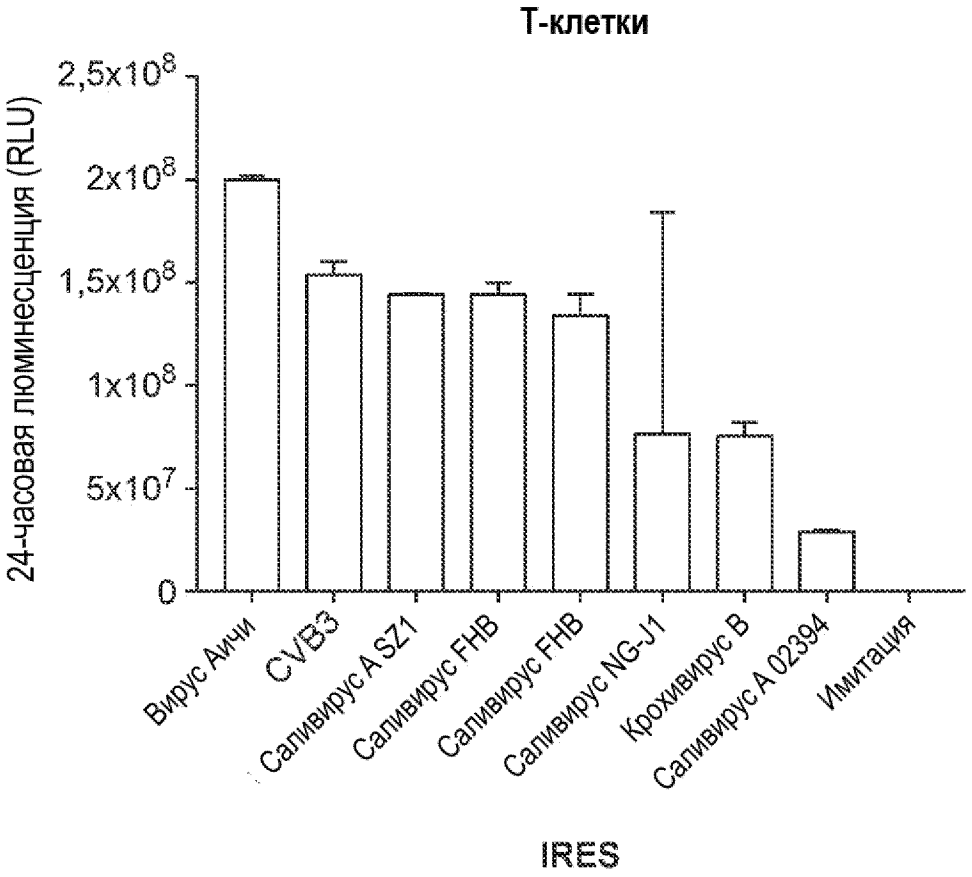
Фиг. 8A


Макрофаги
24-часовая люминесценция (RLU)
4x10^7
3x10^7
2x10^7
1x10^7
0
*
Саливирус FHB
Линейная 5moU
Имитация

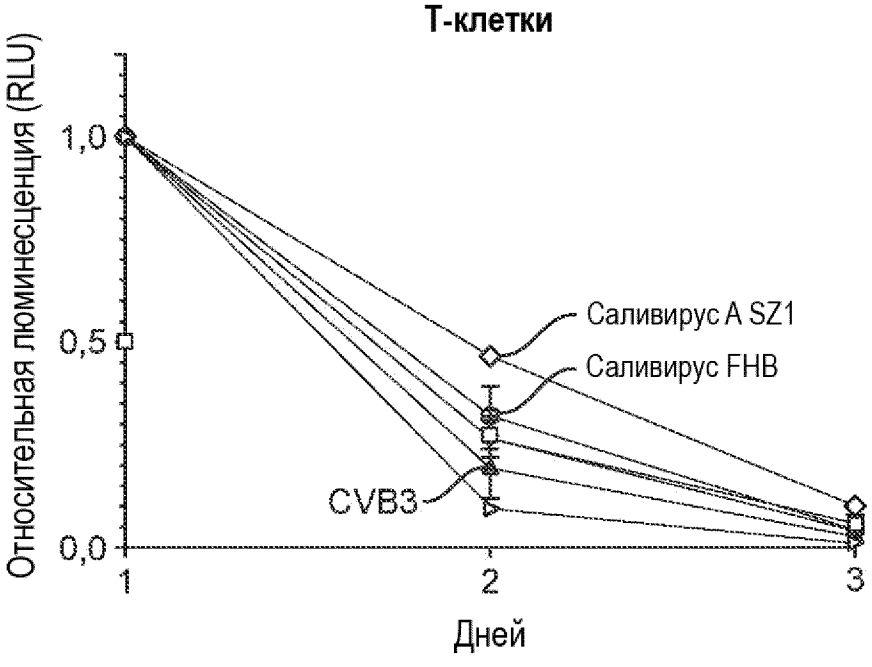
Фиг. 8B


Макрофаги
4 День Люминесценция (RLU)
1,5x10^7
1x10^7
5x10^6
0
*
Саливирус FHB
Линейная 5moU
Имитация

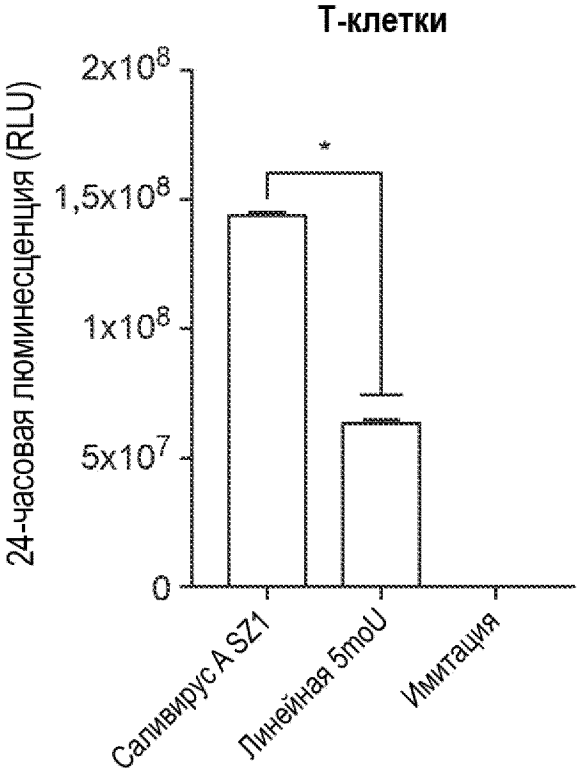
Фиг. 8C


Т-клетки
24-часовая люминесценция (RLU)
2,5x10^8
2x10^8
1,5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
Вирус Аичи
CVB3
Саливирус A SZ1
Саливирус FHB
Саливирус FHB
Саливирус NG-J1
Крохивирус B
Саливирус A 02394
Имитация
IRES

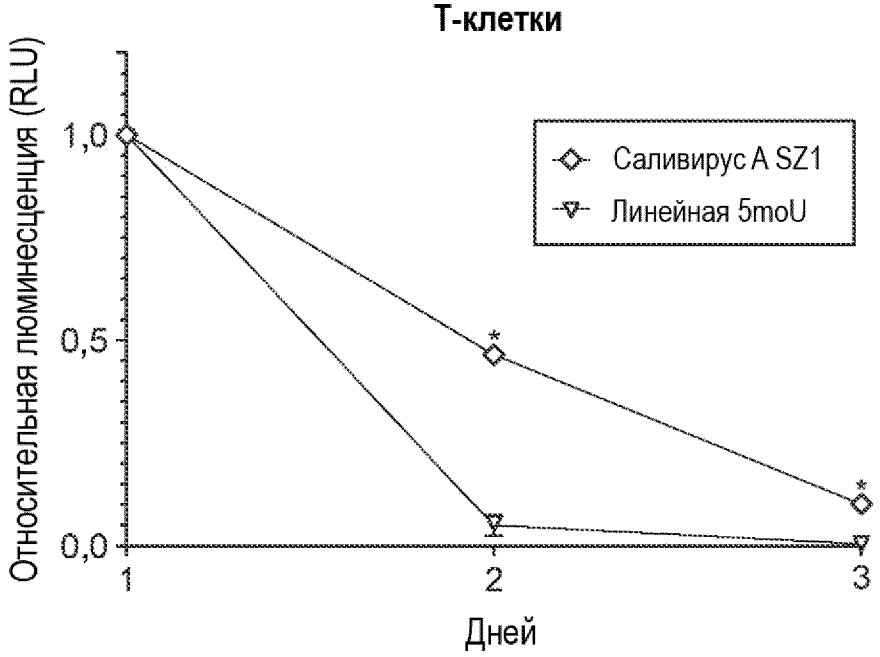
Фиг. 9A


Т-клетки
Относительная люминесценция (RLU)
1,0
0,5
0,0
1
2
3
Дней
Саливирус A SZ1
Саливирус FHB
CVB3

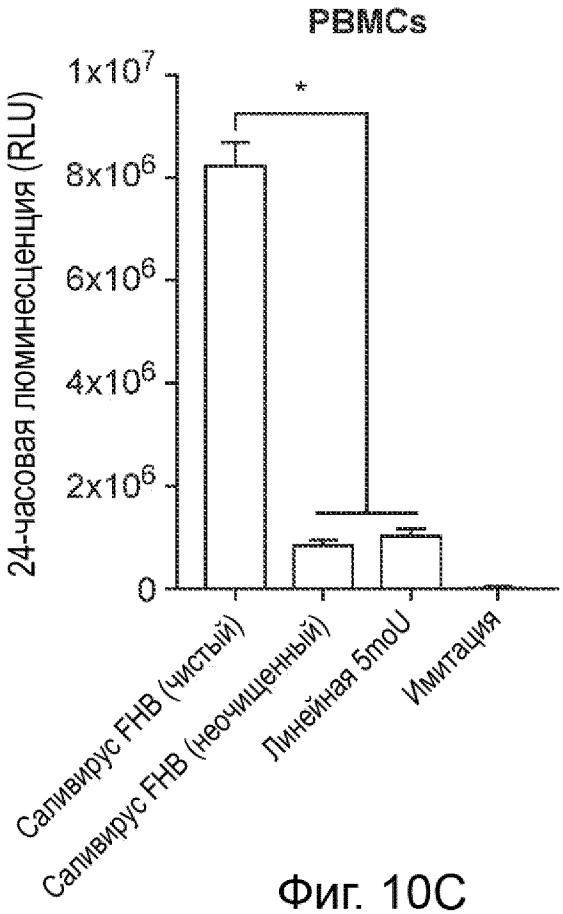
Фиг. 9B



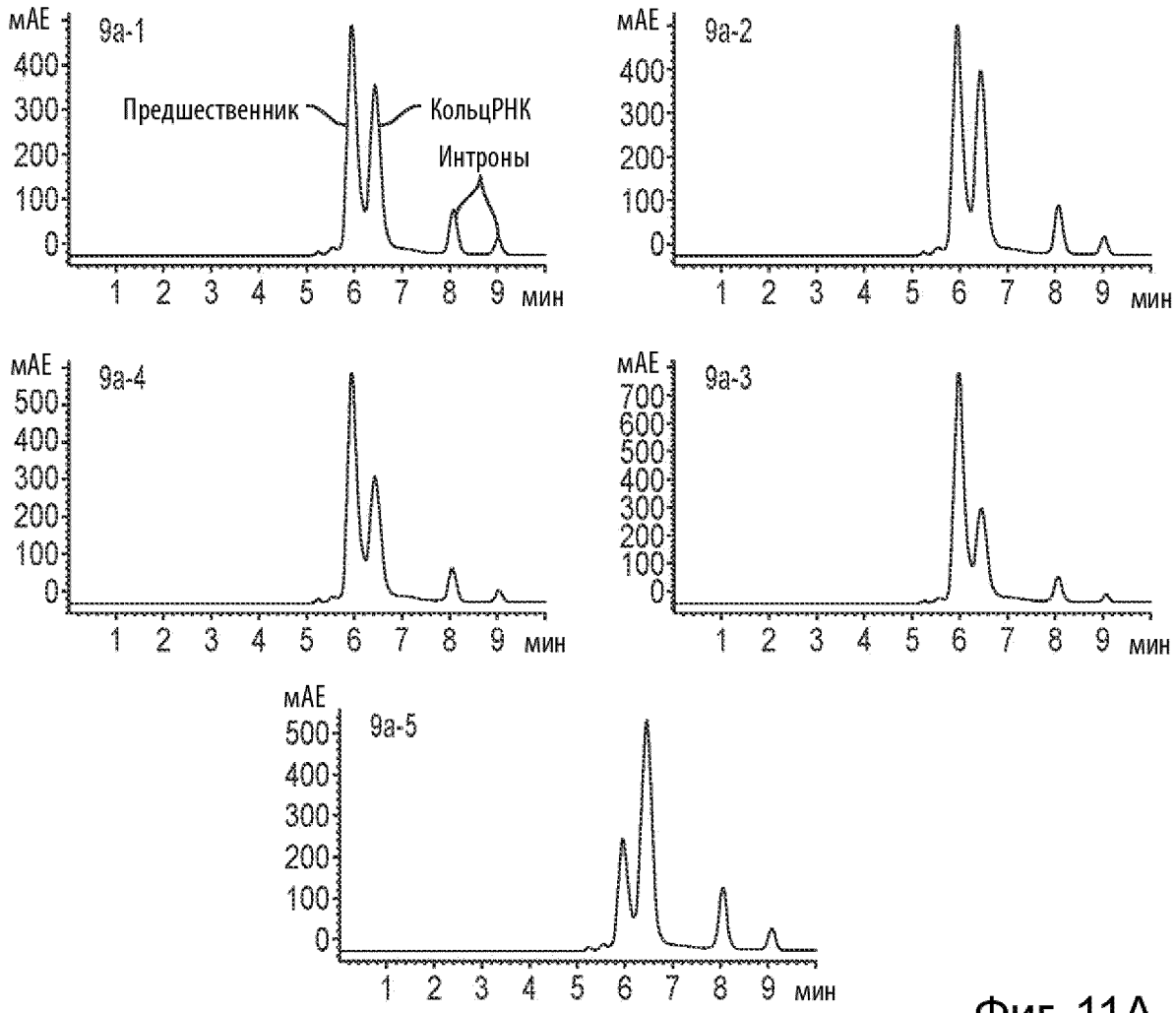
Фиг. 10A



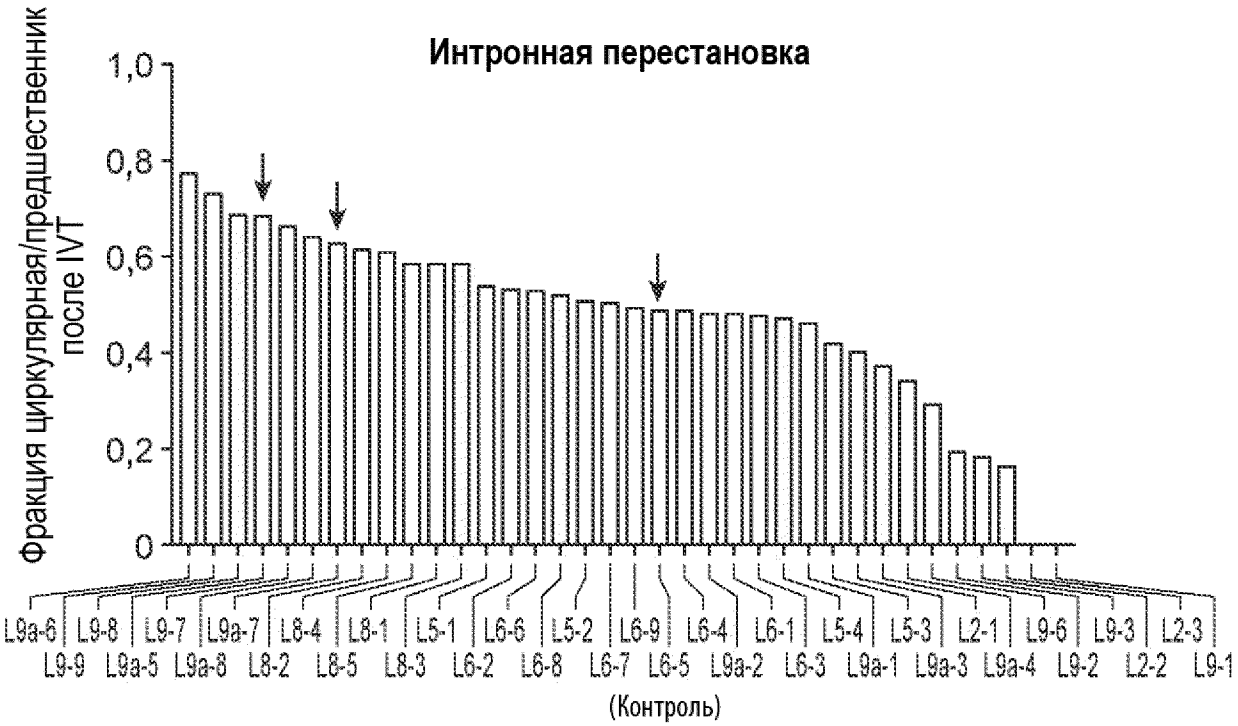
Фиг. 10B


PBMCs
24-часовая люминесценция (RLU)
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
*
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
Имитация

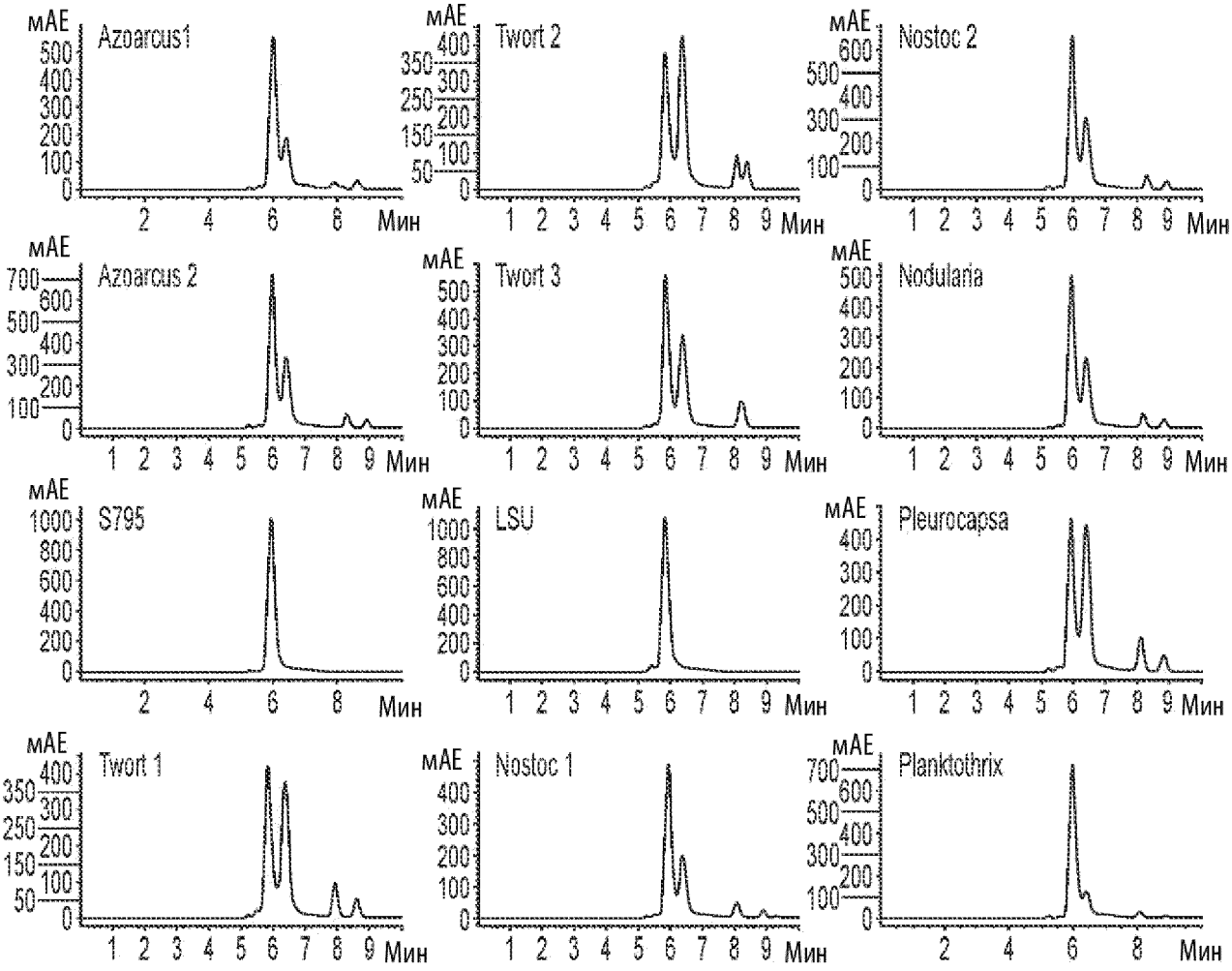
Фиг. 10C



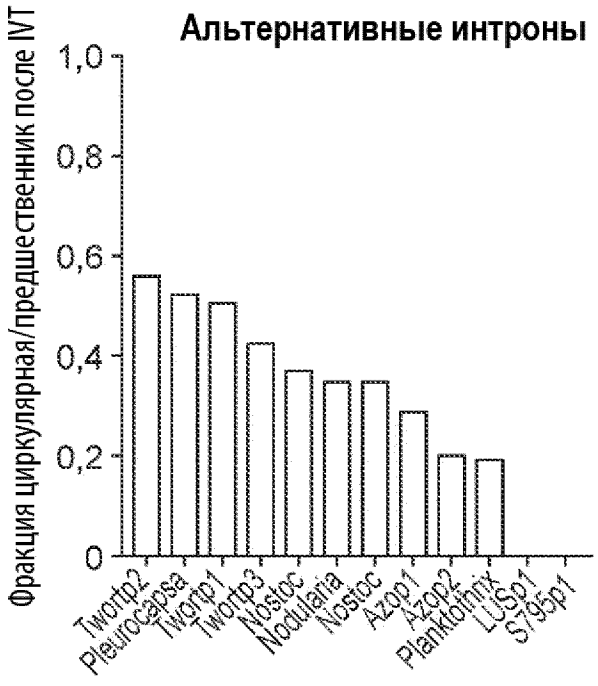
Фиг. 11A



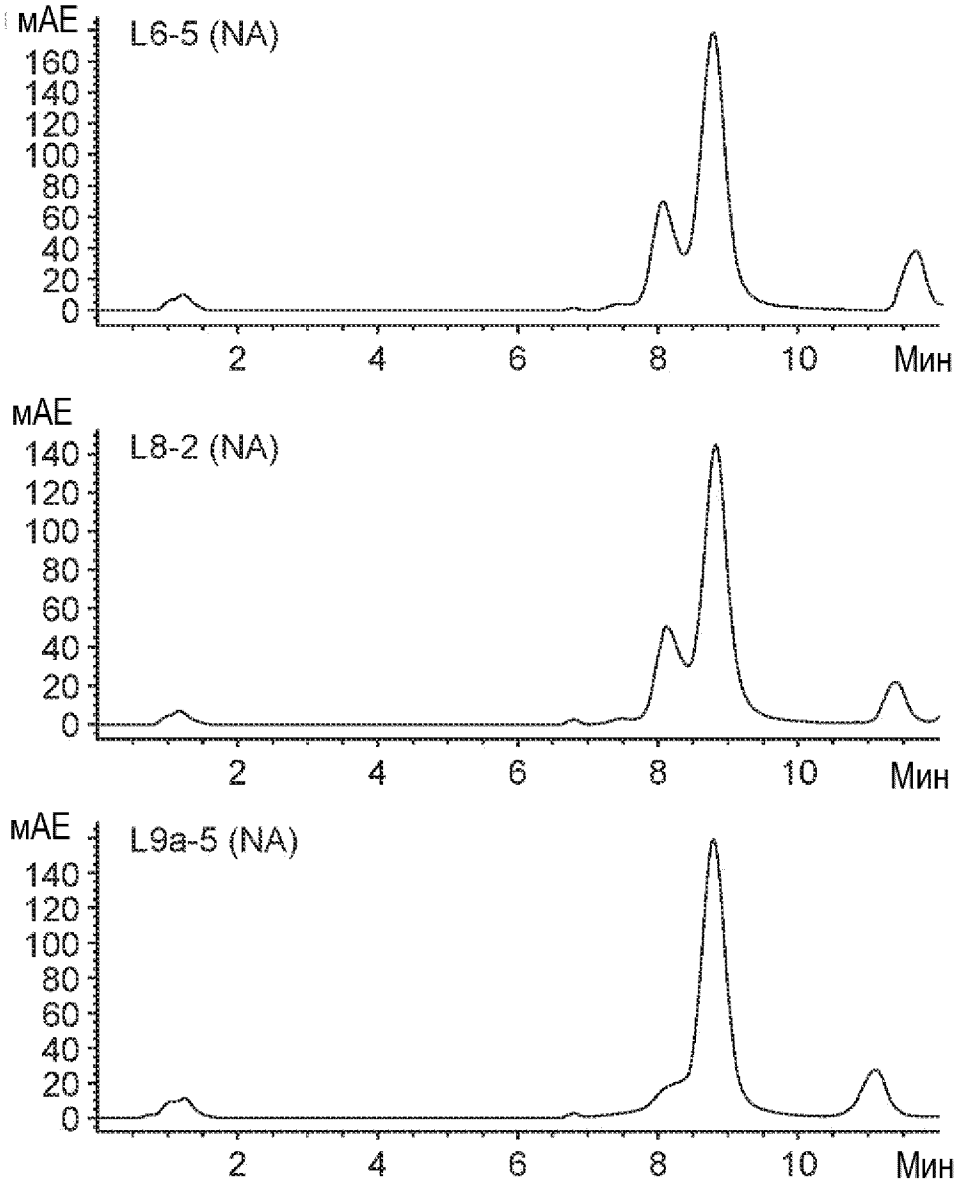
Фиг. 11B



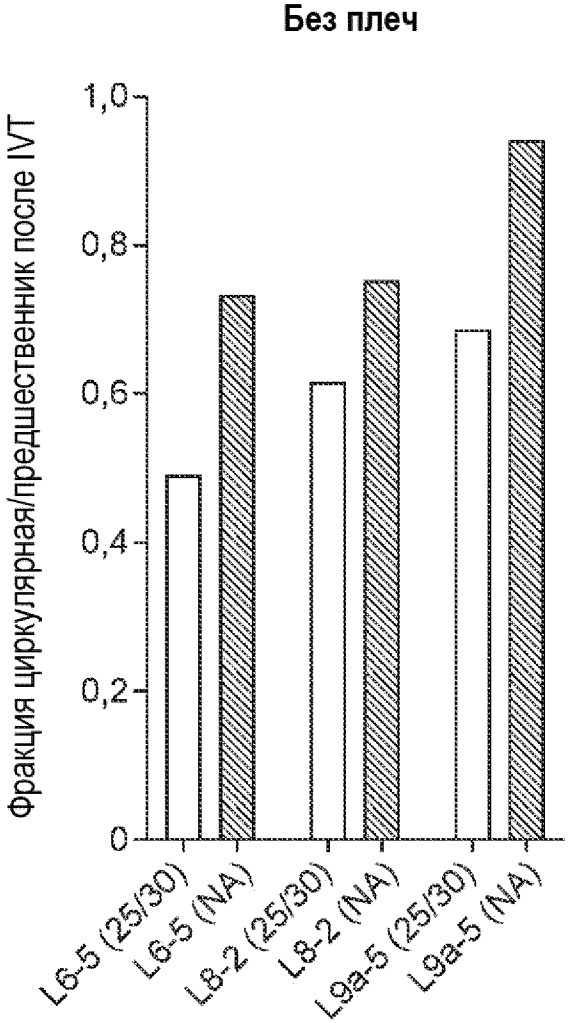
Фиг. 12A



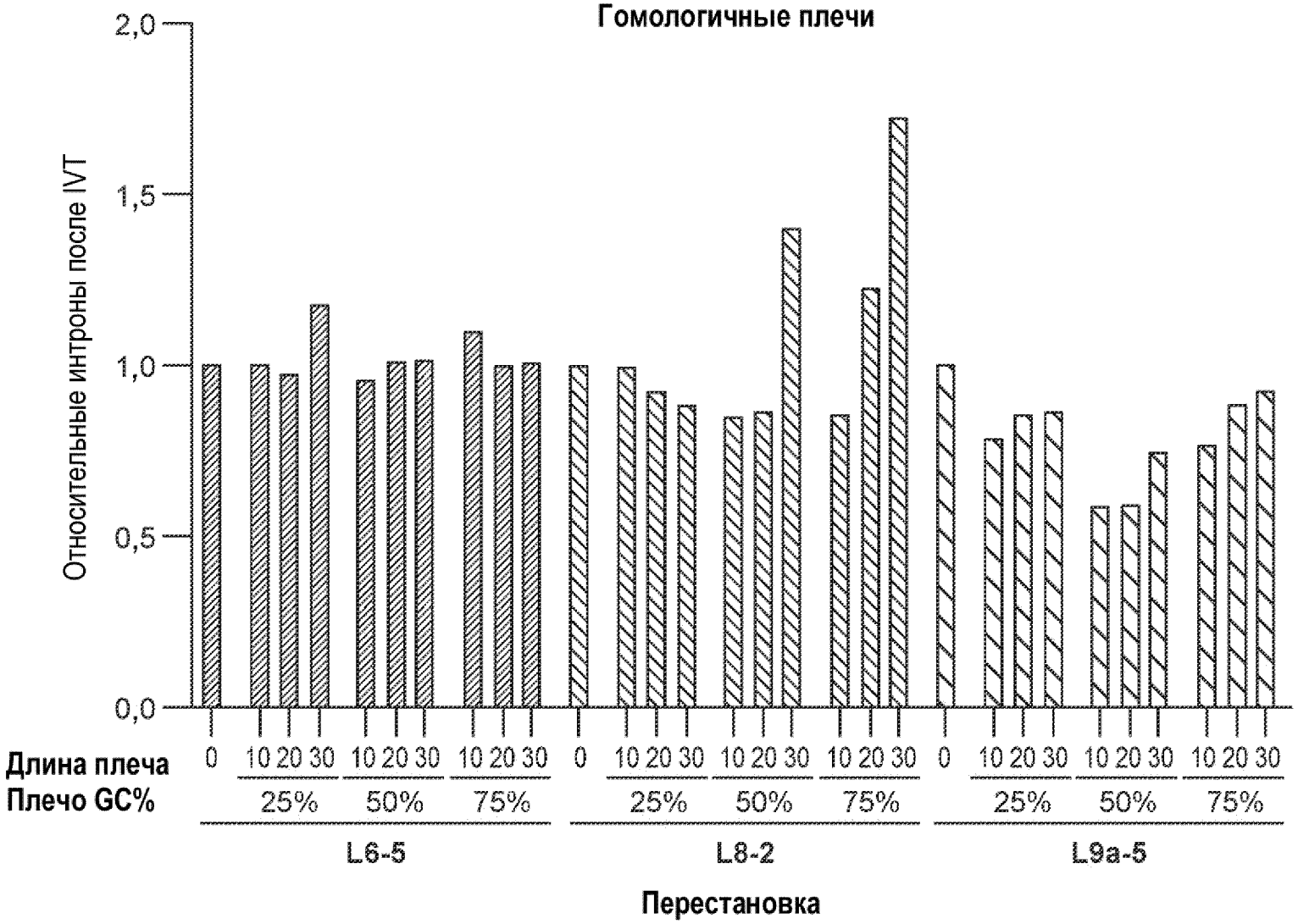
Фиг. 12B


мAE
L6-5 (NA)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
Мин
мAE
L8-2 (NA)
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
Мин
мAE
L9a-5 (NA)
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
Мин

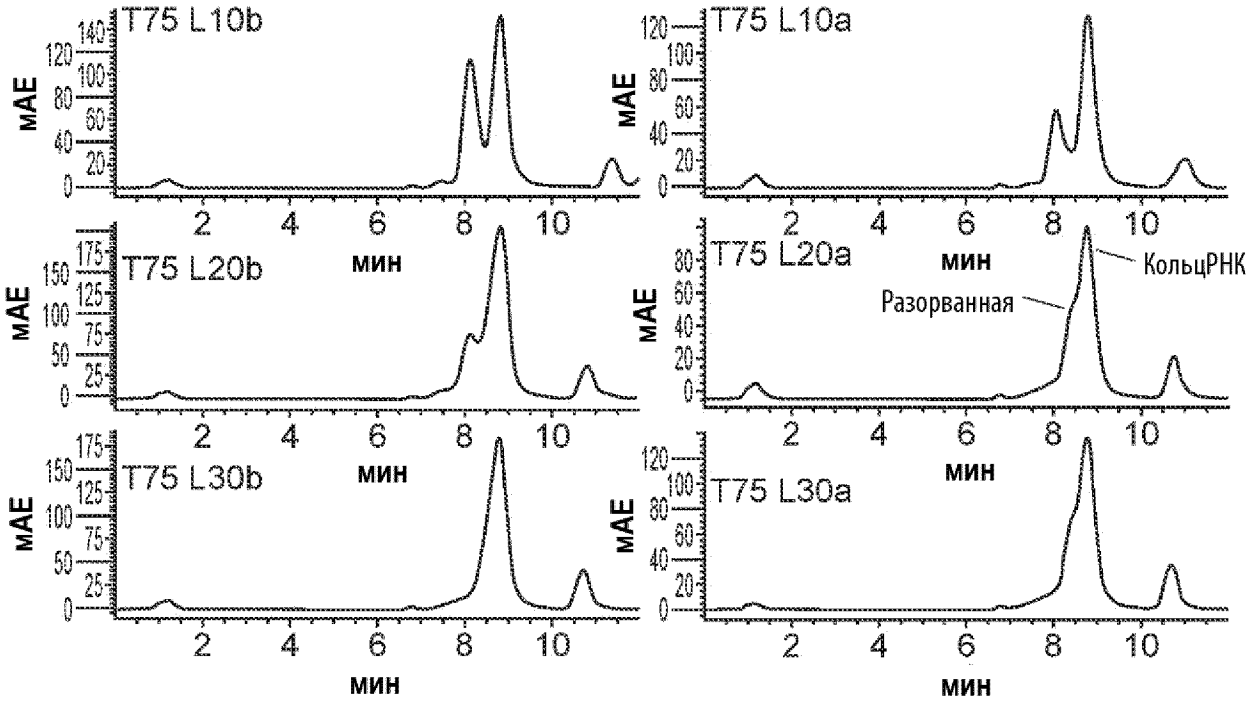
Фиг. 13A


Без плеч
Фракция циркулярная/предшественник после IVT
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
L6-5 (25/30)
L6-5 (NA)
L8-2 (25/30)
L8-2 (NA)
L9a-5 (25/30)
L9a-5 (NA)

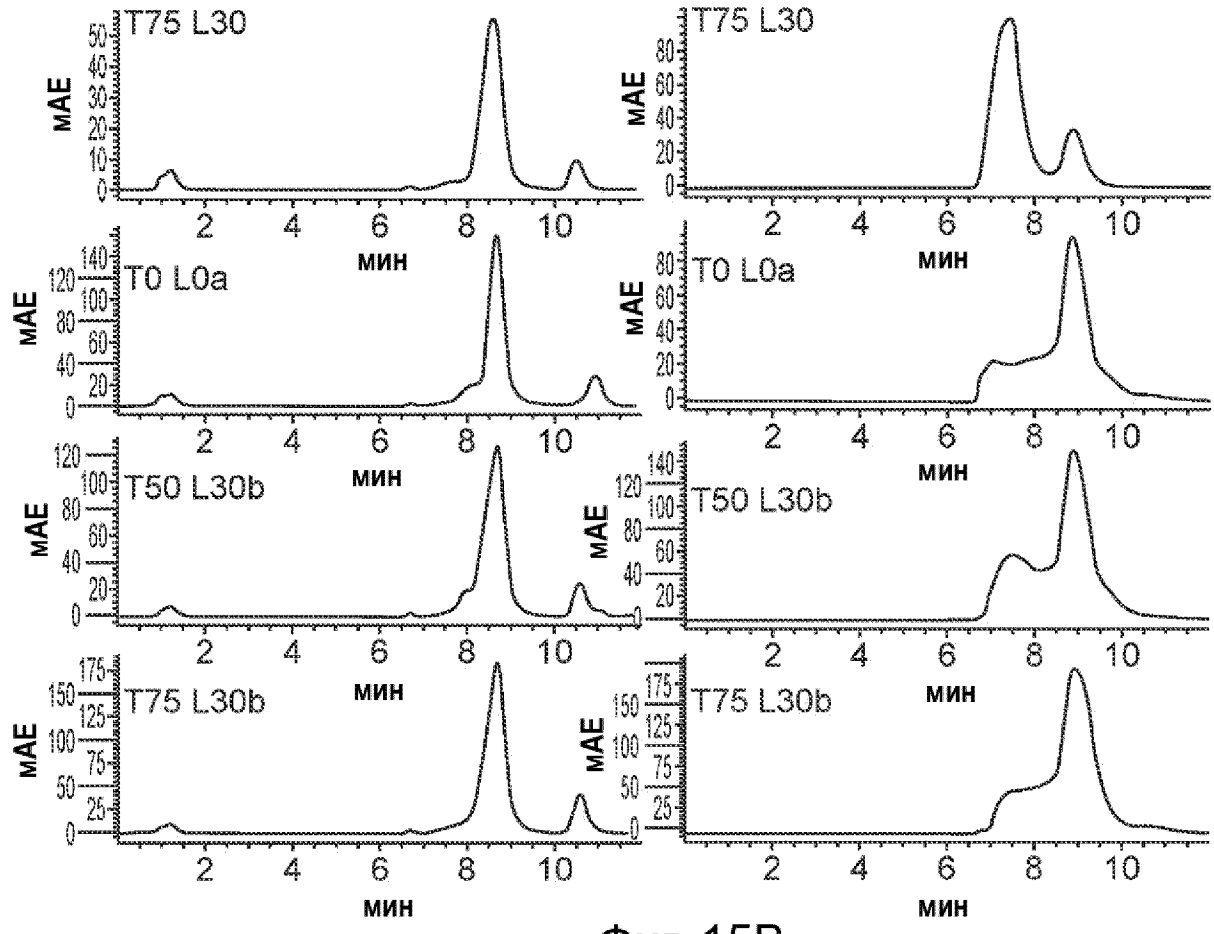
Фиг. 13B


Гомологичные плечи
Относительные интроны после IVT
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Длина плеча
Плечо GC%
0
10 20 30
25%
50%
75%
L6-5
L8-2
L9a-5
Перестановка

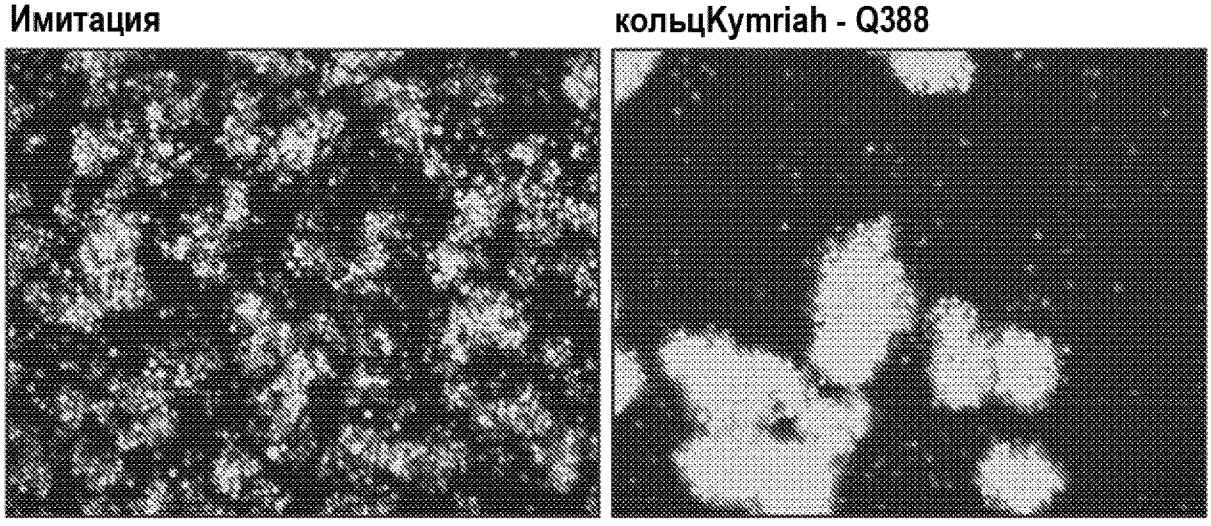
Фиг. 14



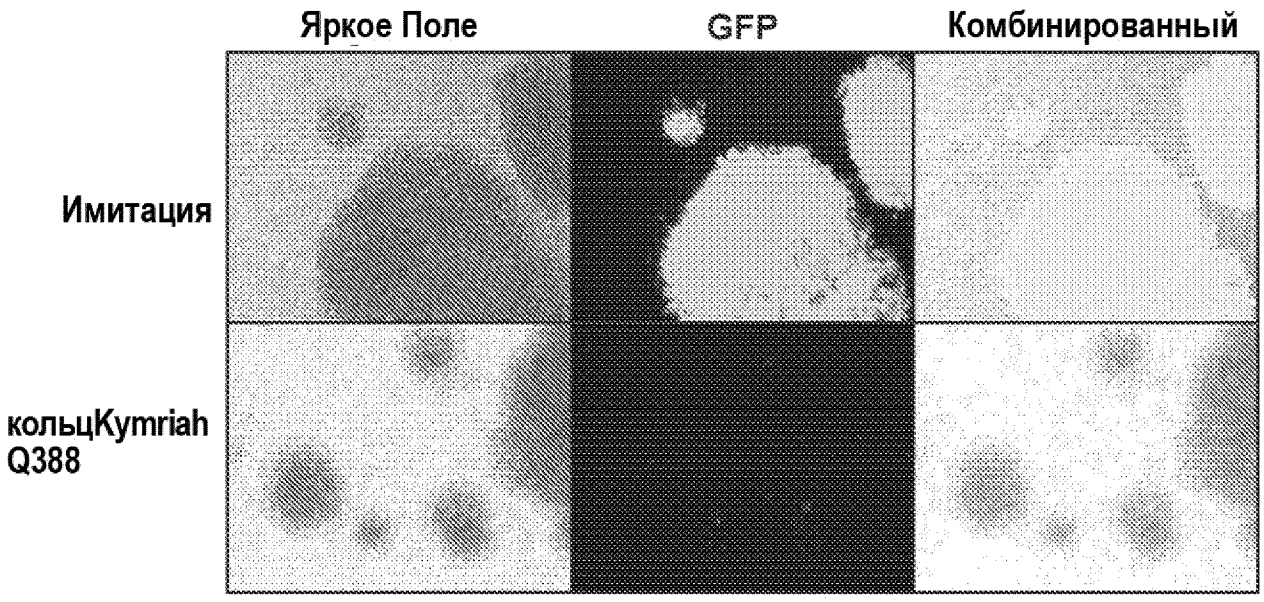
Фиг. 15A



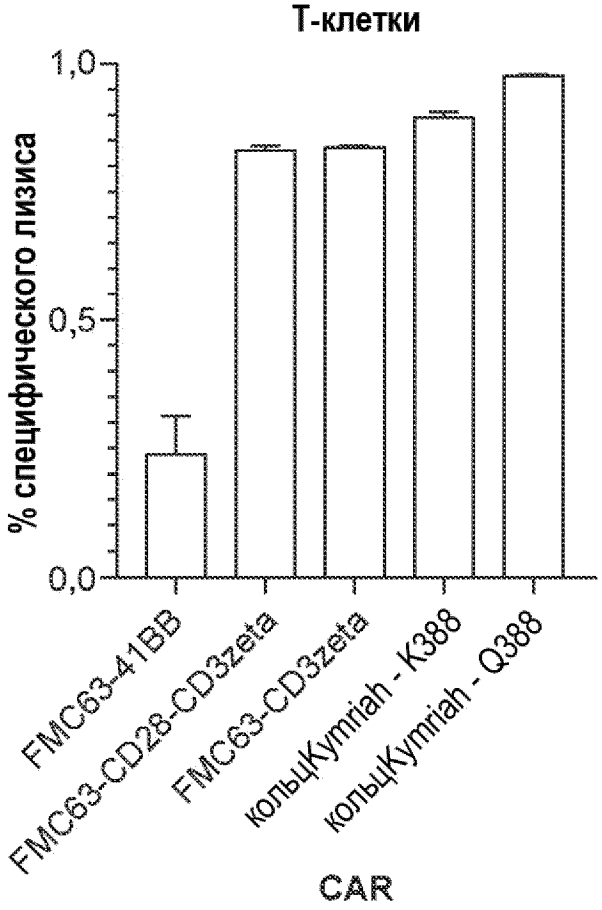
Фиг. 15B



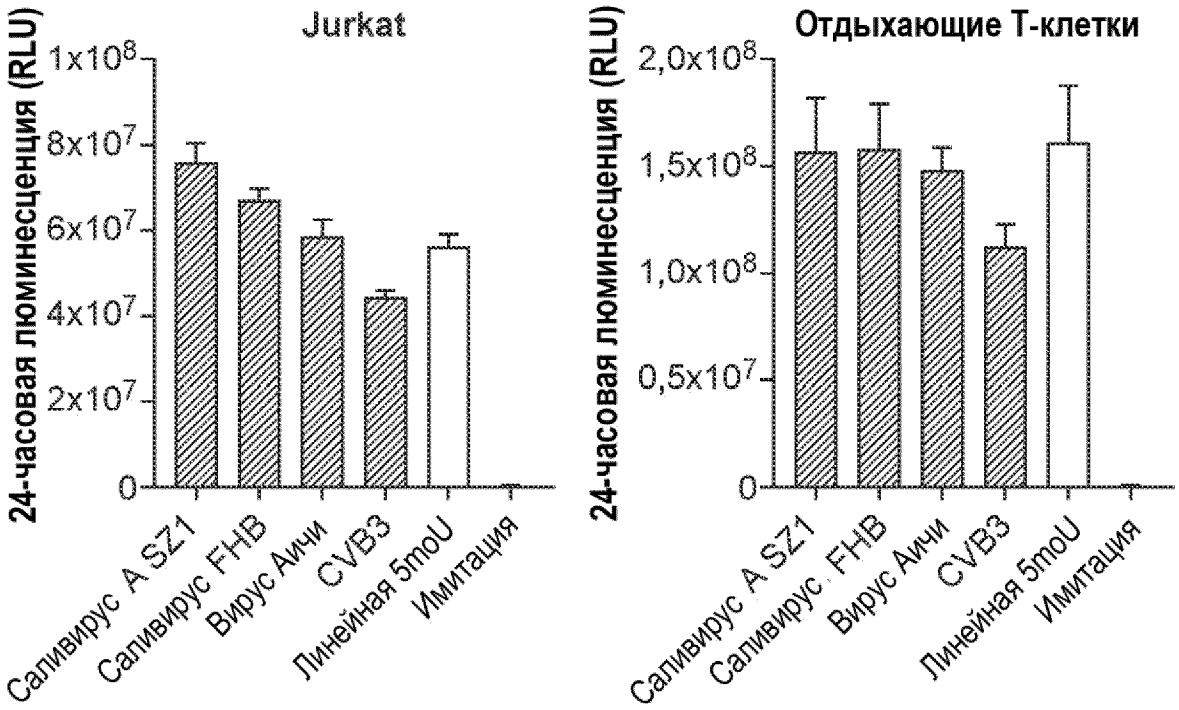
Фиг. 16


Яркое Поле
GFP
Комбинированный
Имитация
кольцKymriah
Q388

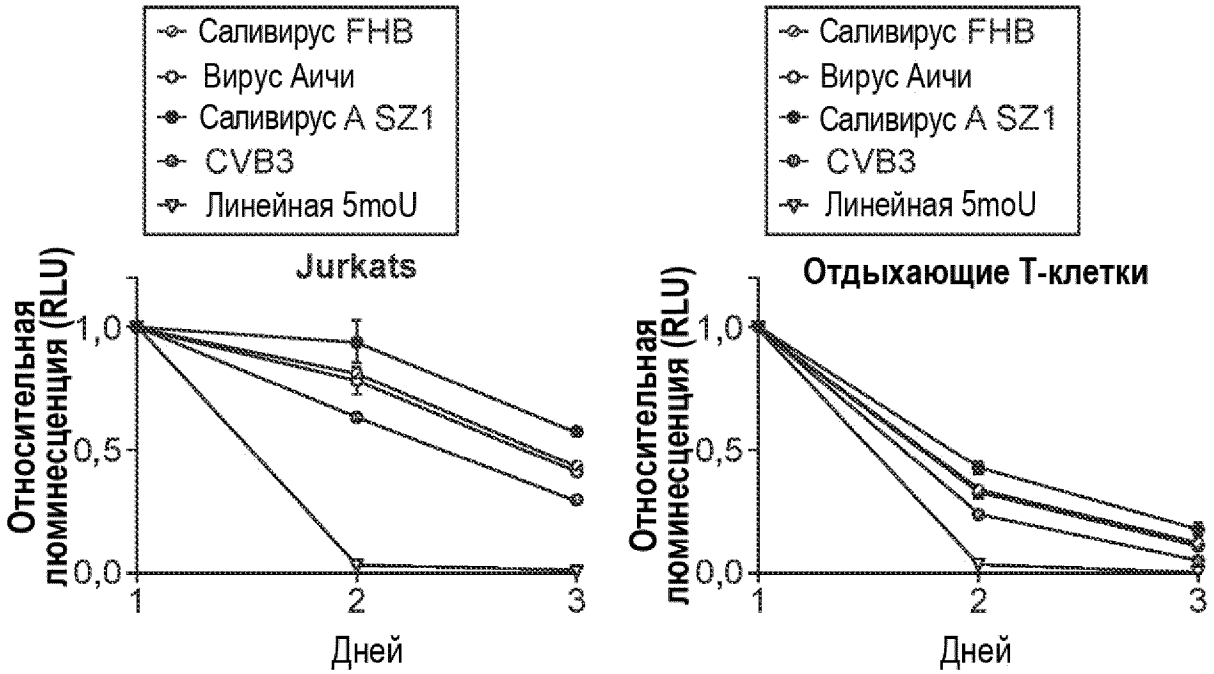
Фиг. 17


Т-клетки
% специфического лизиса
1,0
0,5
0,0
FMC63-41BB
FMC63-CD28-CD3zeta
FMC63-CD3zeta
кольцKymriah - K388
кольцKymriah - Q388
CAR

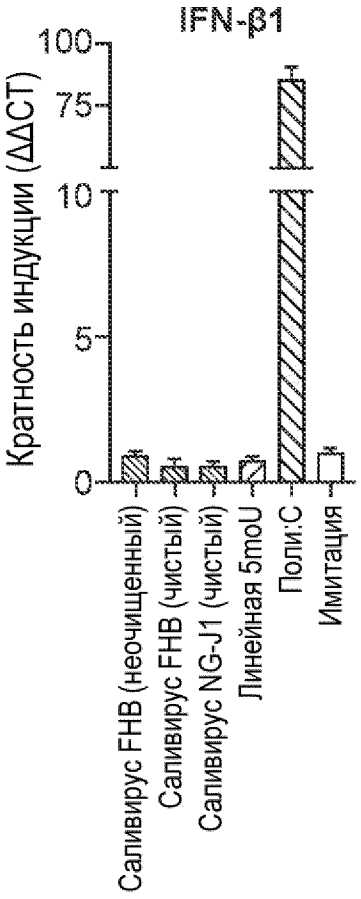
Фиг. 18



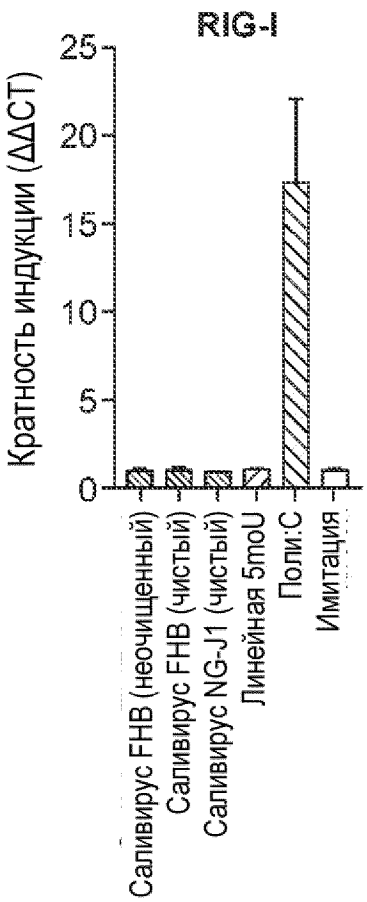
Фиг. 19A



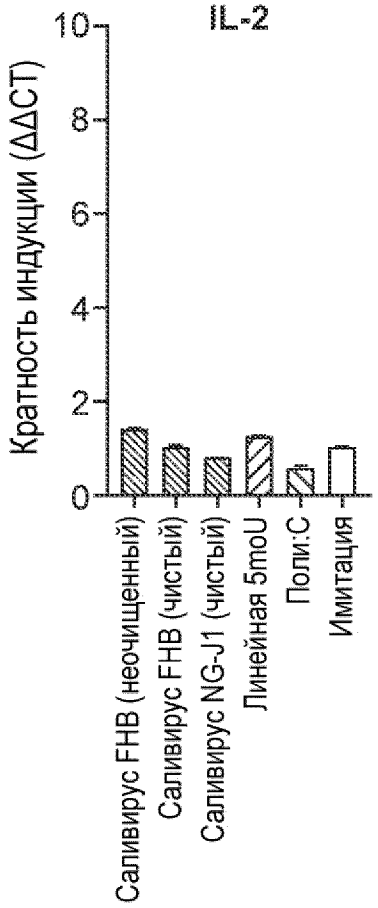
Фиг. 19B



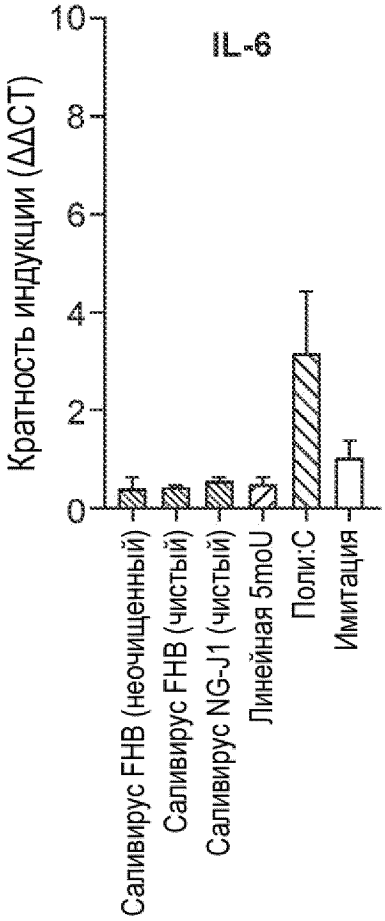
Фиг. 20A



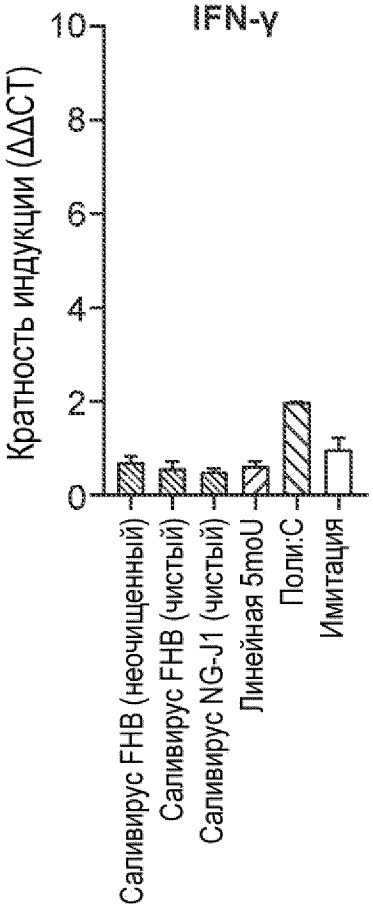
Фиг. 20B



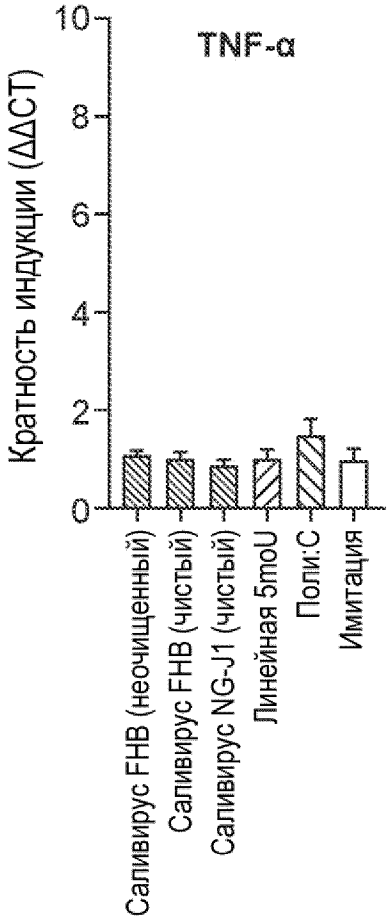
Фиг. 20C



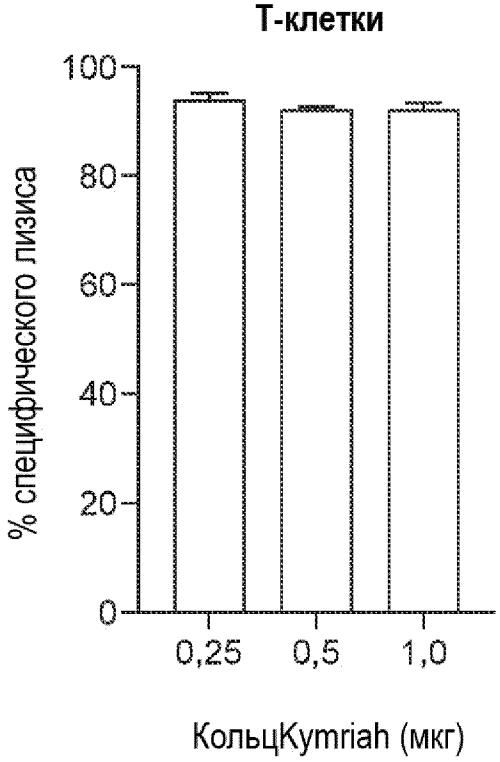
Фиг. 20D



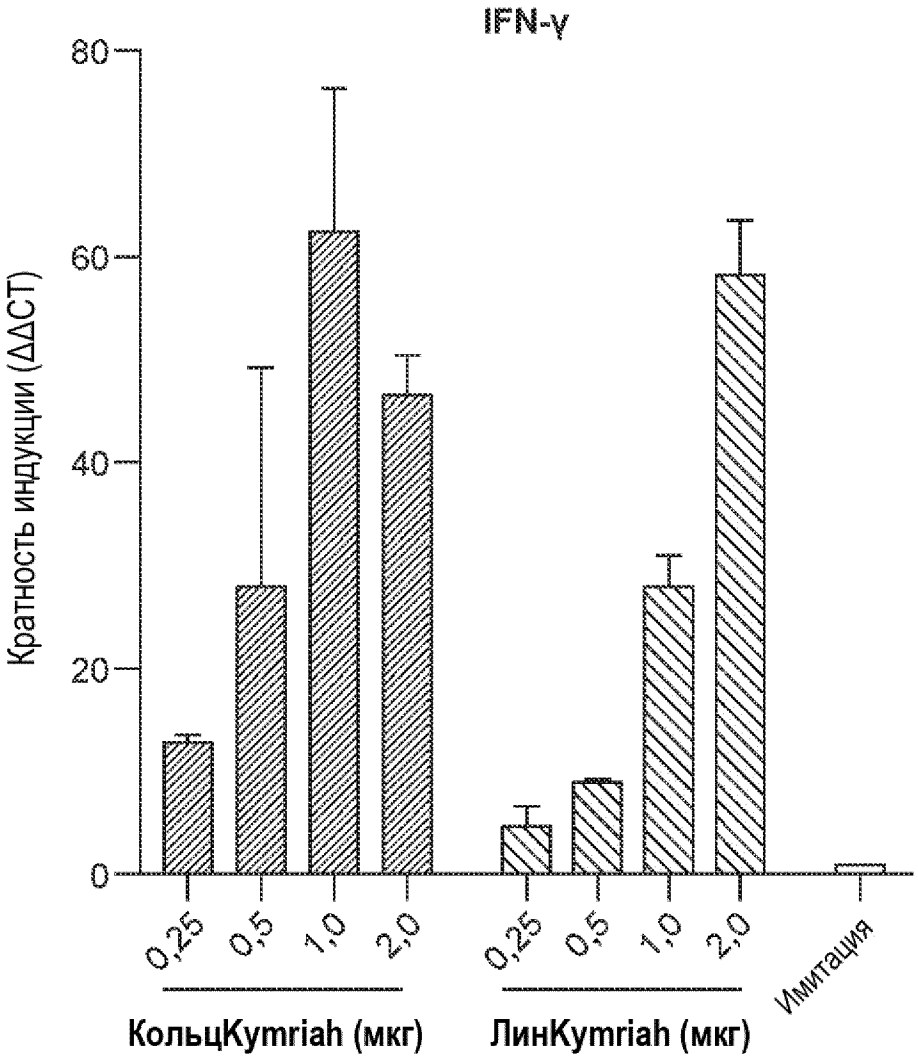
Фиг. 20E



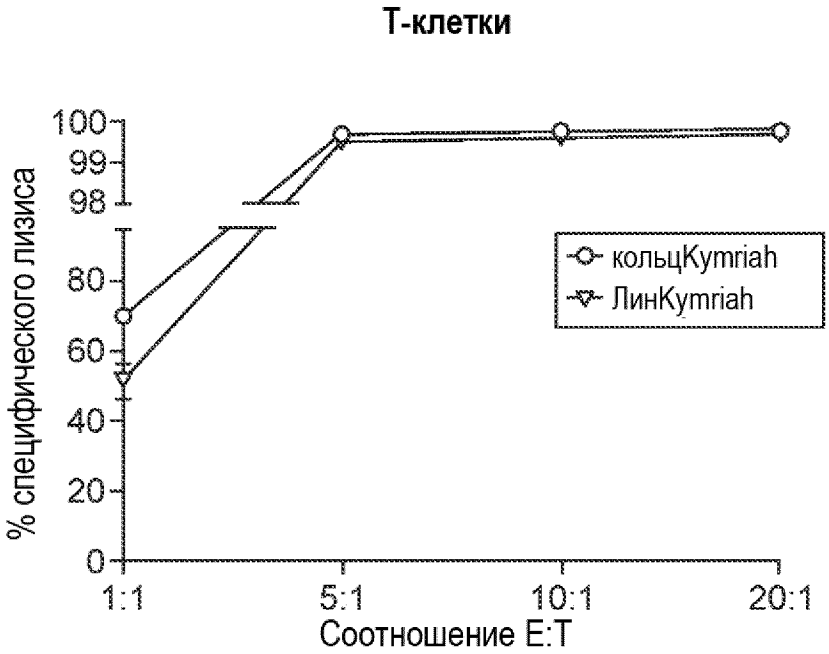
Фиг. 20F


Т-клетки
% специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
0,25
0,5
1,0
КольцKymriah (мкг)

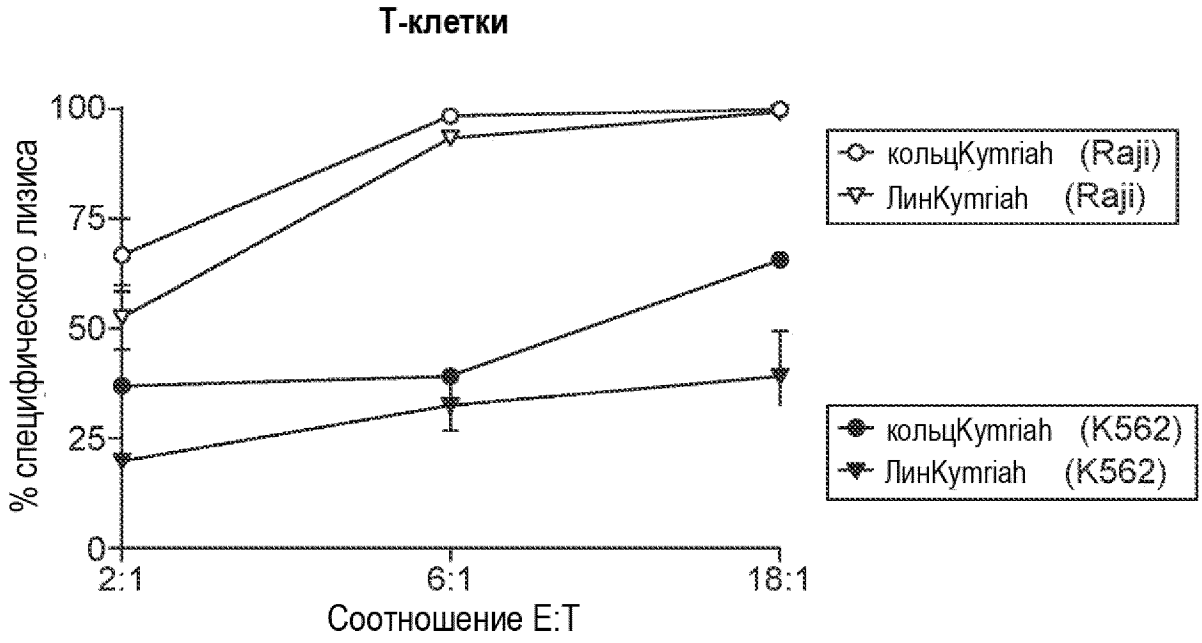
Фиг. 21A


IFN-γ
Кратность индукции (ΔΔCT)
80
60
40
20
0
0,25
0,5
1,0
2,0
0,25
0,5
1,0
2,0
Имитация
КольцКymriah (мкг)
ЛинКymriah (мкг)

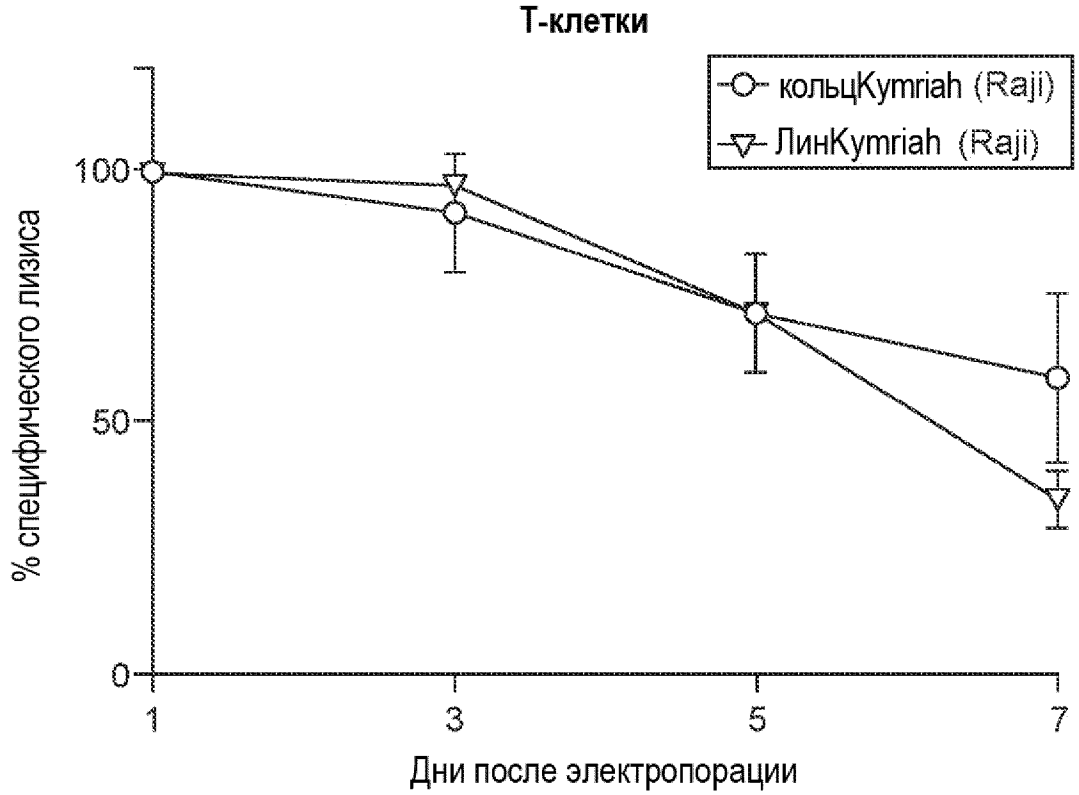
Фиг. 21B



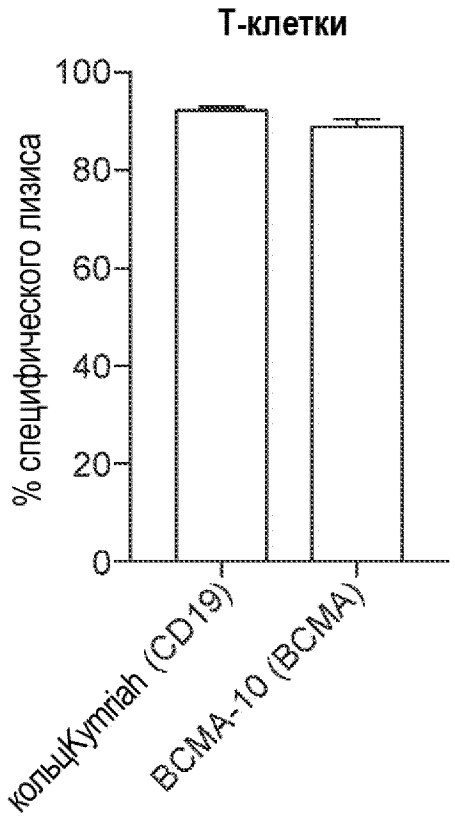
Фиг. 22A



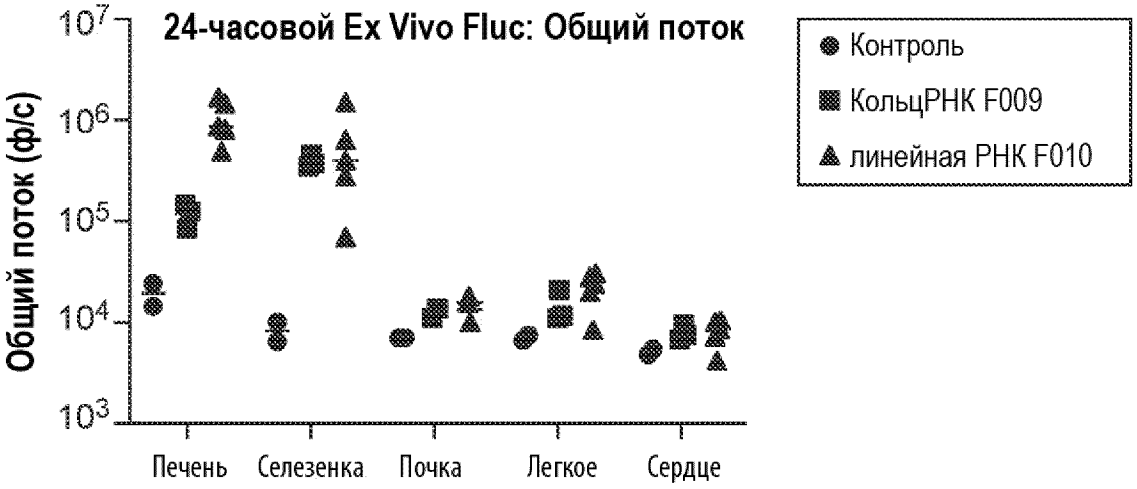
Фиг. 22B


Т-клетки
кольцKymriah (Raji)
ЛинKymriah (Raji)
% специфического лизиса
100
50
0
1
3
5
7
Дни после электропорации

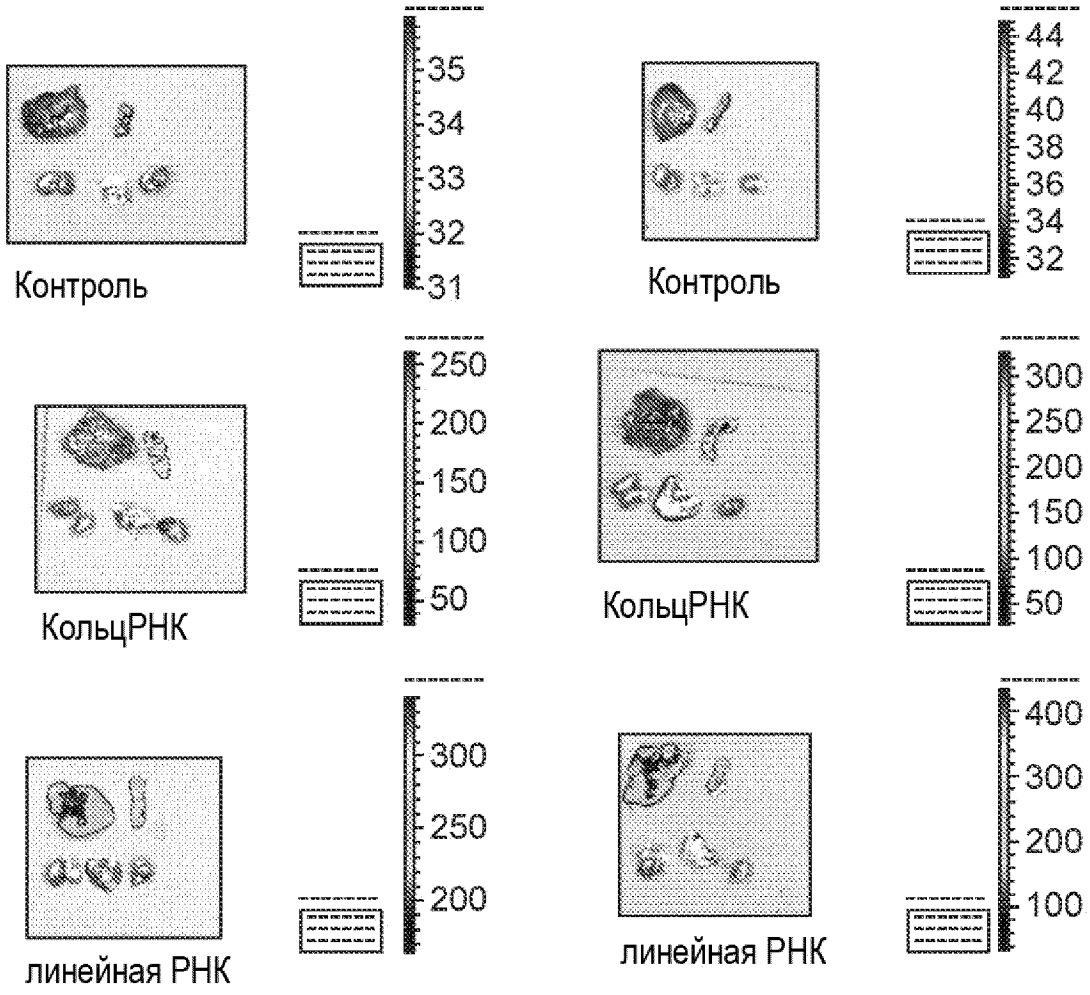
Фиг. 23


Т-клетки
% специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
кольцКуmriah (CD19)
BCMA-10 (BCMA)

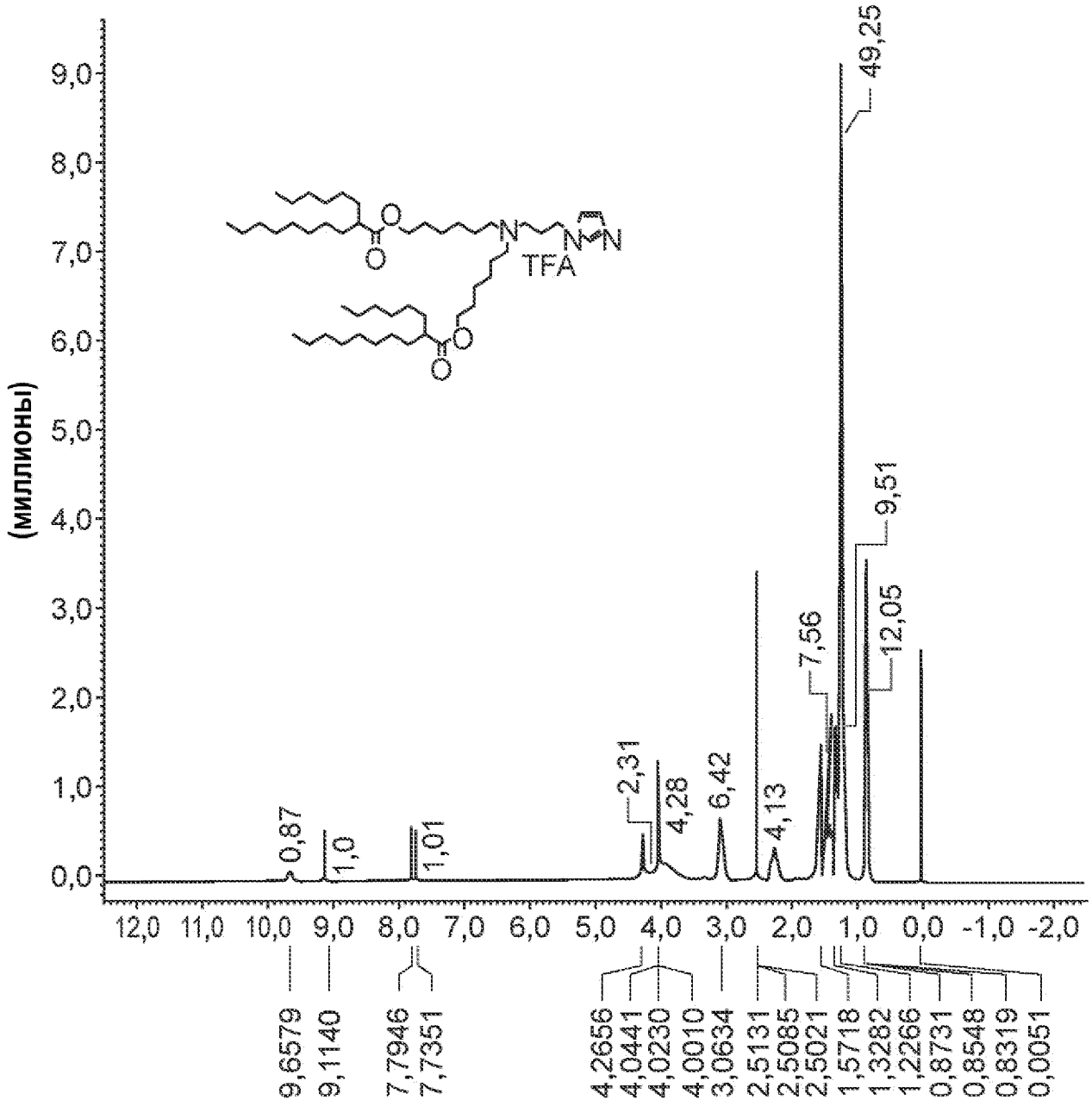
Фиг. 24


24-часовой Ex Vivo Fluc: Общий поток
Общий поток (ф/с)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
Печень
Селезенка
Почка
Легкое
Сердце
Контроль
КольцРНК F009
линейная РНК F010

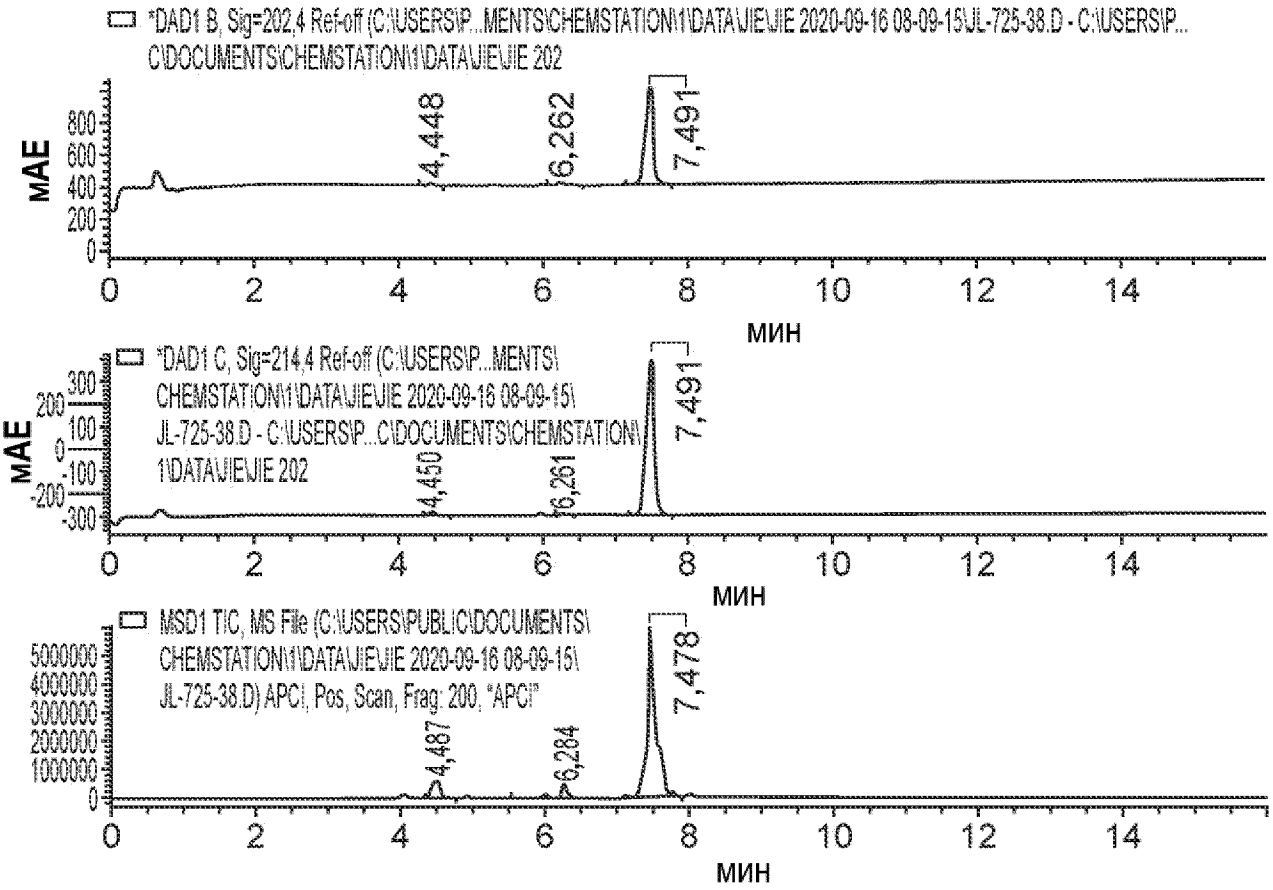
Фиг. 25


Контроль
35
34
33
32
31
Контроль
44
42
40
38
36
34
32
КольцРНК
250
200
150
100
50
КольцРНК
300
250
200
150
100
50
линейная РНК
300
250
200
линейная РНК
400
300
200
100

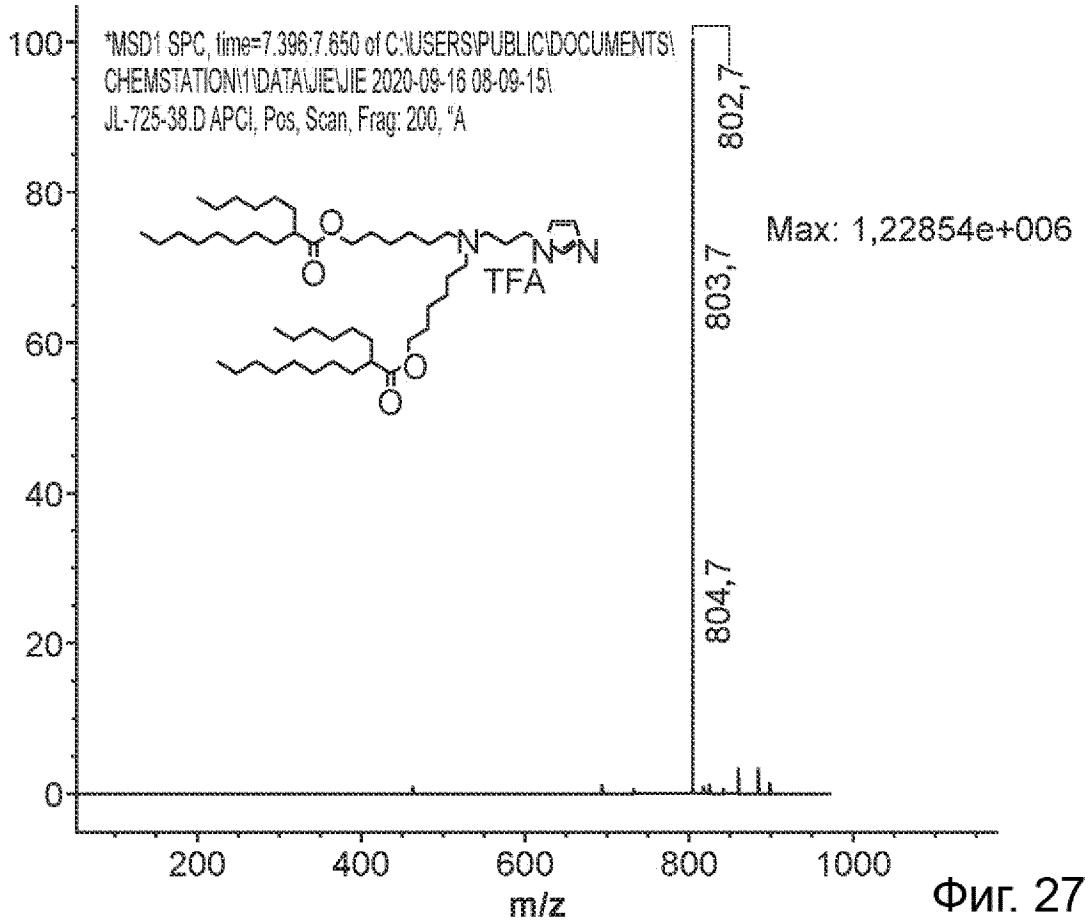
Фиг. 26


(миллионы)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
TFA
49,25
9,51
12,05
7,56
2,31
4,28
6,42
4,13
0,87
1,0
1,01
12,0 11,0 10,0 9,0 8,0 7,0 6,0 5,0 4,0 3,0 2,0 1,0 0,0 -1,0 -2,0
9,6579
9,1140
7,7946
7,7351
4,2656
4,0441
4,0230
4,0010
3,0634
2,5131
2,5085
2,5021
1,5718
1,3282
1,2266
0,8731
0,8548
0,8319
0,0051

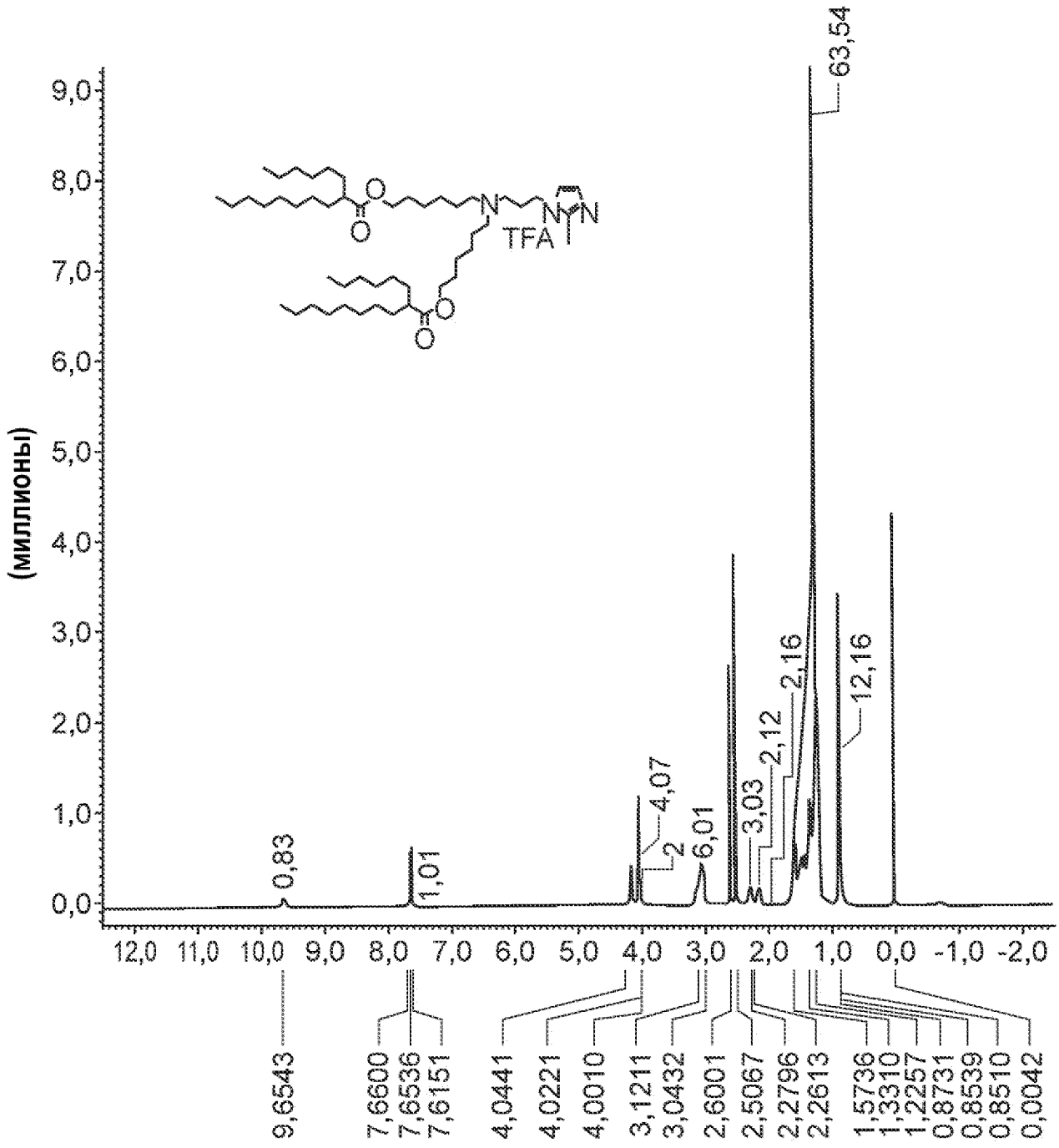
Фиг. 27A



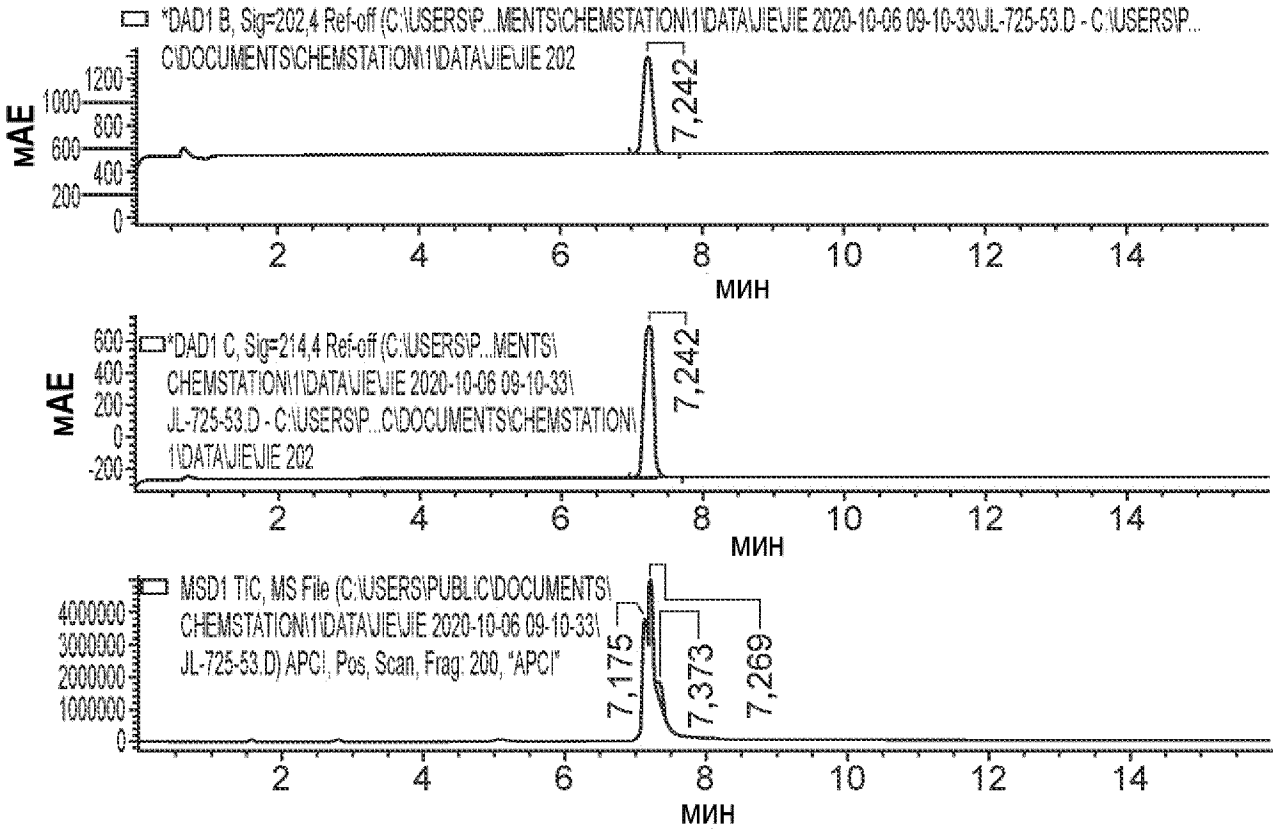
Фиг. 27B



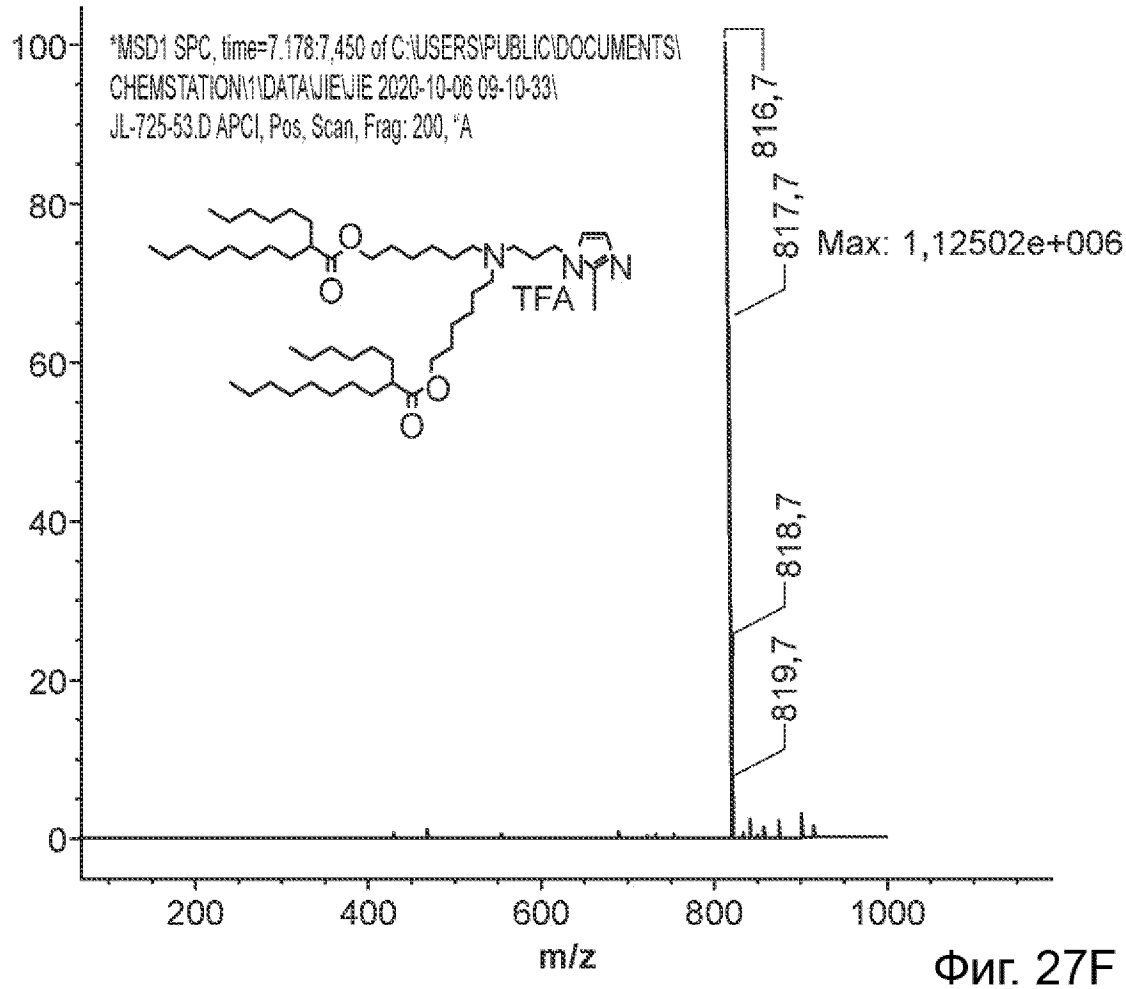
Фиг. 27C


(миллионы)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
TFA
63,54
12,16
2,16
2,12
4,07
3,03
6,01
1,01
0,83
12,0 11,0 10,0 9,0 8,0 7,0 6,0 5,0 4,0 3,0 2,0 1,0 0,0 -1,0 -2,0
9,6543
7,6600
7,6536
7,6151
4,0441
4,0221
4,0010
3,1211
3,0432
2,6001
2,5067
2,2796
2,2613
1,5736
1,3310
1,2257
0,8731
0,8539
0,8510
0,0042

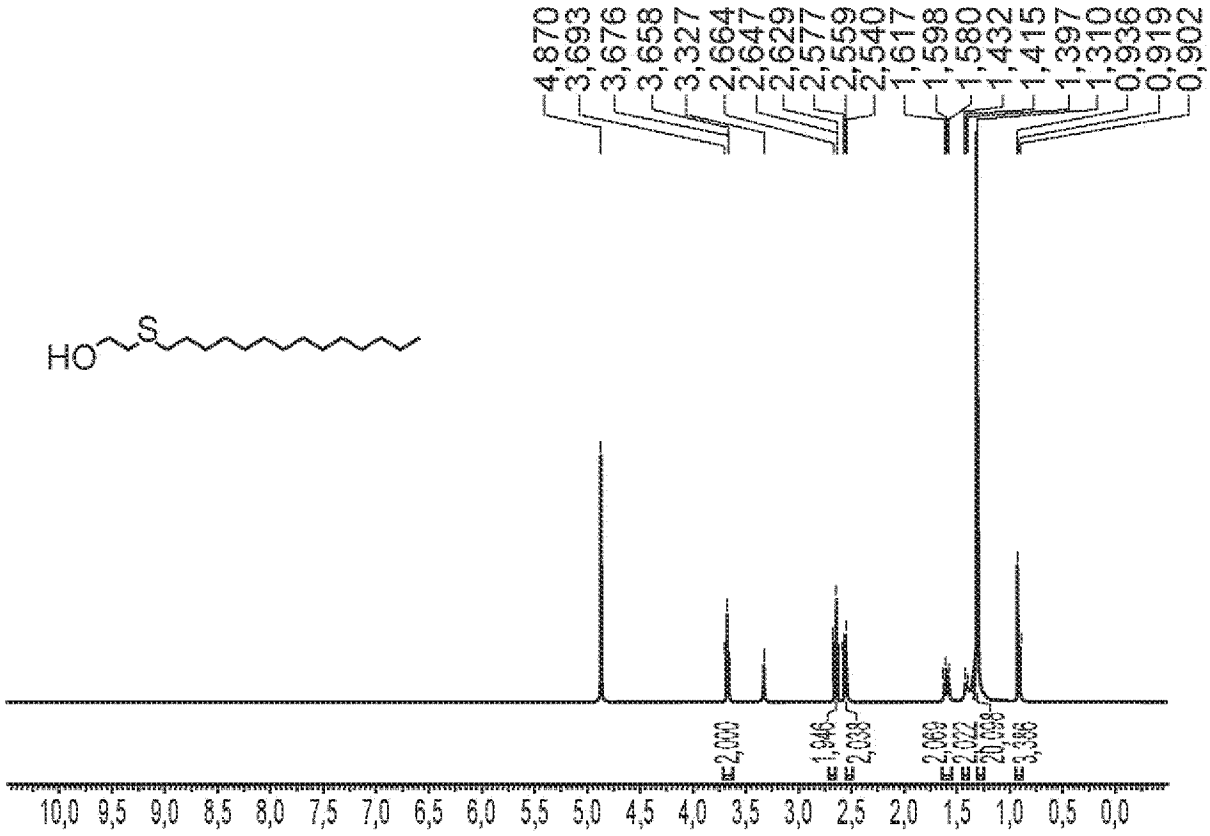
Фиг. 27D



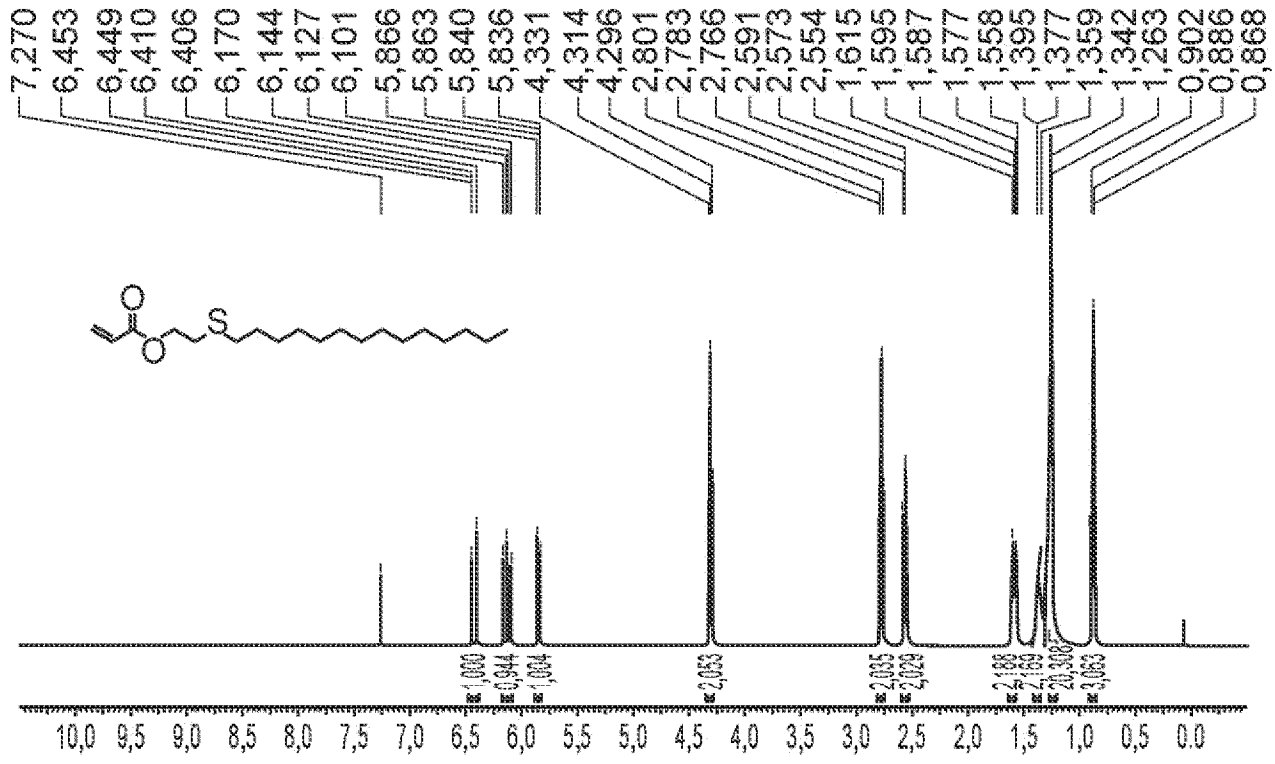
Фиг. 27E



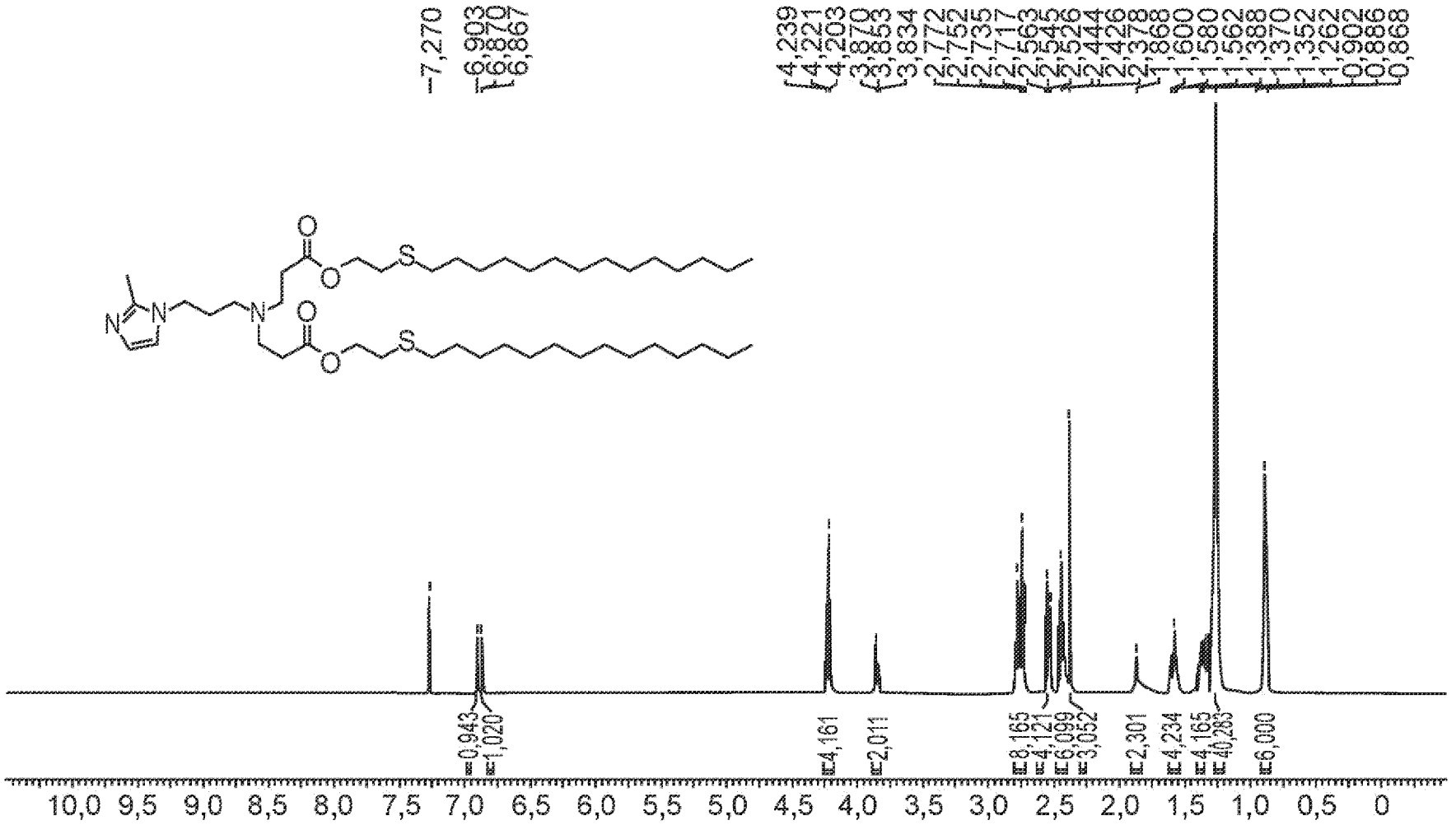
Фиг. 27F



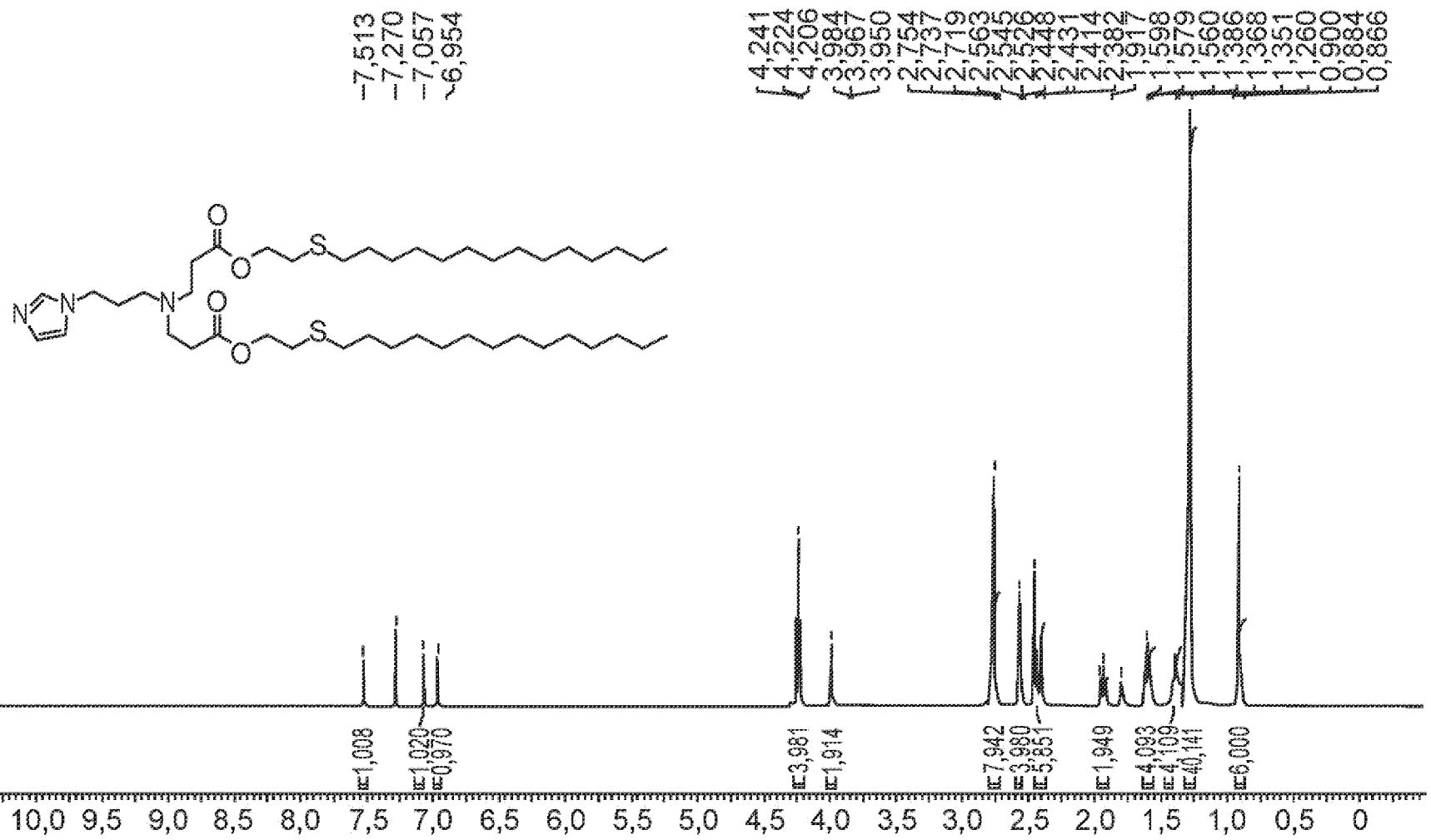
Фиг. 28A



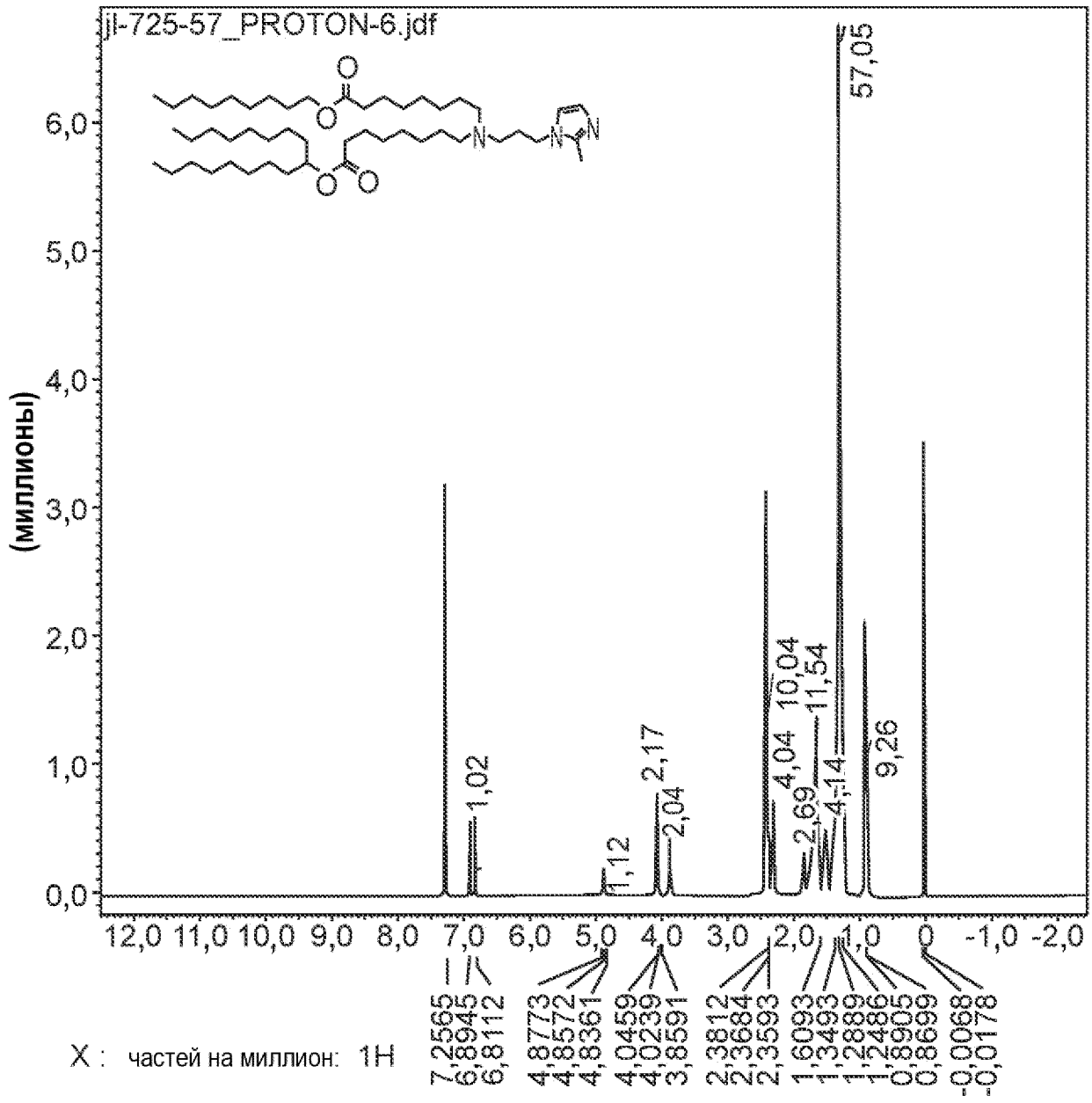
Фиг. 28B


7,270
6,903
6,870
6,867
4,239
4,221
4,203
3,870
3,853
3,834
2,772
2,752
2,735
2,717
2,563
2,545
2,526
2,444
2,426
2,378
1,868
1,600
1,580
1,562
1,388
1,370
1,352
1,262
0,902
0,886
0,868
0,943
1,020
4,161
2,011
8,165
4,121
6,099
3,052
2,301
4,234
4,165
40,283
6,000
10,0 9,5 9,0 8,5 8,0 7,5 7,0 6,5 6,0 5,5 5,0 4,5 4,0 3,5 3,0 2,5 2,0 1,5 1,0 0,5 0

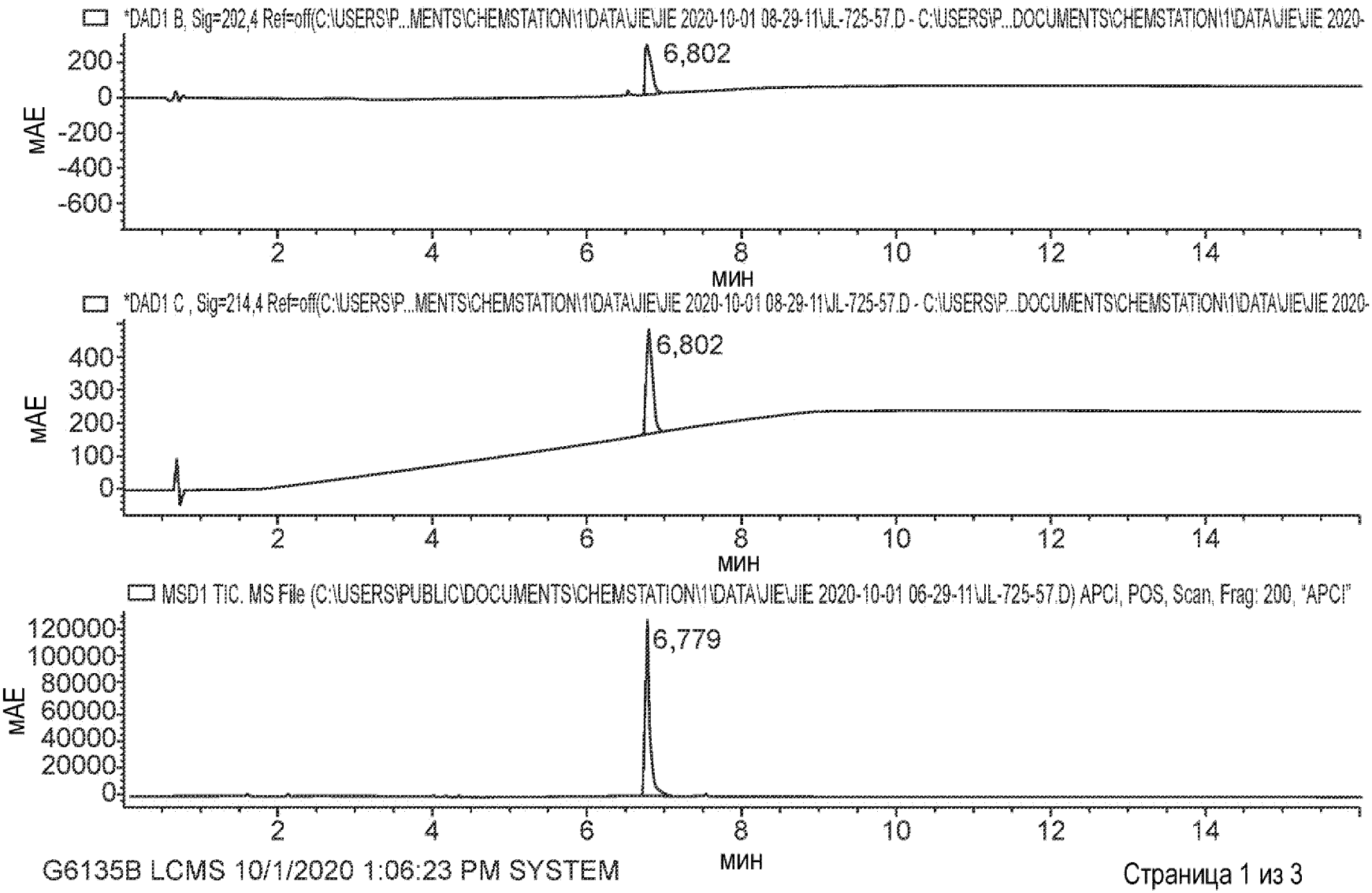
Фиг. 28C


7,513
7,270
7,057
6,954
4,241
4,224
4,206
3,984
3,967
3,950
2,754
2,737
2,719
2,563
2,545
2,526
2,508
2,431
2,414
2,382
2,317
1,598
1,579
1,560
1,386
1,368
1,351
1,260
0,900
0,884
0,866
1,008
1,020
0,970
3,981
1,914
7,942
3,980
5,851
1,949
4,093
4,169
40,141
6,000
10,0 9,5 9,0 8,5 8,0 7,5 7,0 6,5 6,0 5,5 5,0 4,5 4,0 3,5 3,0 2,5 2,0 1,5 1,0 0,5 0

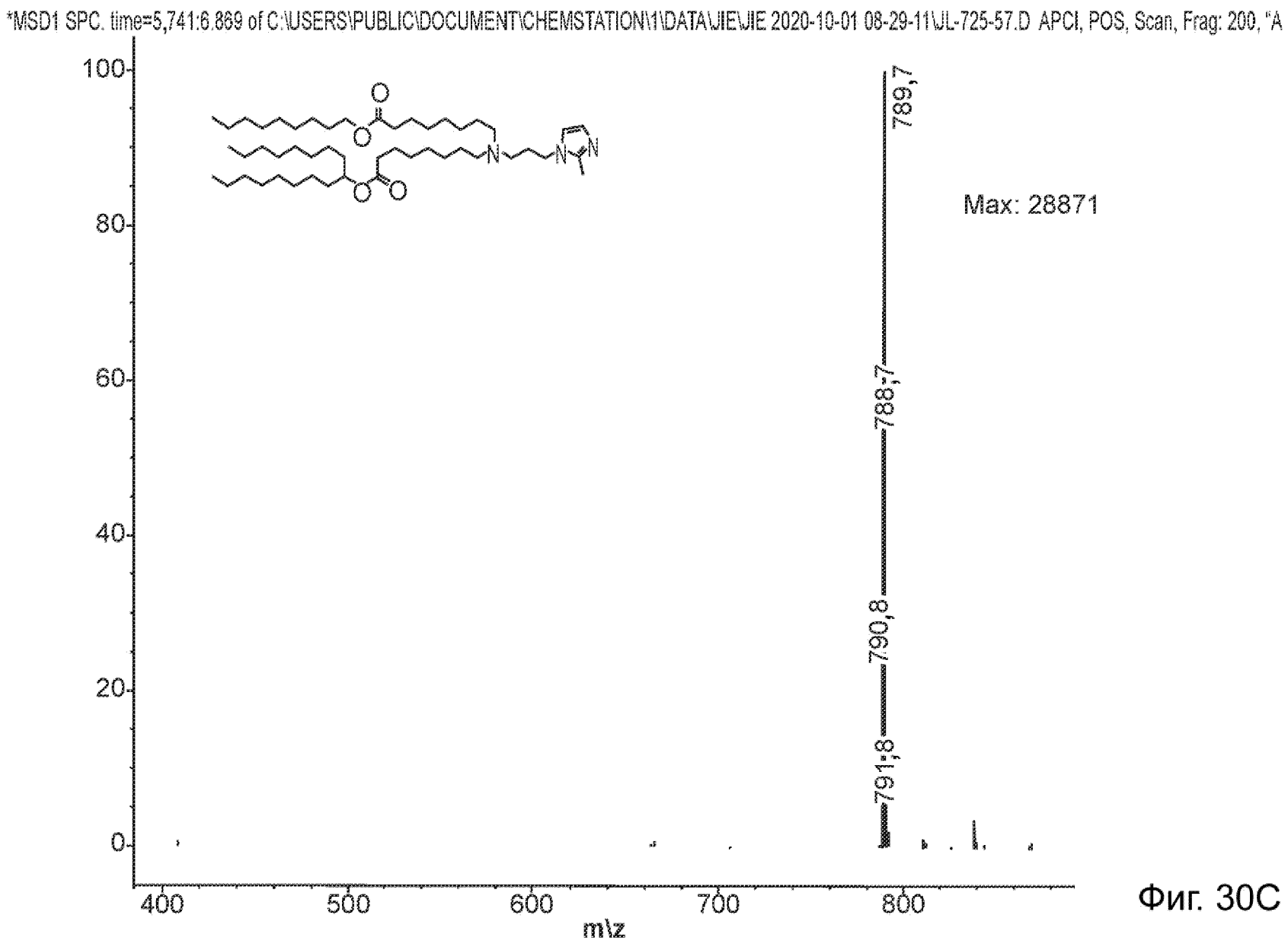
Фиг. 29


jl-725-57_PROTON-6.jdf
(миллионы)
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
57,05
1,02
1,12
2,17
2,04
4,04
10,04
11,54
2,69
4,14
9,26
12,0 11,0 10,0 9,0 8,0 7,0 6,0 5,0 4,0 3,0 2,0 1,0 0 -1,0 -2,0
X : частей на миллион: 1H
7,2565
6,8945
6,8112
4,8773
4,8572
4,8361
4,0459
4,0239
3,8591
2,3812
2,3684
2,3593
1,6093
1,3493
1,2889
1,2486
0,8905
0,8699
-0,0068
-0,0178

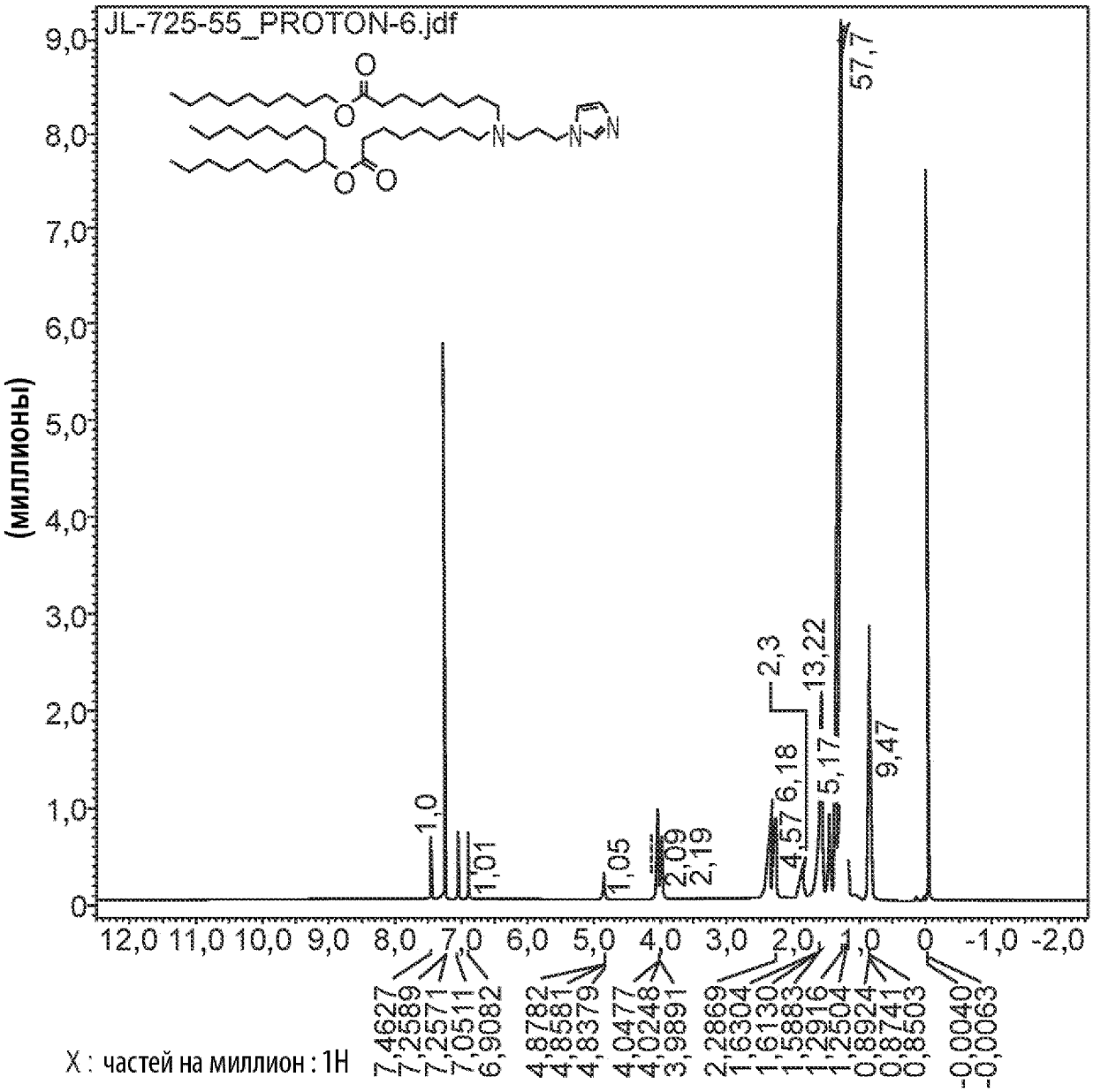
Фиг. 30A


*DAD1 B, Sig=202,4 Ref=off(C:\USERS\P...MENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-57.D - C:\USERS\P...DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-
6,802
mAE
200
0
-200
-400
-600
2
4
6
8
10
12
14
мин
*DAD1 C , Sig=214,4 Ref=off(C:\USERS\P...MENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-57.D - C:\USERS\P...DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-
6,802
mAE
400
300
200
100
0
2
4
6
8
10
12
14
мин
MSD1 TIC. MS File (C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 06-29-11\JL-725-57.D) APCI, POS, Scan, Frag: 200, "APCI"
6,779
mAE
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
2
4
6
8
10
12
14
мин
G6135B LCMS 10/1/2020 1:06:23 PM SYSTEM
Страница 1 из 3

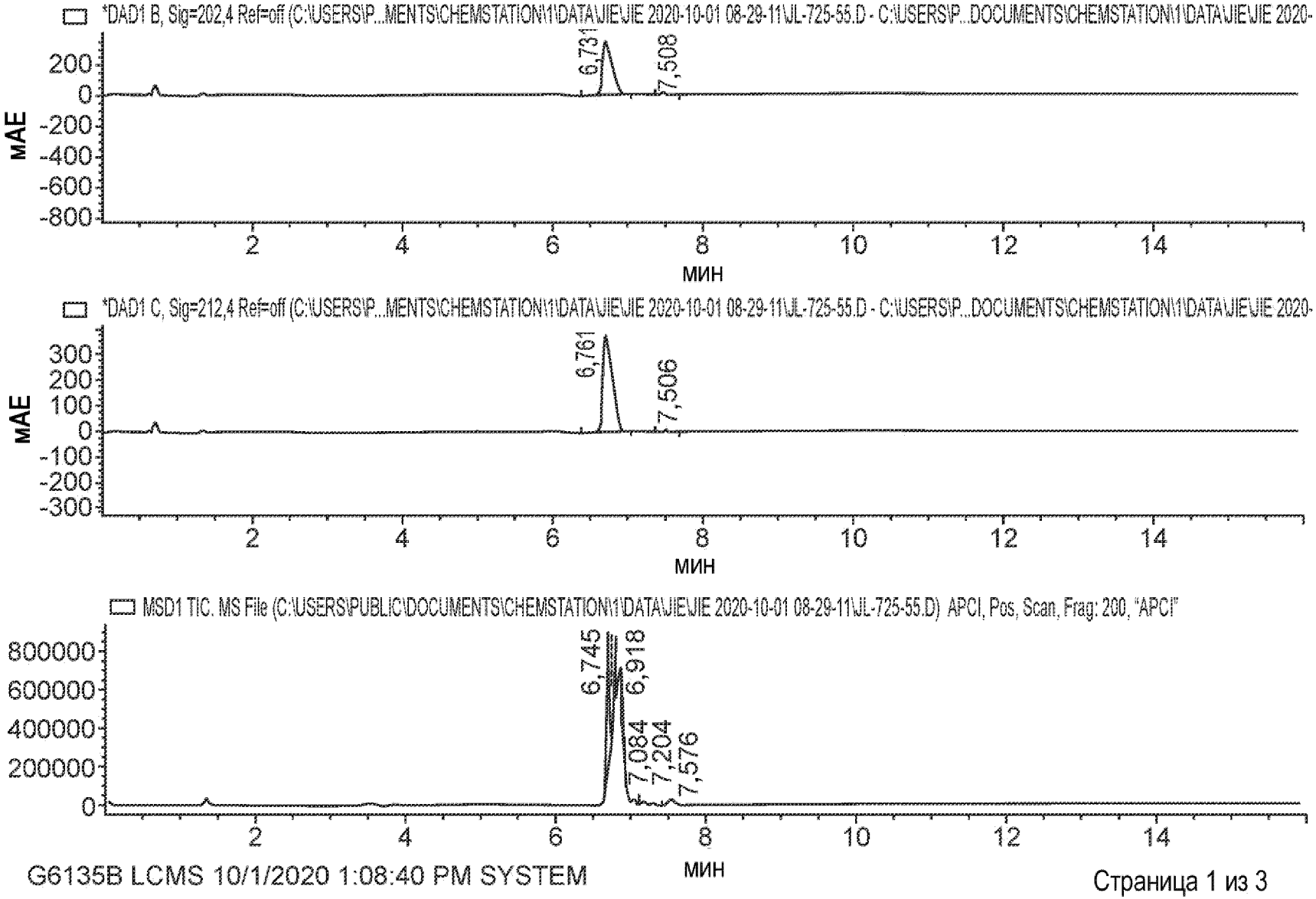
Фиг. 30B


*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
Max: 28871
789,7
788,7
790,8
791,8
100
80
60
40
20
0
400
500
600
700
800
m\z

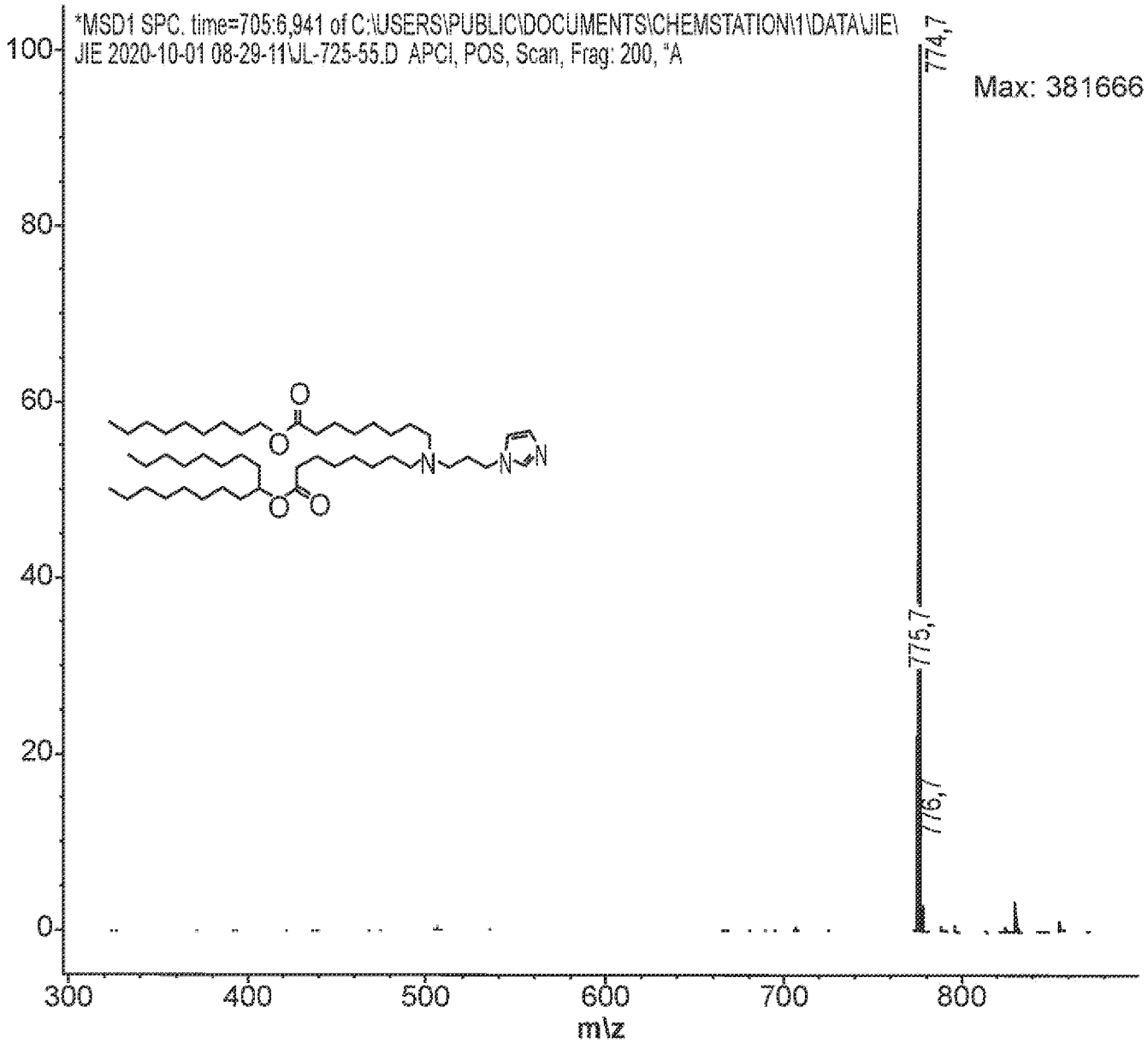
Фиг. 30C


JL-725-55_PROTON-6.jdf
(миллионы)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0
12,0 11,0 10,0 9,0 8,0 7,0 6,0 5,0 4,0 3,0 2,0 1,0 0 -1,0 -2,0
1,0
1,01
1,05
2,09
2,19
4,57
6,18
2,3
13,22
5,17
57,7
9,47
7,46277
7,25891
7,25711
7,05111
6,90821
4,87821
4,85811
4,83791
4,04771
4,02481
3,98911
2,28691
1,63041
1,61301
1,58831
1,29161
1,25041
0,89241
0,87411
0,85031
-0,00401
-0,00631
X : частей на миллион : 1H

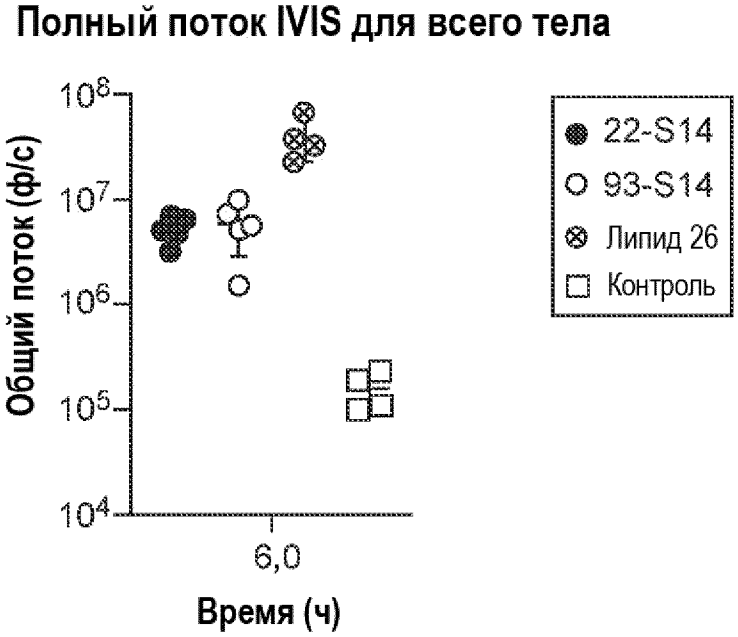
Фиг. 31A


*DAD1 B, Sig=202,4 Ref=off (C:\USERS\P...MENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-55.D - C:\USERS\P...DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-
6,731
7,508
мАЕ
200
0
-200
-400
-600
-800
2
4
6
8
10
12
14
мин
*DAD1 C, Sig=212,4 Ref=off (C:\USERS\P...MENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-55.D - C:\USERS\P...DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-
6,761
7,506
мАЕ
300
200
100
0
-100
-200
-300
2
4
6
8
10
12
14
мин
MSD1 TIC. MS File (C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-55.D) APCI, Pos, Scan, Frag: 200, "APCI"
6,745
6,918
7,084
7,204
7,576
800000
600000
400000
200000
0
2
4
6
8
10
12
14
мин
G6135B LCMS 10/1/2020 1:08:40 PM SYSTEM
Страница 1 из 3

Фиг. 31B


*MSD1 SPC. time=705:6,941 of C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIE\
JIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-55.D APCI, POS, Scan, Frag: 200, "A
Max: 381666
774,7
775,7
776,7
100
80
60
40
20
0
300
400
500
600
700
800
m\z

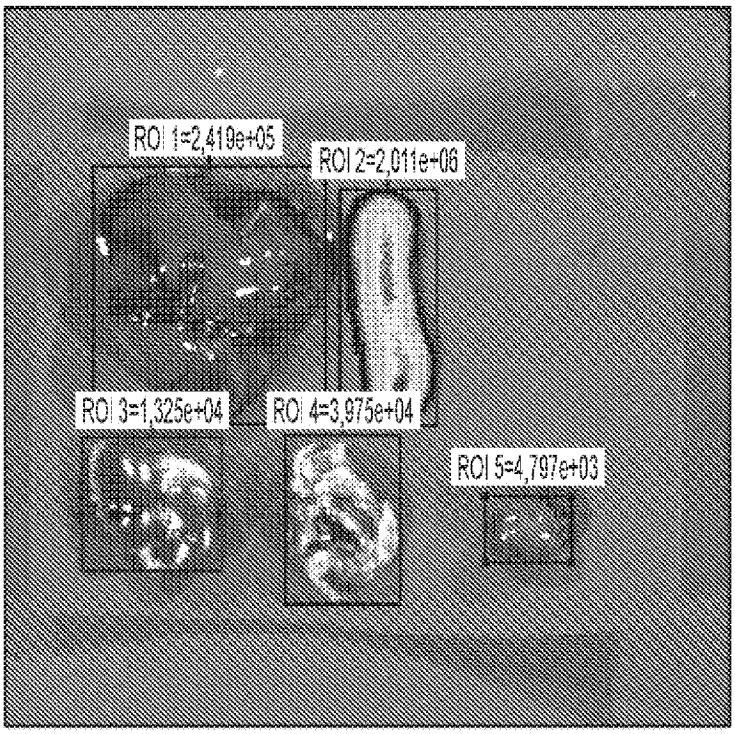
Фиг. 31C



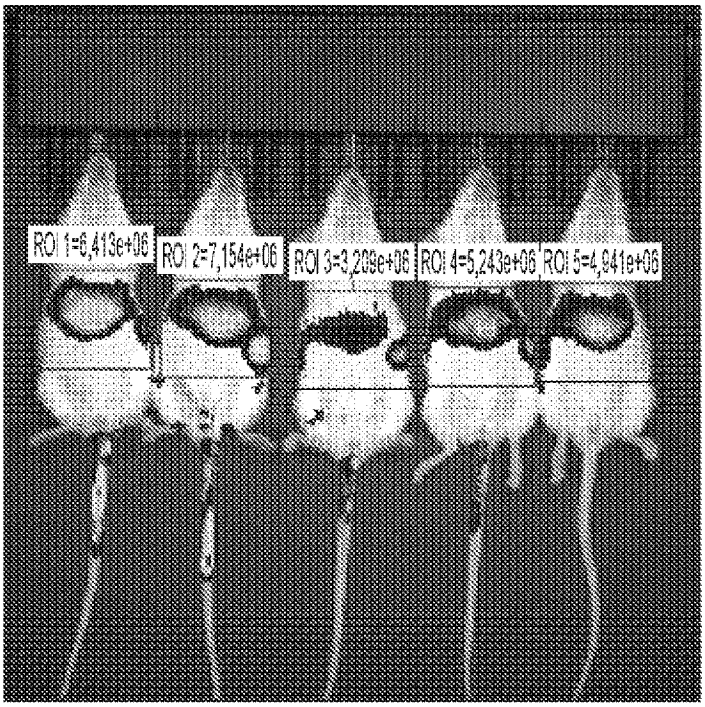
Фиг. 32A



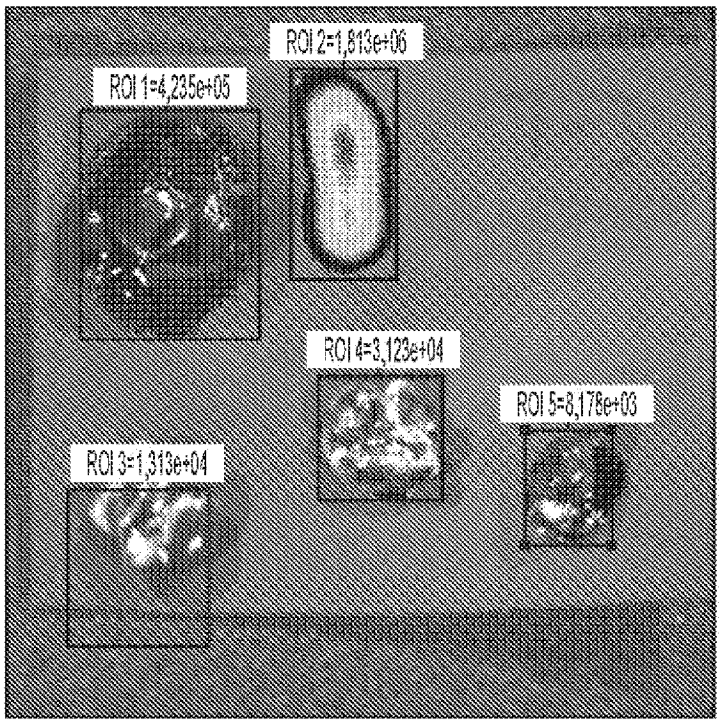
Фиг. 32B



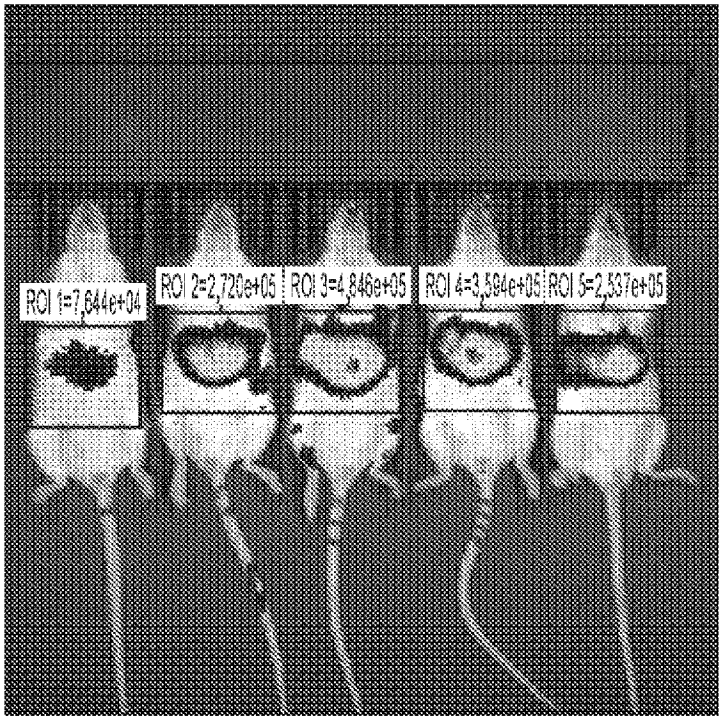
Фиг. 33A



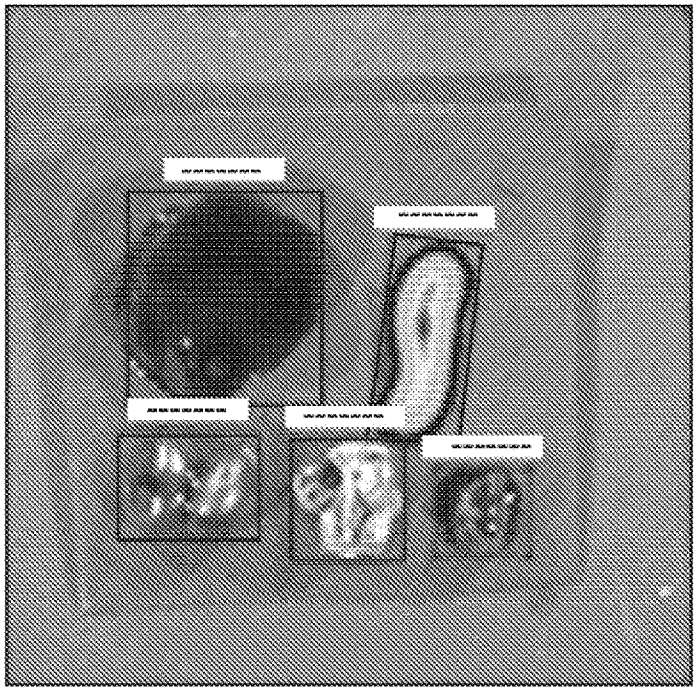
Фиг. 33B



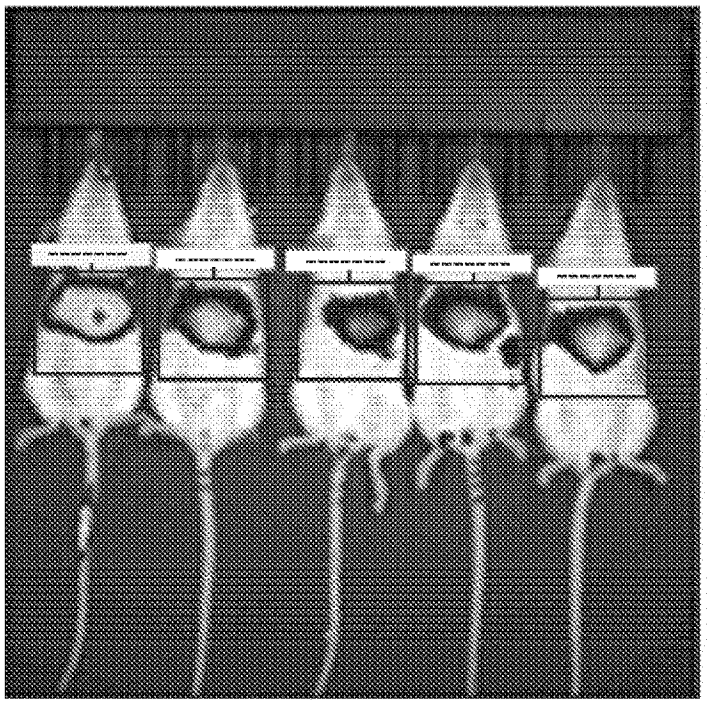
Фиг. 34A



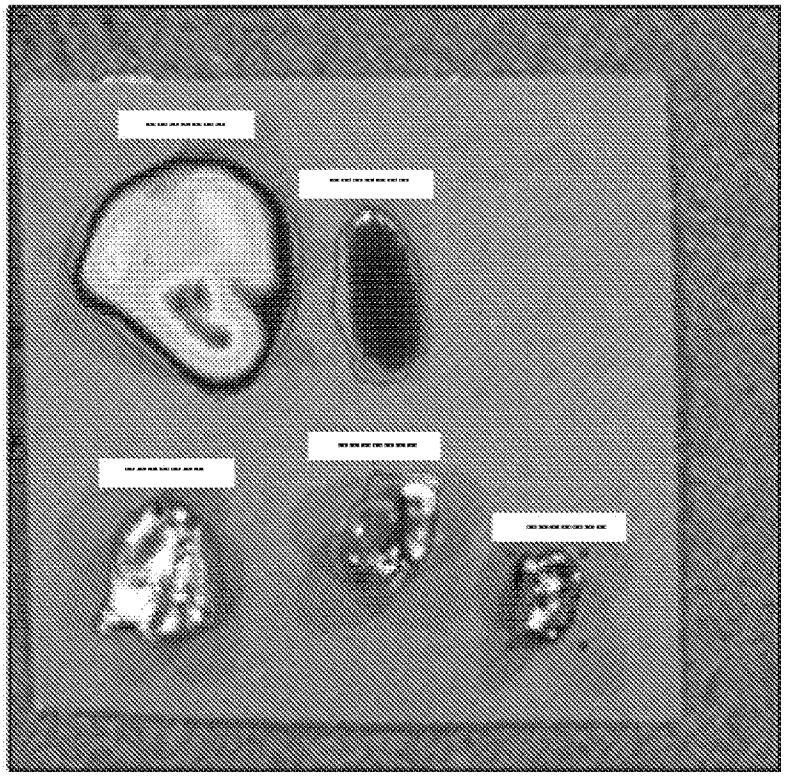
Фиг. 34B



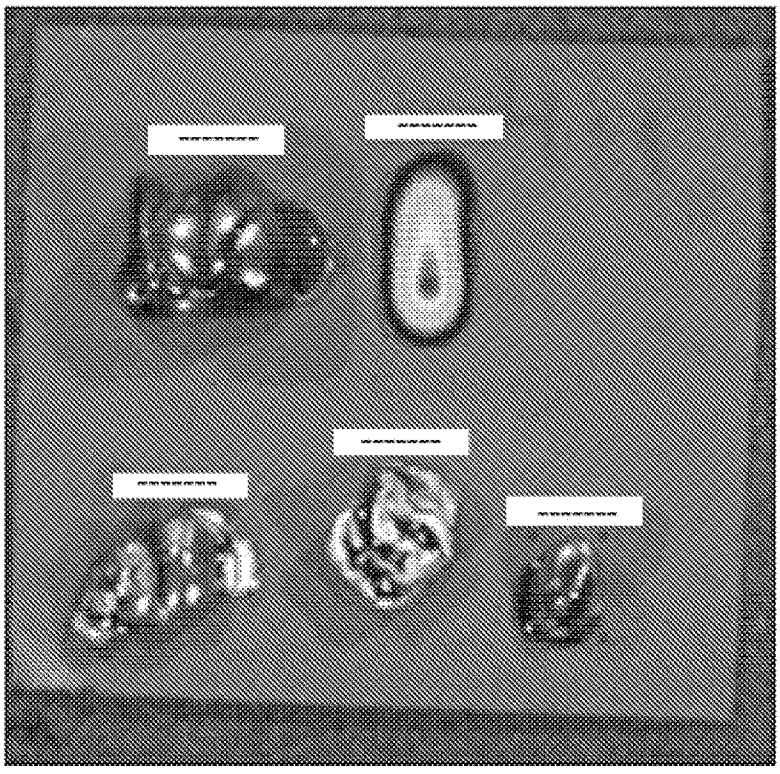
Фиг. 35A



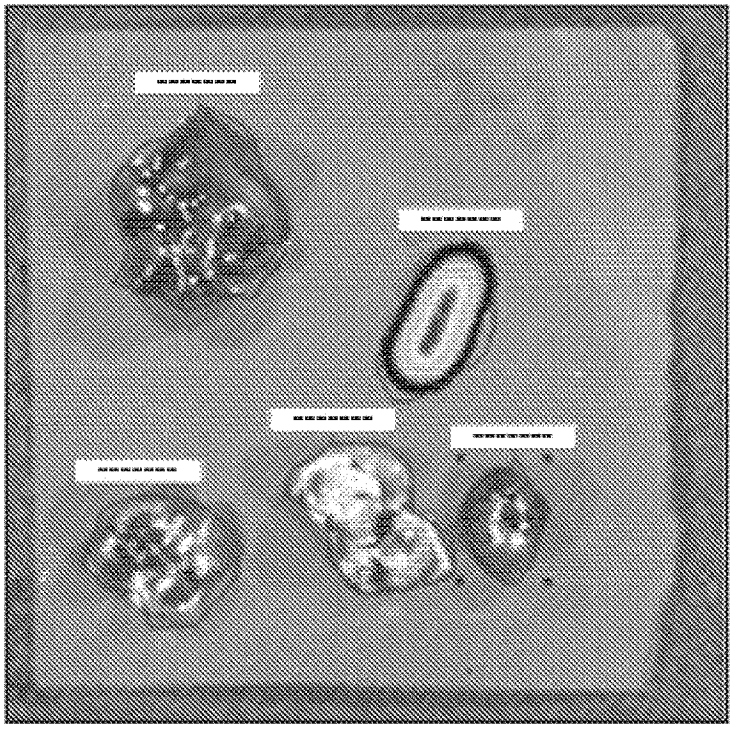
Фиг. 35B



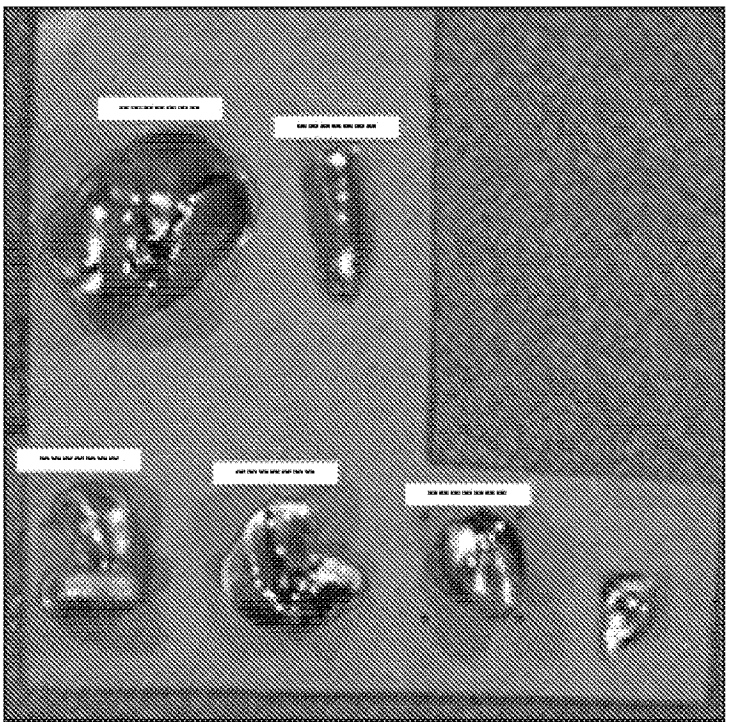
Фиг. 36A



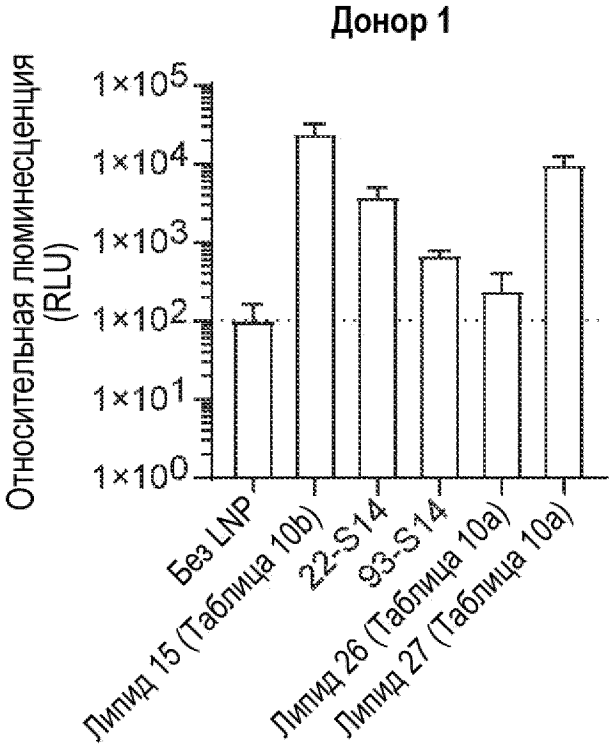
Фиг. 36B



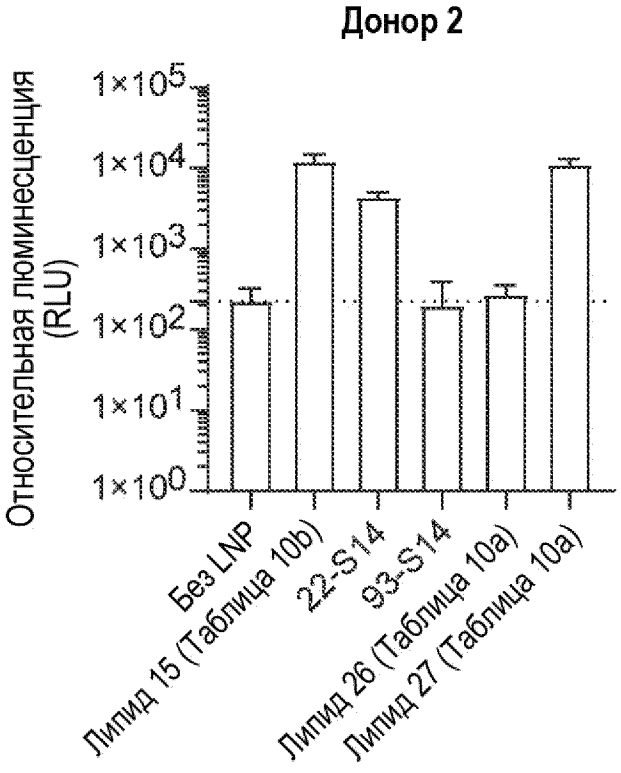
Фиг. 36C



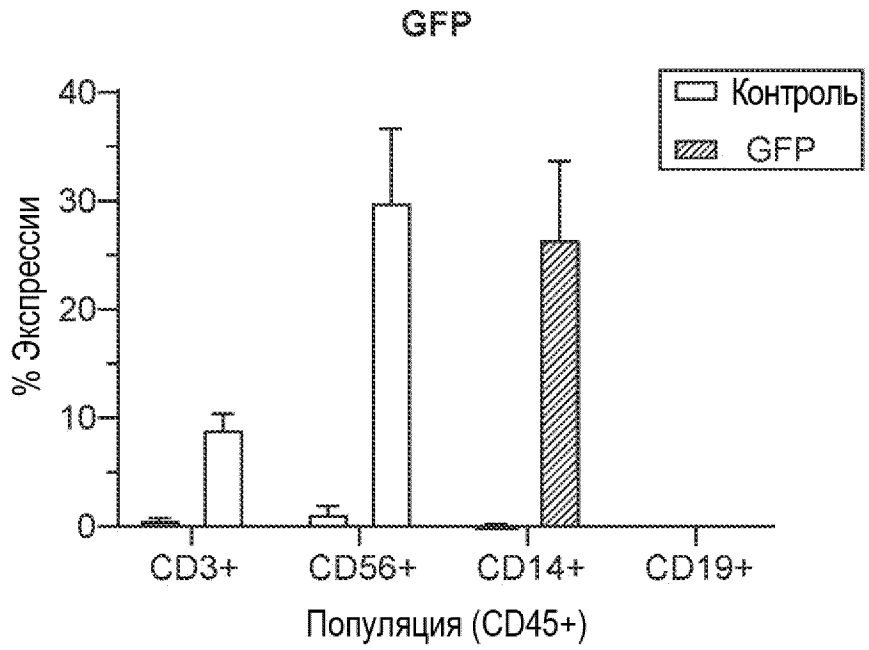
Фиг. 36D



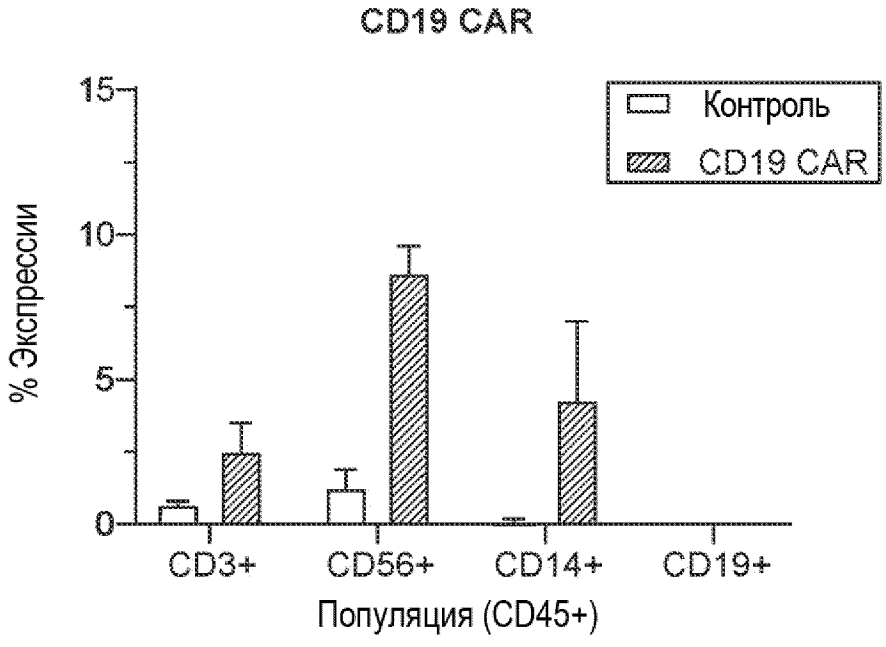
Фиг. 37A



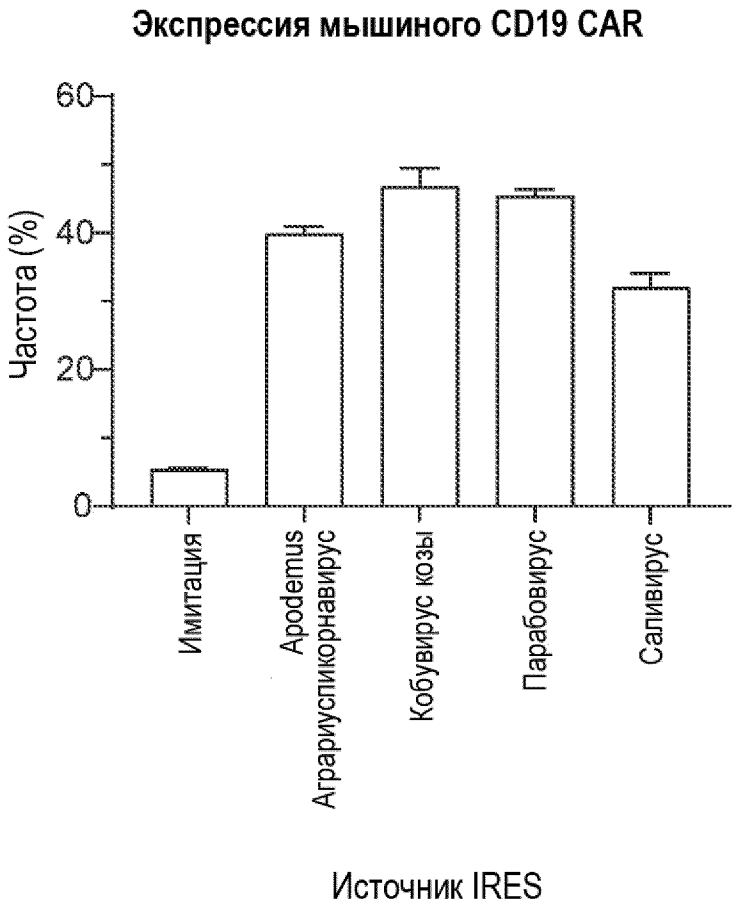
Фиг. 37B



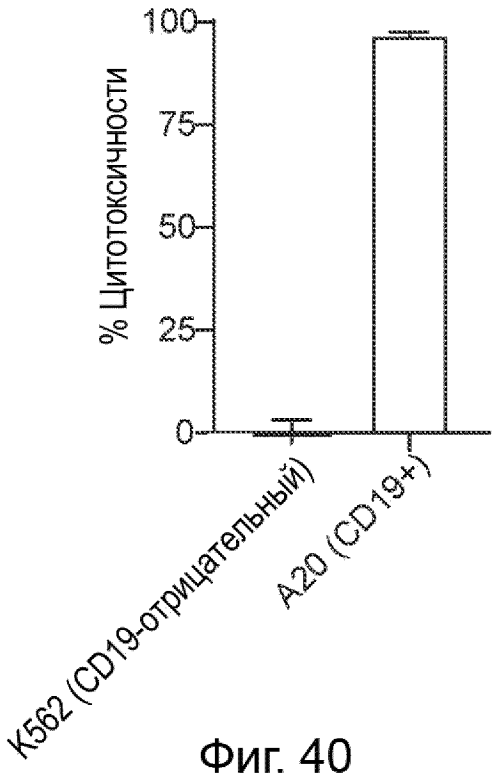
Фиг. 38A



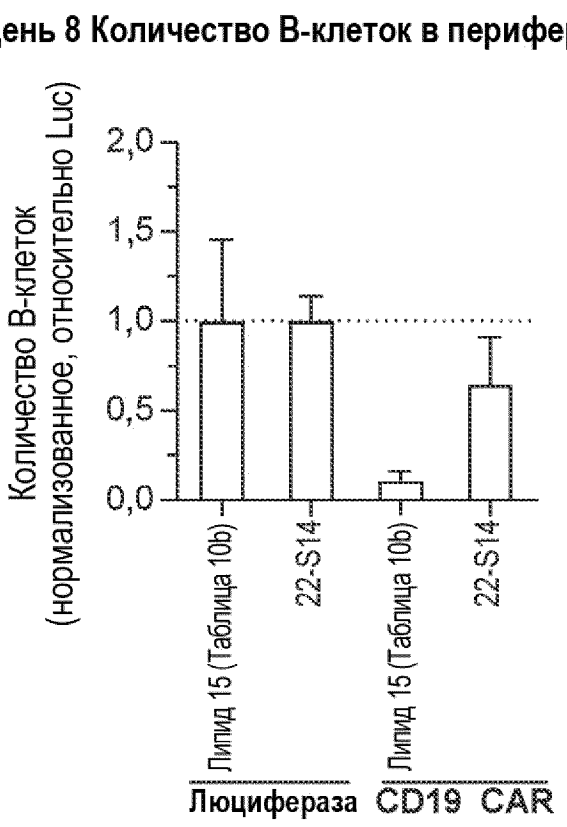
Фиг. 38B


Экспрессия мышиного CD19 CAR
Частота (%)
60
40
20
0
Имитация
Apodemus Аграриусспикорнавирус
Кобувирус козы
Парабовирус
Саливирус
Источник IRES

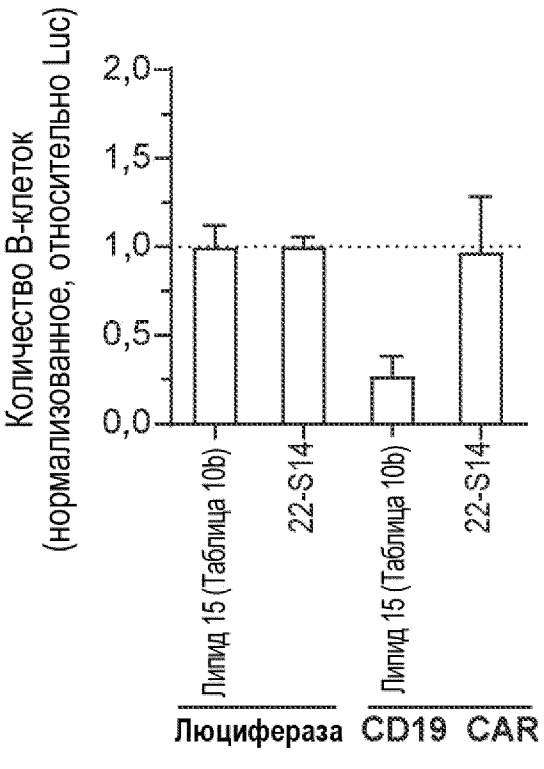
Фиг. 39


% Цитотоксичности
100
75
50
25
0
K562 (CD19-отрицательный)
A20 (CD19+)

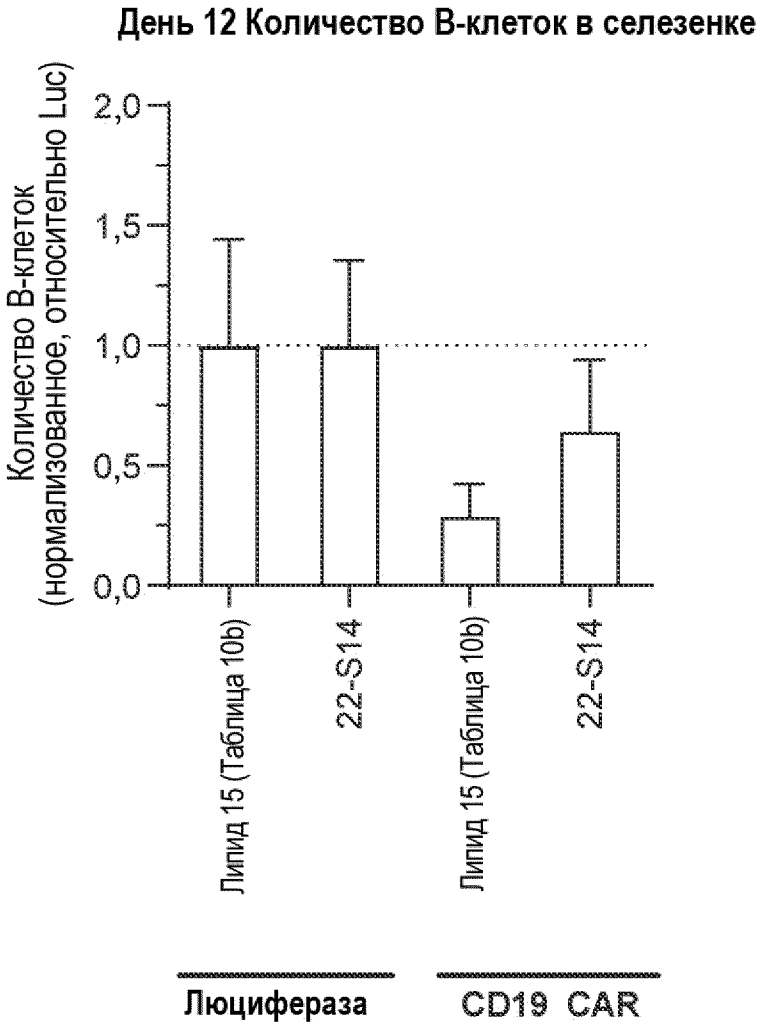
Фиг. 40



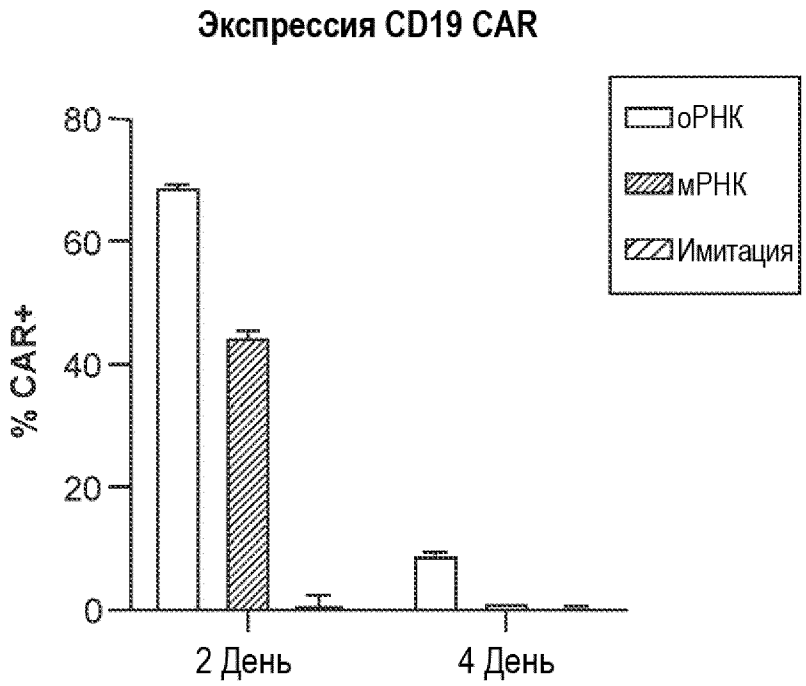
Фиг. 41A



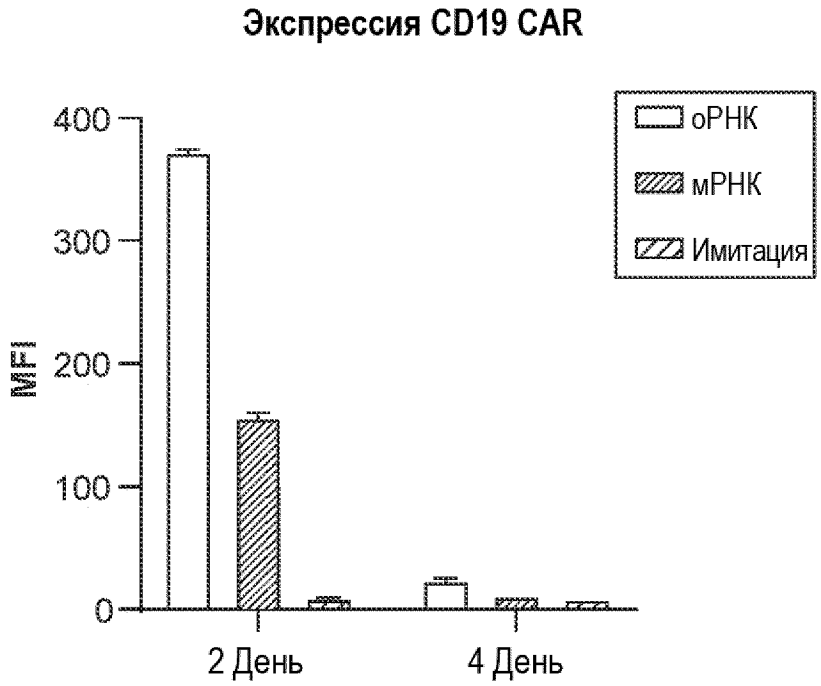
Фиг. 41B


День 12 Количество В-клеток в селезенке
Количество В-клеток
(нормализованное, относительно Luc)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Липид 15 (Таблица 10b)
22-S14
Липид 15 (Таблица 10b)
22-S14
Люцифераза
CD19 CAR

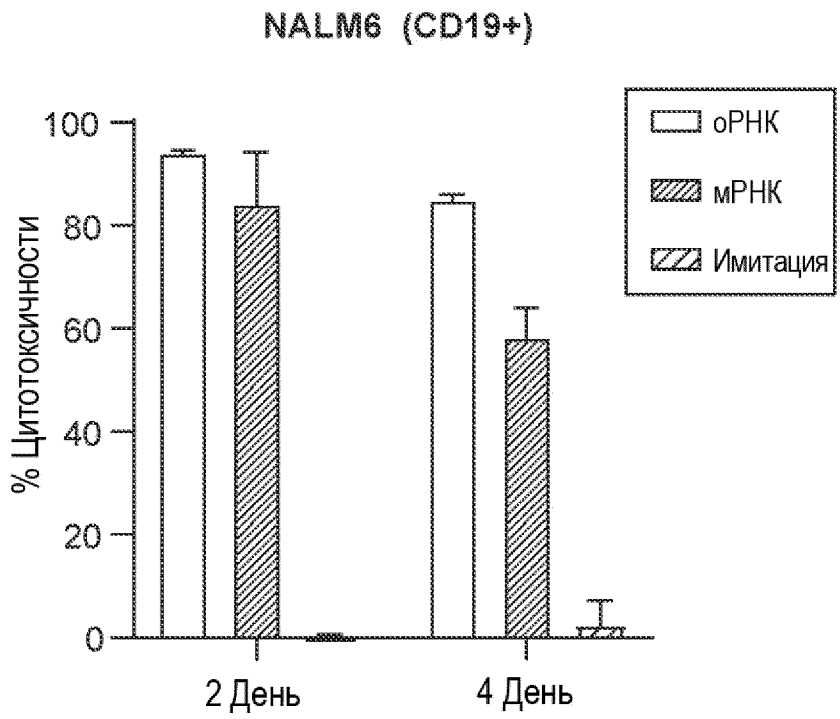
Фиг. 41C



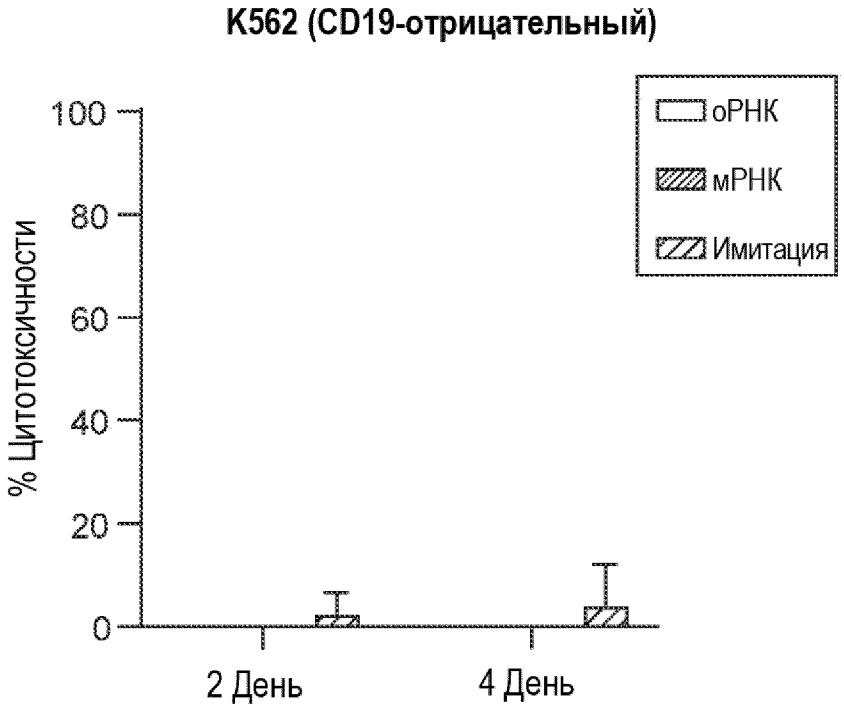
Фиг. 42A



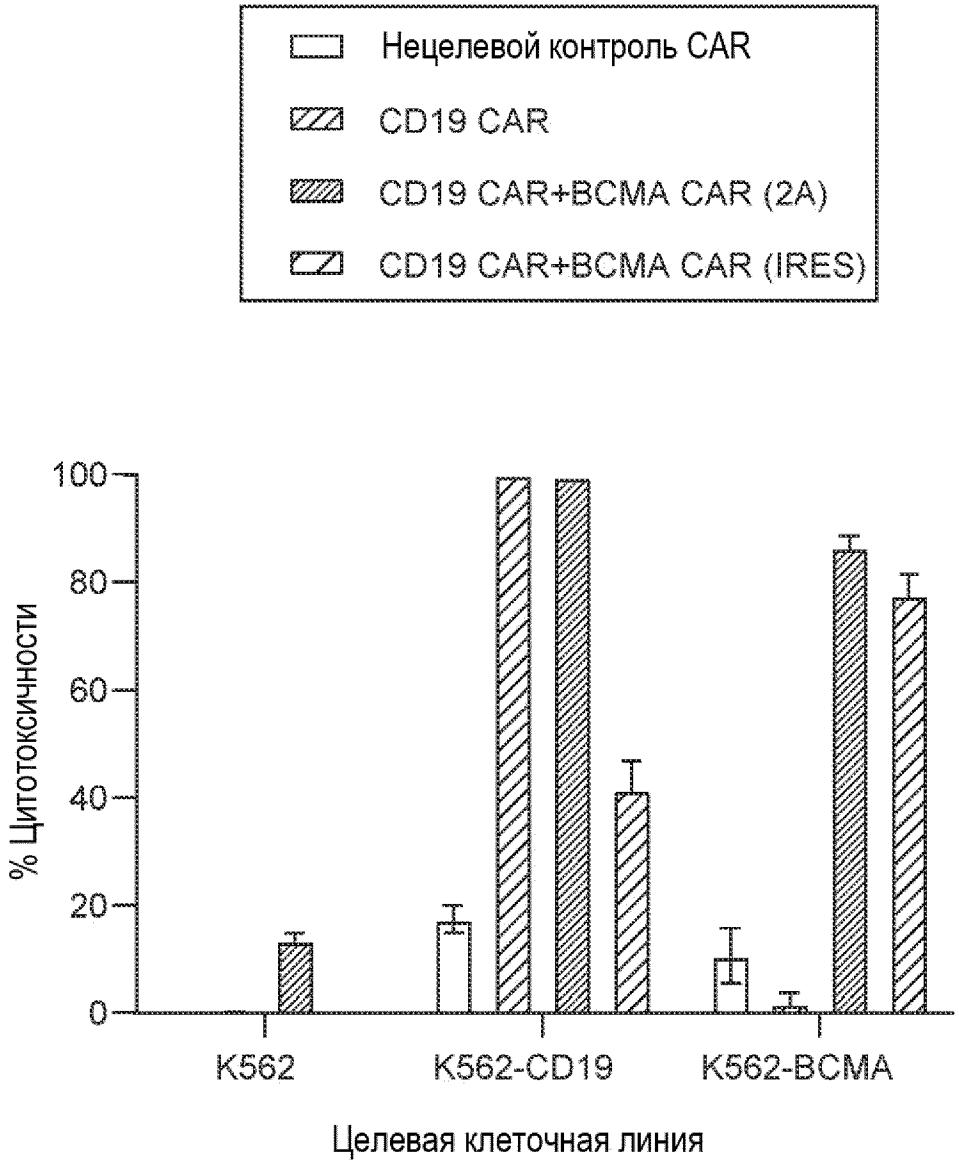
Фиг. 42B



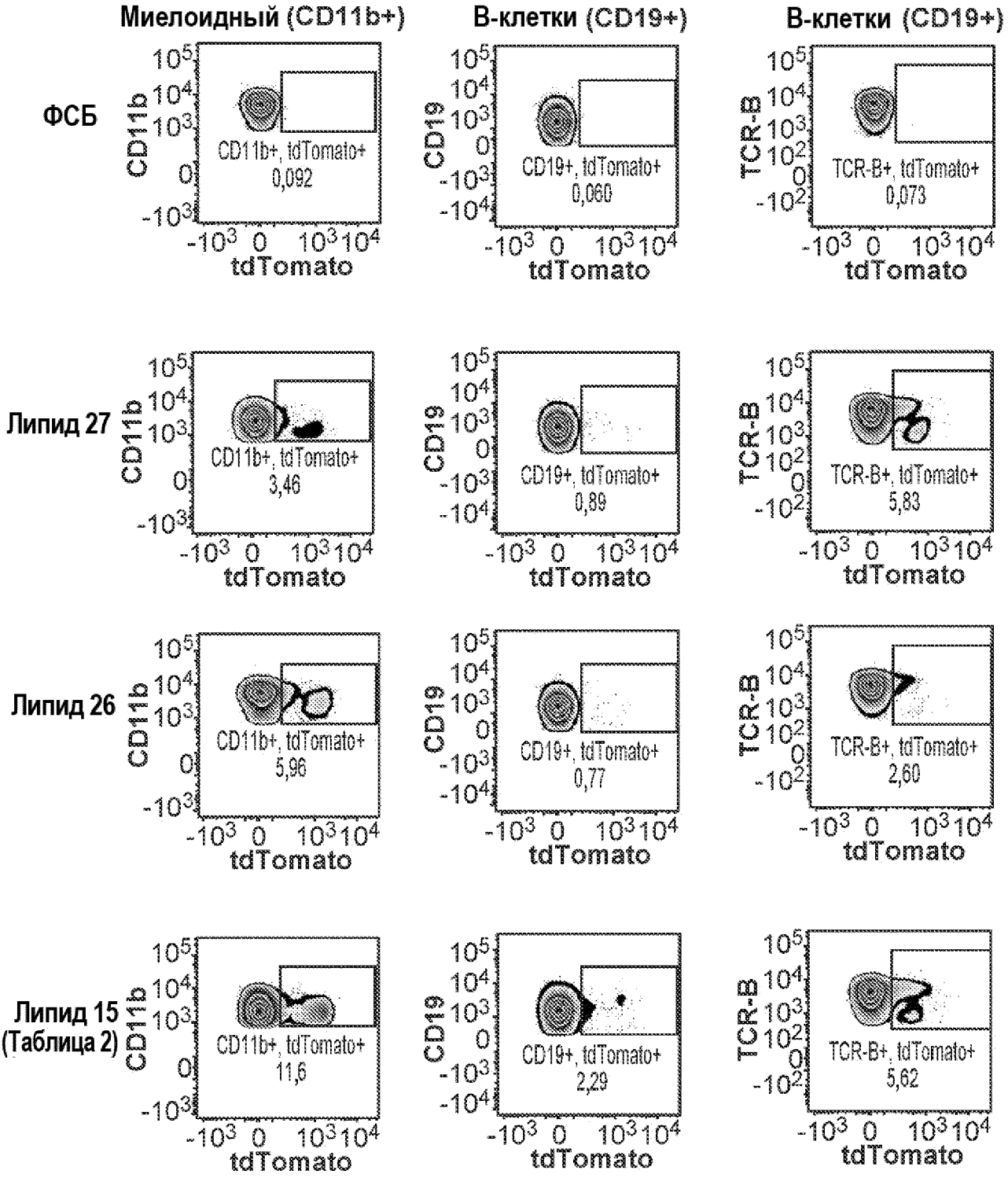
Фиг. 43A



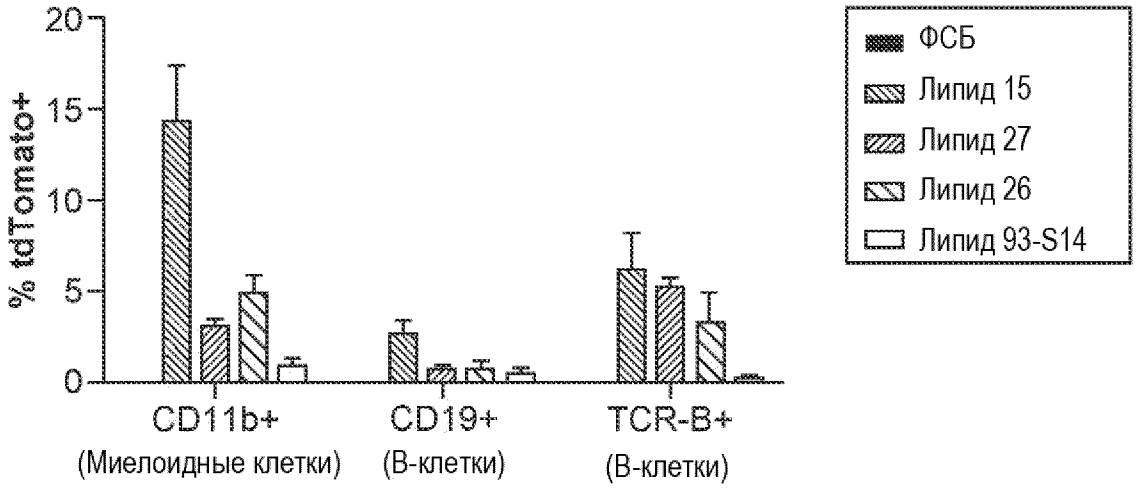
Фиг. 43B


Нецелевой контроль CAR
CD19 CAR
CD19 CAR+BCMA CAR (2A)
CD19 CAR+BCMA CAR (IRES)
% Цитотоксичности
100
80
60
40
20
0
K562
K562-CD19
K562-BCMA
Целевая клеточная линия

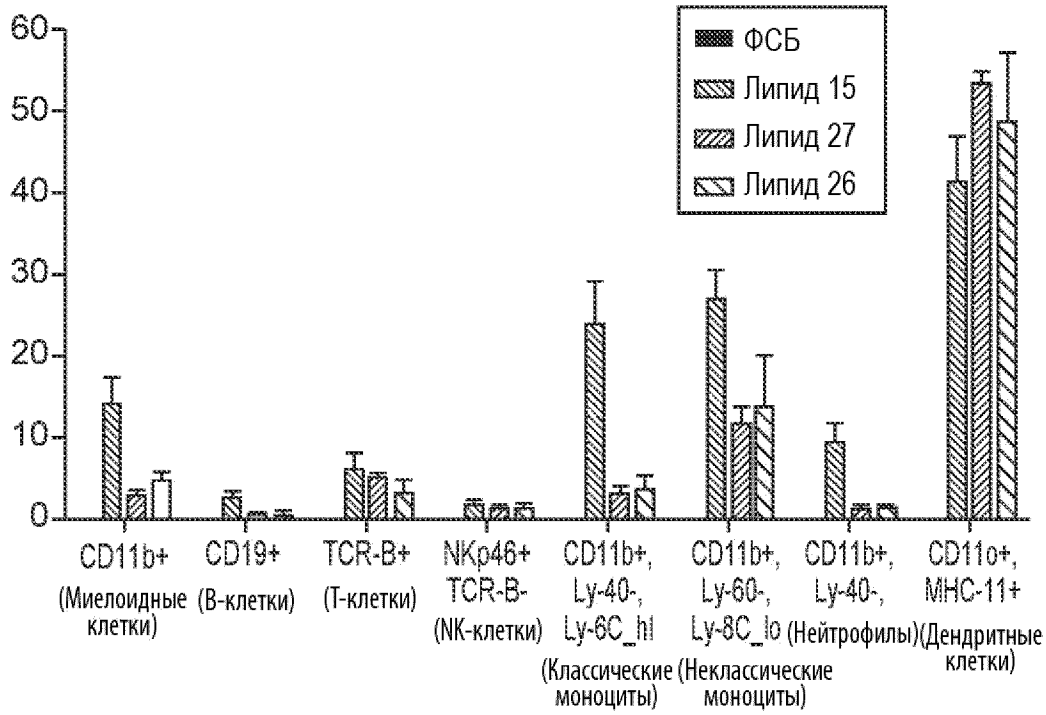
Фиг. 44


Миелоидный (CD11b+)
B-клетки (CD19+)
B-клетки (CD19+)
ФСБ
Липид 27
Липид 26
Липид 15 (Таблица 2)
CD11b
CD19
TCR-B
tdTomato
CD11b+, tdTomato+ 0,092
CD19+, tdTomato+ 0,060
TCR-B+, tdTomato+ 0,073
CD11b+, tdTomato+ 3,46
CD19+, tdTomato+ 0,89
TCR-B+, tdTomato+ 5,83
CD11b+, tdTomato+ 5,96
CD19+, tdTomato+ 0,77
TCR-B+, tdTomato+ 2,60
CD11b+, tdTomato+ 11,6
CD19+, tdTomato+ 2,29
TCR-B+, tdTomato+ 5,62

Фиг. 45A



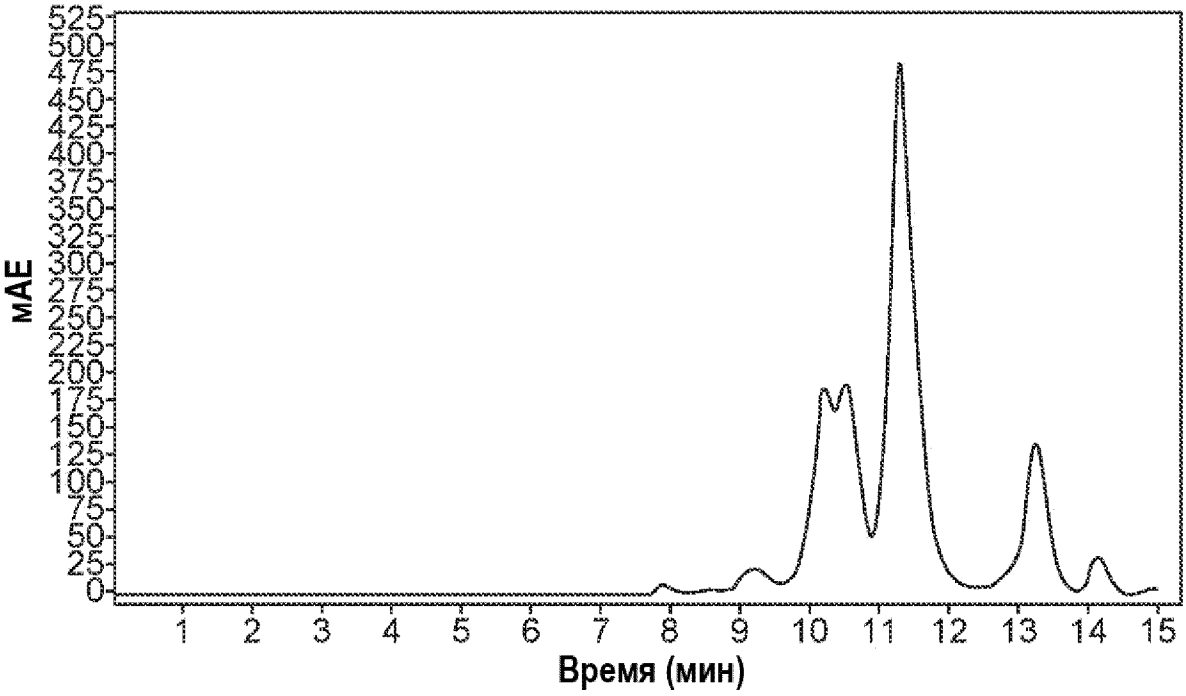
Фиг. 45B



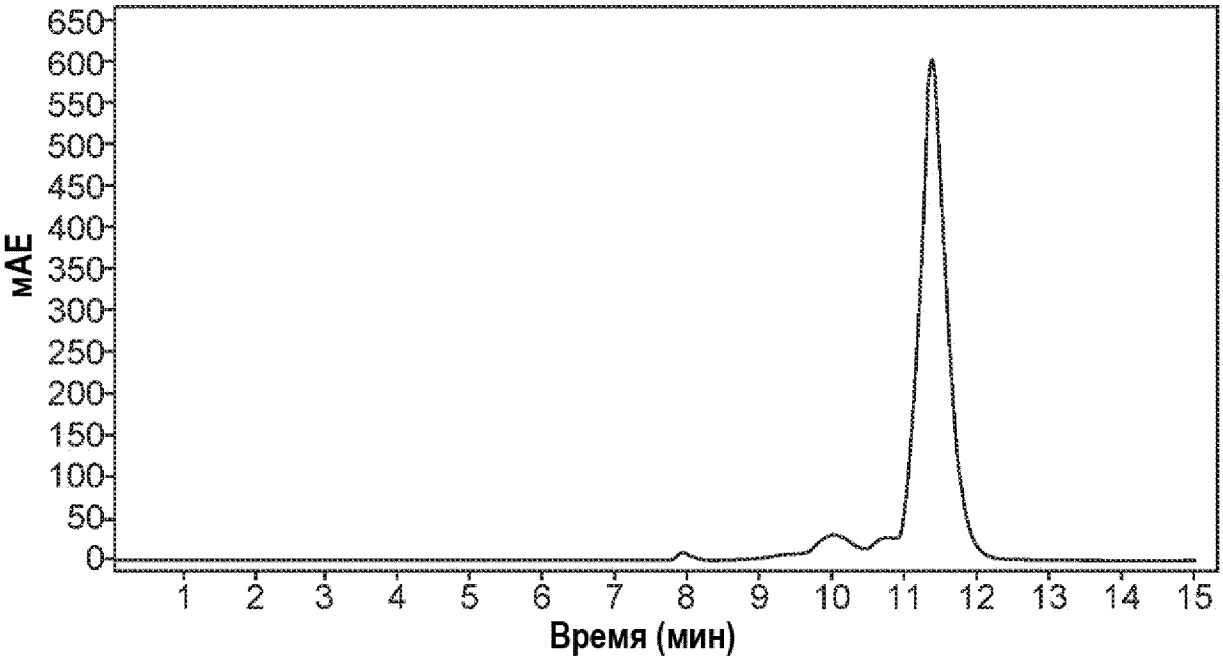
Фиг. 45C



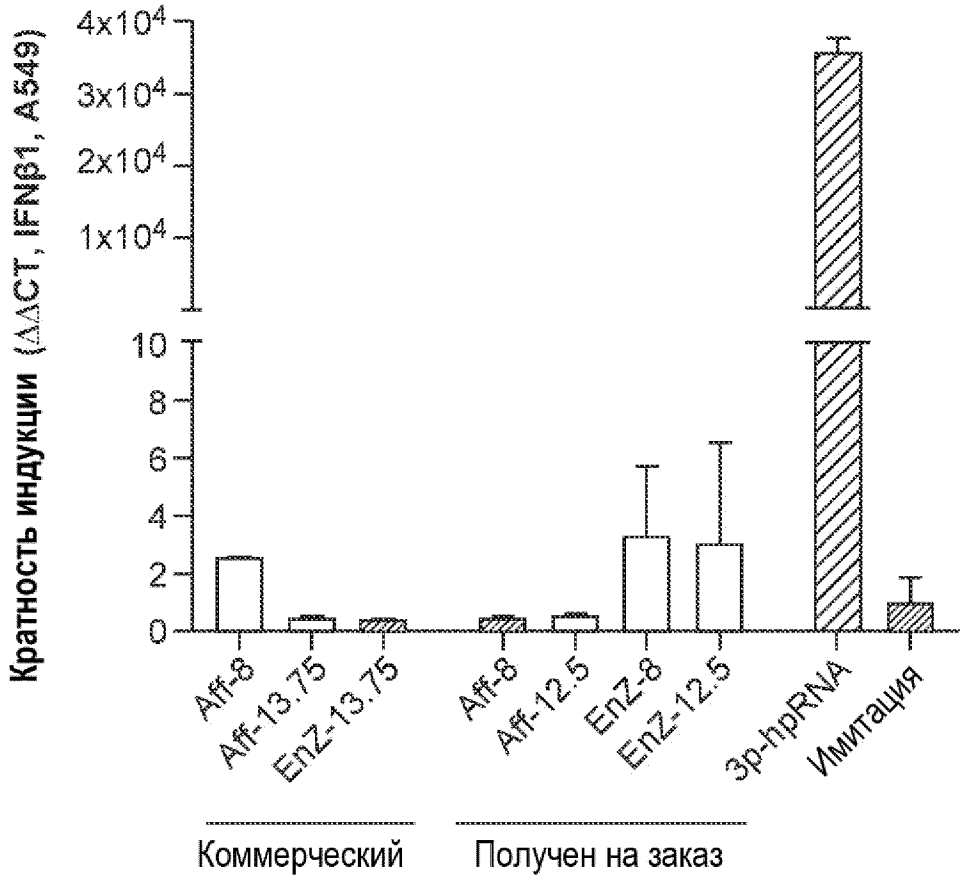
Фиг. 46A



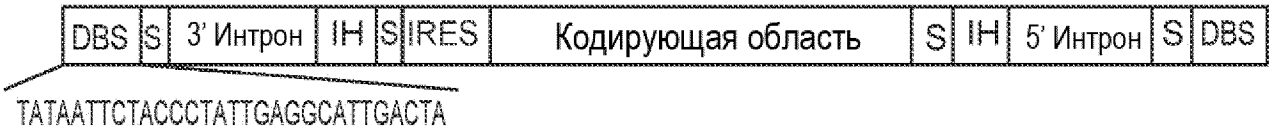
Фиг. 46B



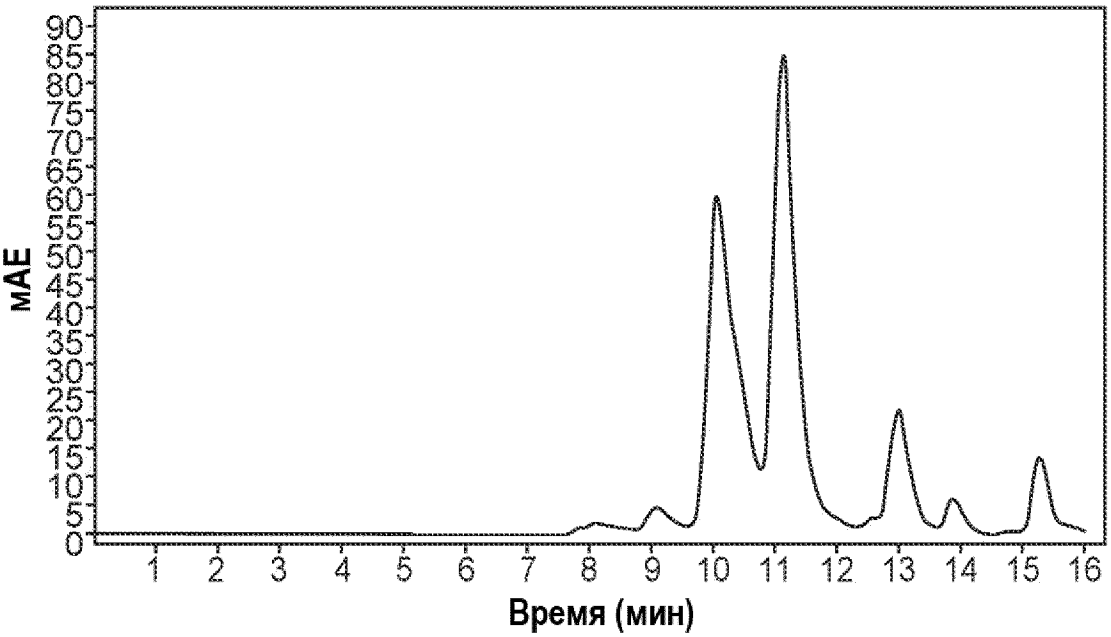
Фиг. 46C


Кратность индукции (ΔΔCT, IFNβ1, A549)
4x10^4
3x10^4
2x10^4
1x10^4
10
8
6
4
2
0
Aff-8
Aff-13.75
EnZ-13.75
Aff-8
Aff-12.5
EnZ-8
EnZ-12.5
3p-hpRNA
Имитация
Коммерческий
Получен на заказ

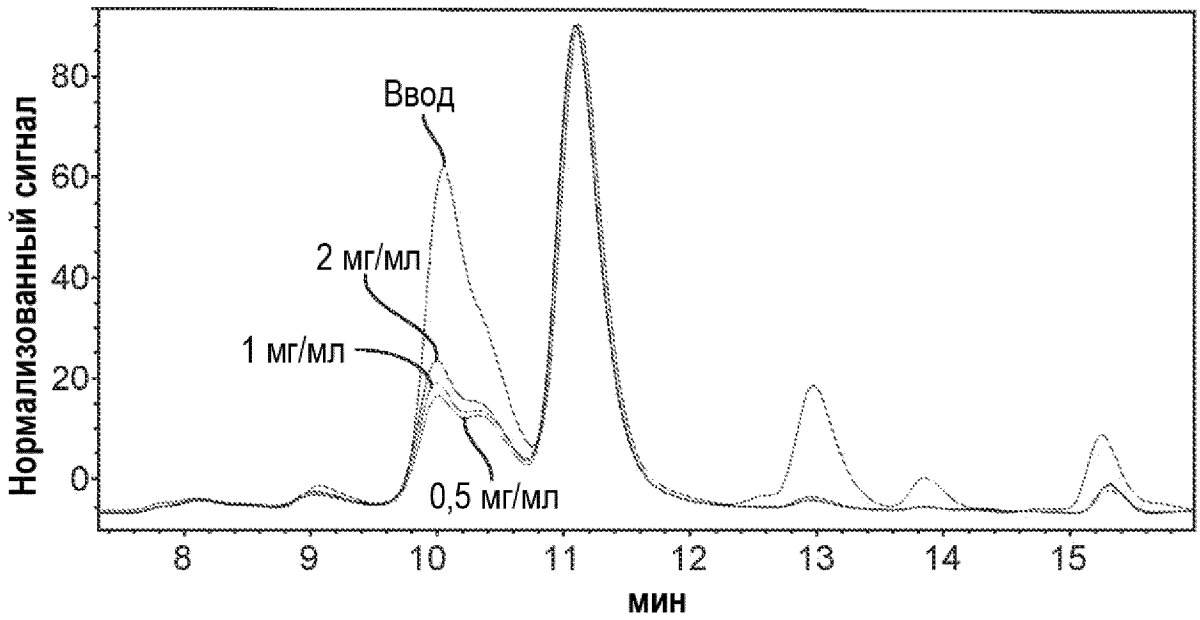
Фиг. 46D



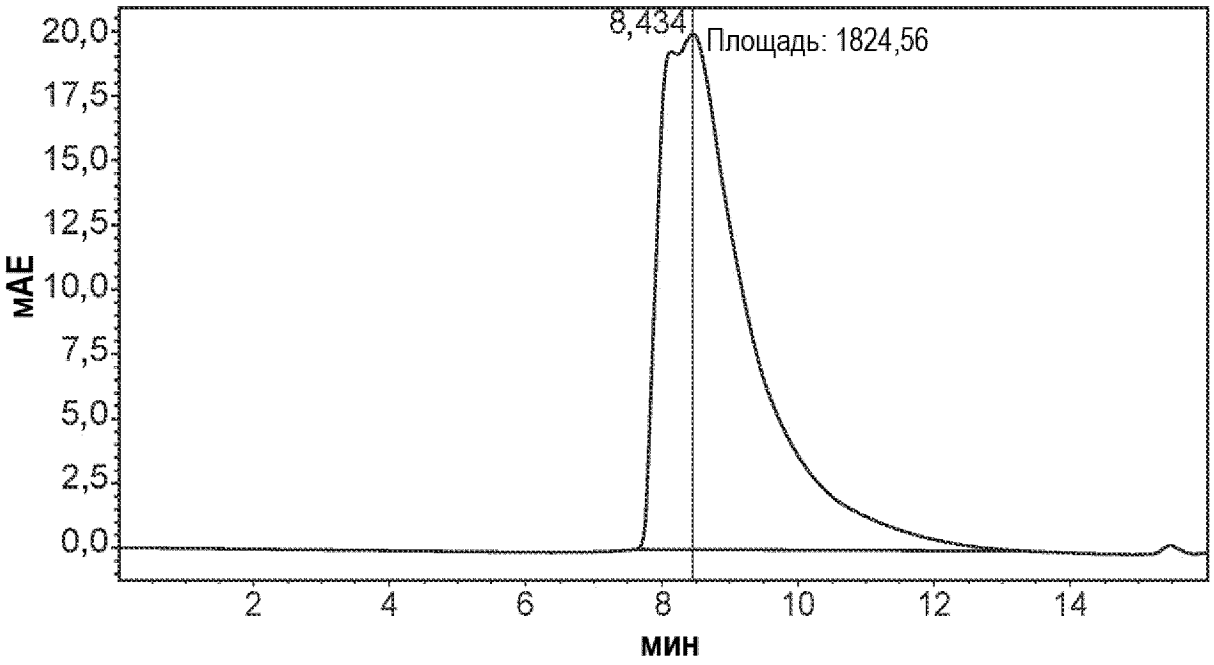
Фиг. 47A



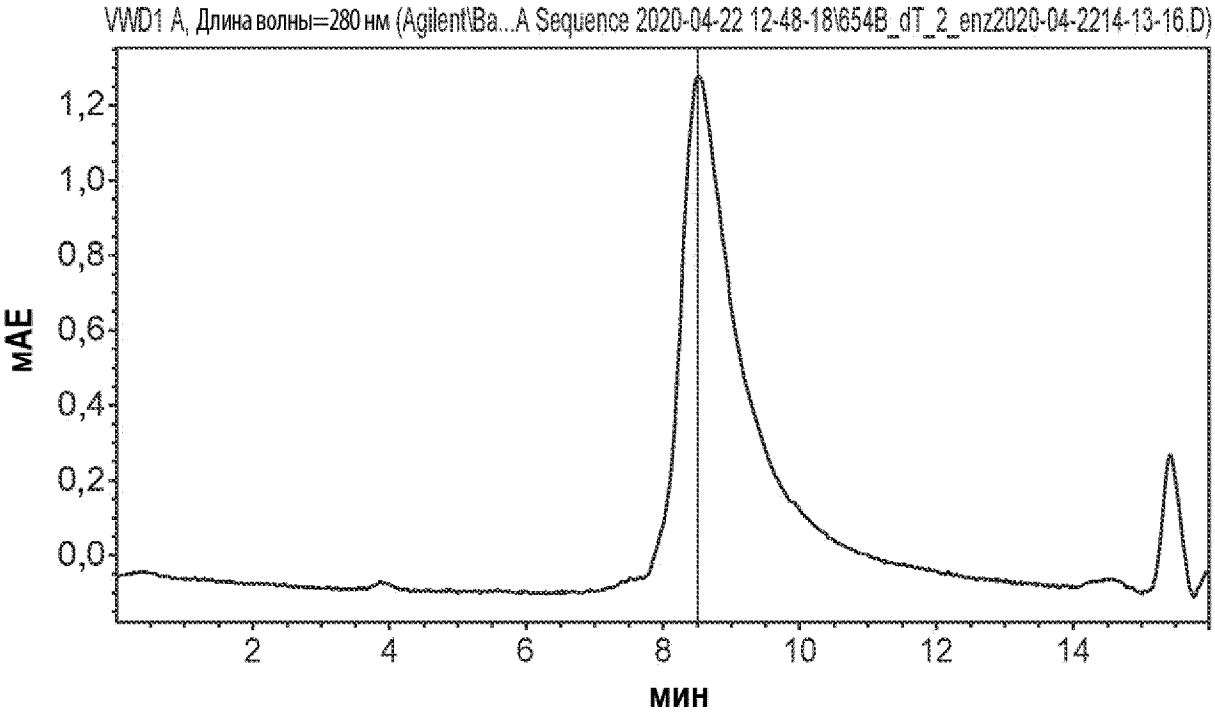
Фиг. 47B



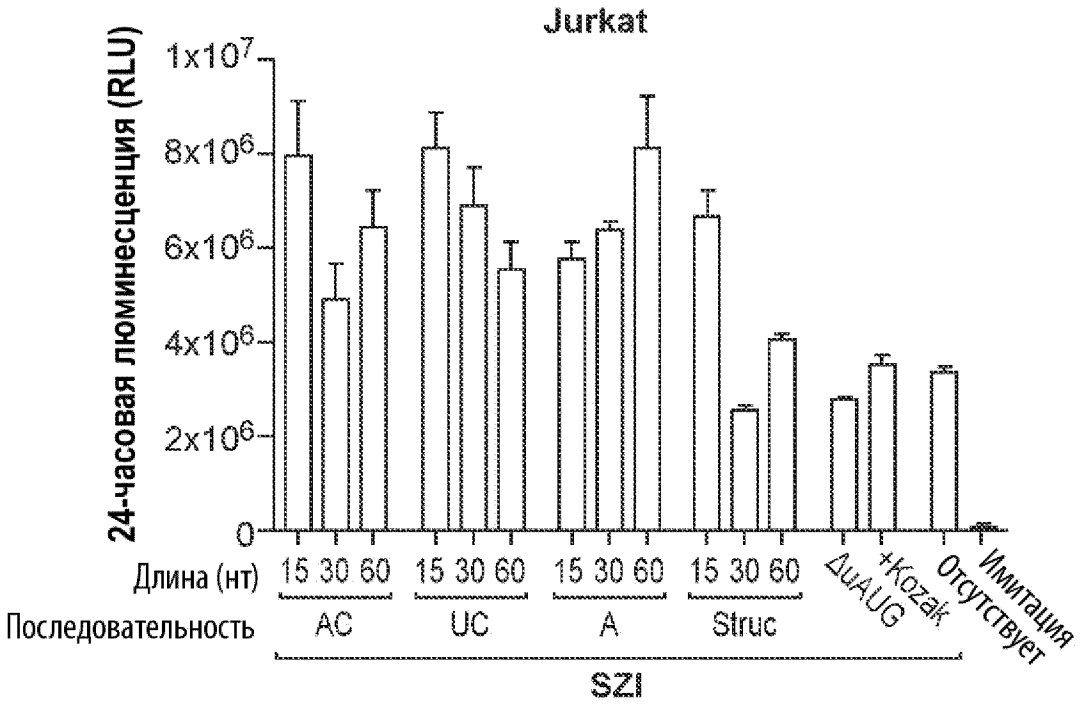
Фиг. 47C



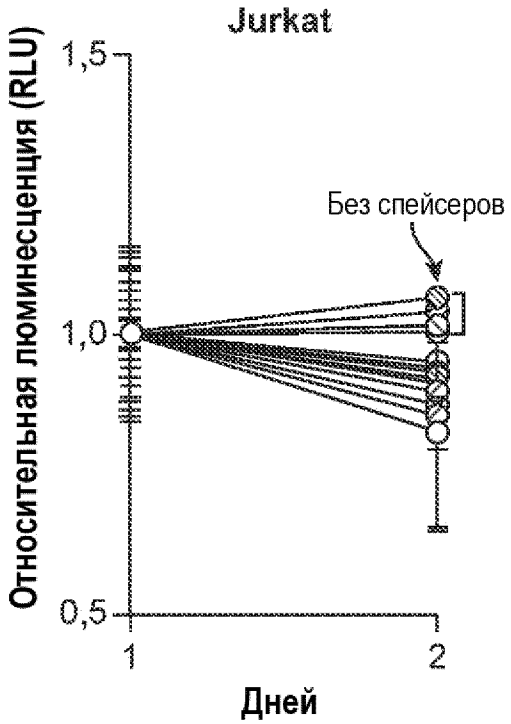
Фиг. 48A



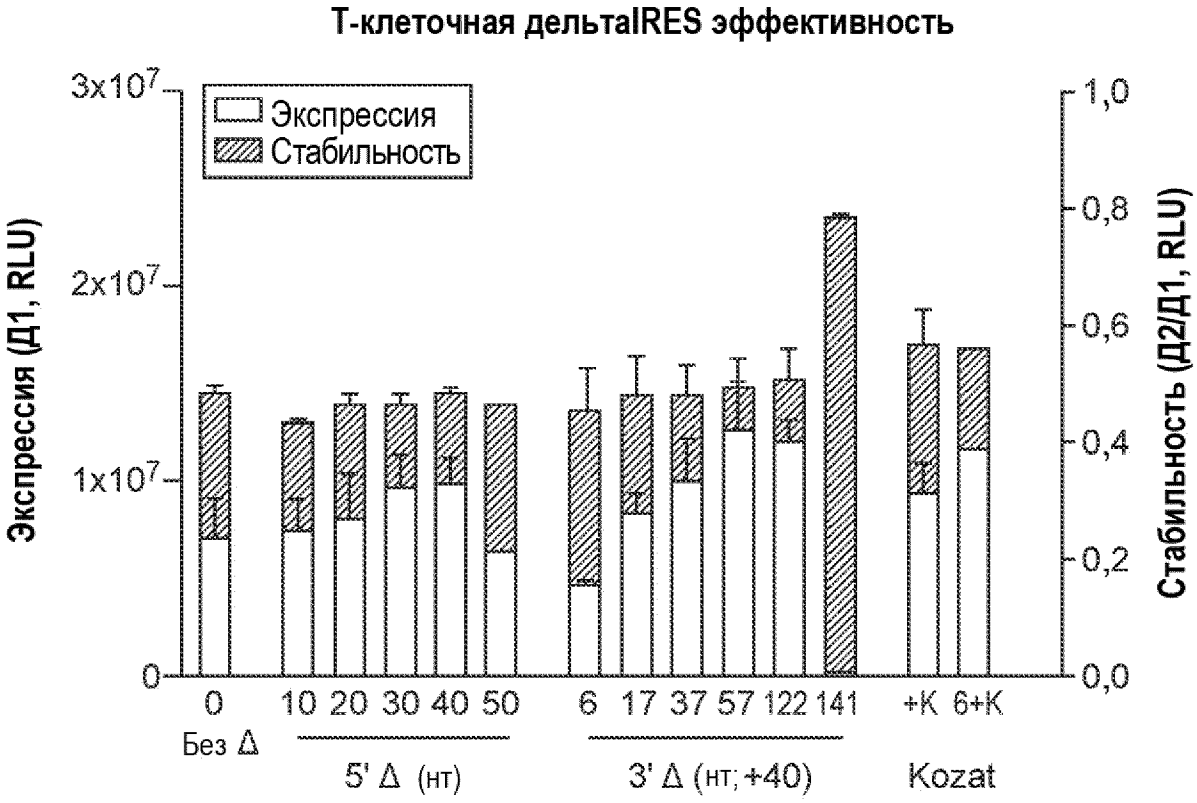
Фиг. 48B



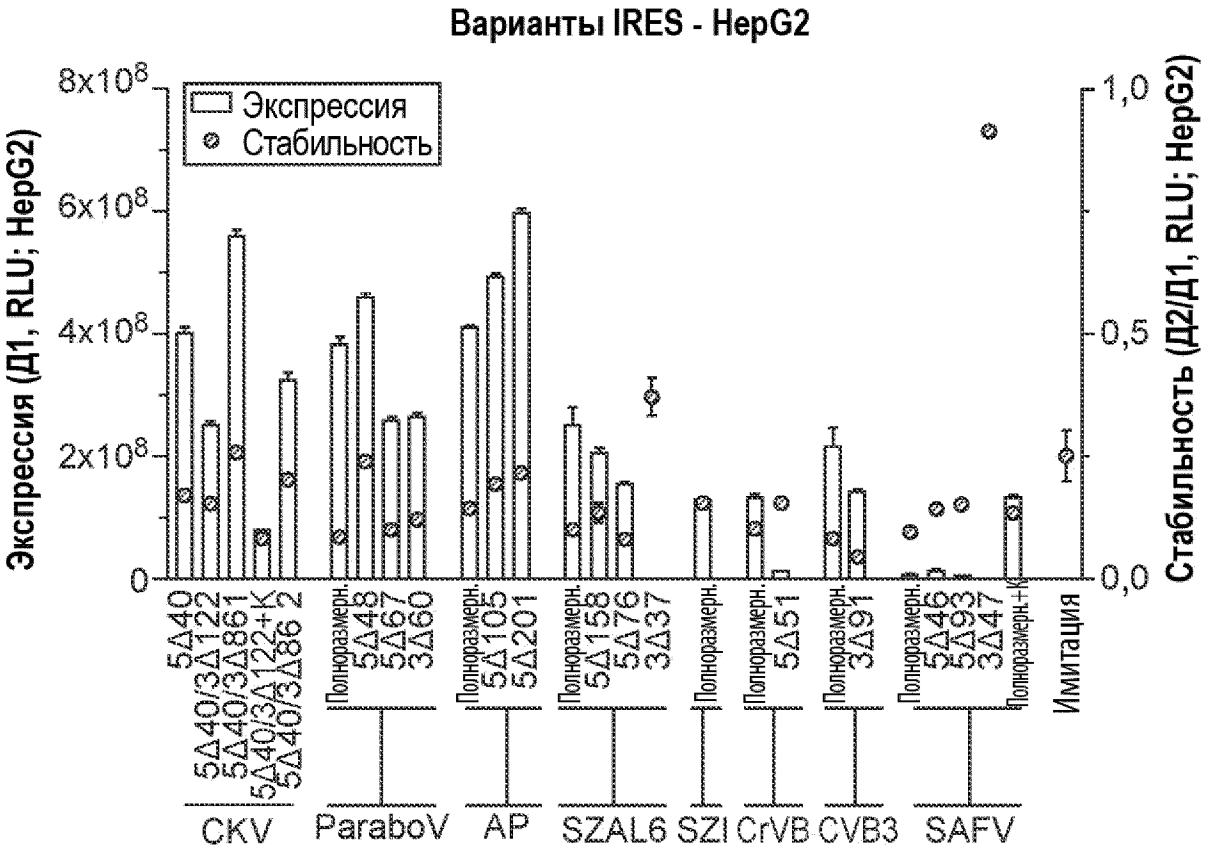
Фиг. 49A



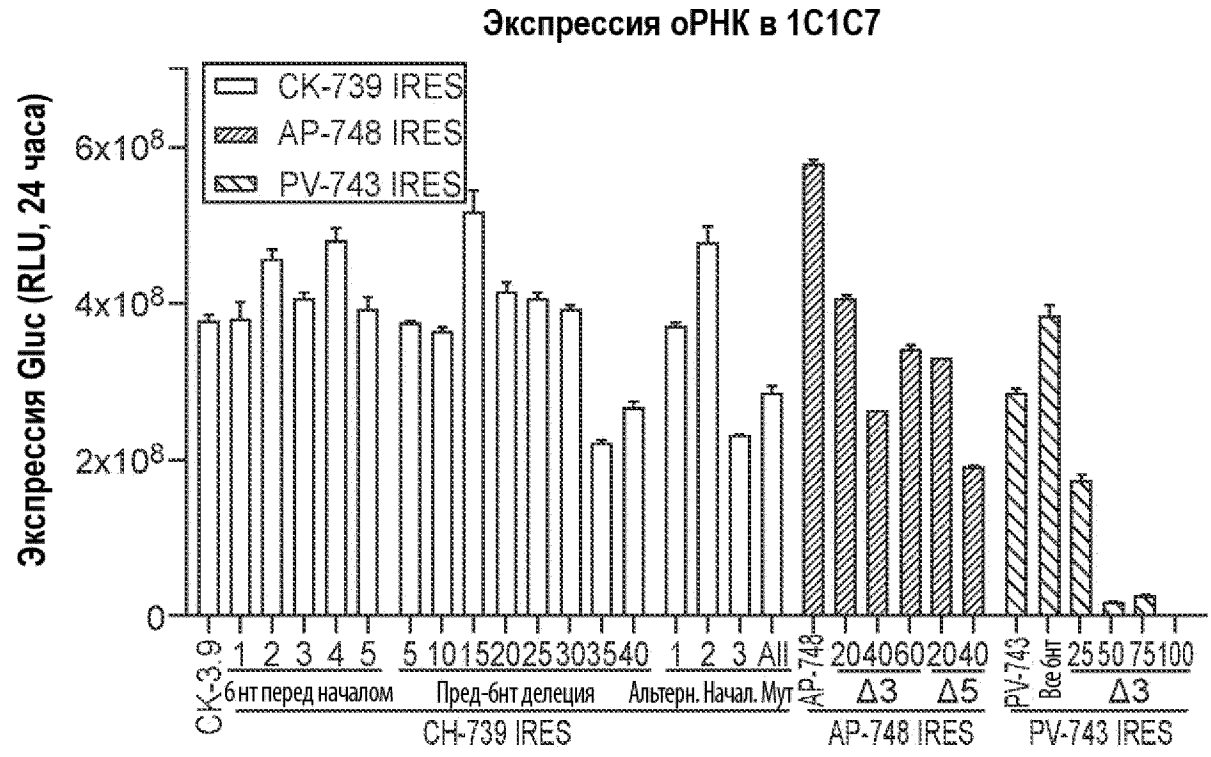
Фиг. 49B


Т-клеточная дельтаIRES эффективность
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU)
Стабильность (Д2/Д1, RLU)
3x10^7
2x10^7
1x10^7
0
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
10 20 30 40 50
6 17 37 57 122 141
+K 6+K
Без Δ
5' Δ (нт)
3' Δ (нт; +40)
Kozat

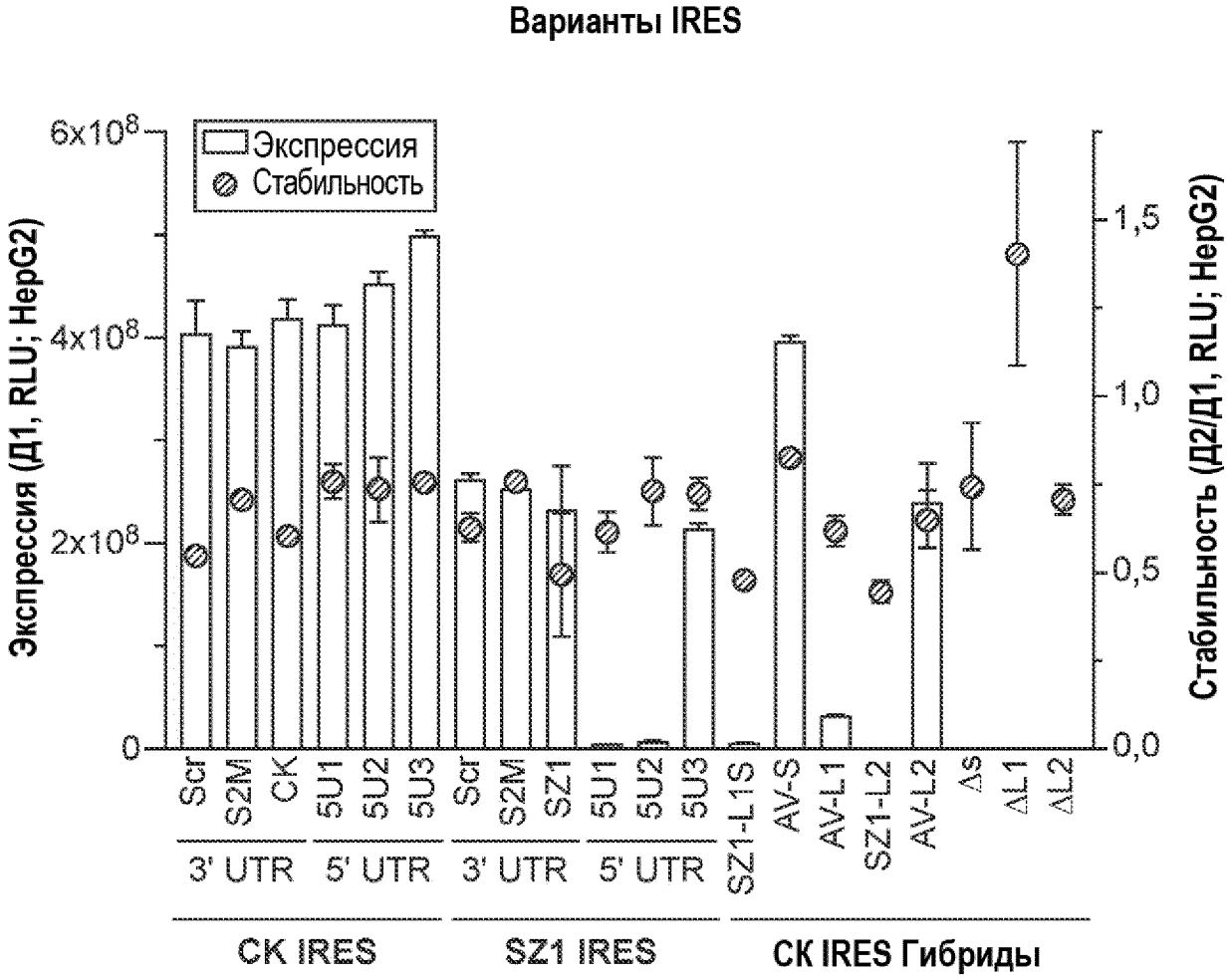
Фиг. 50


Варианты IRES - HepG2
Экспрессия (Д1, RLU; HepG2)
Стабильность (Д2/Д1, RLU; HepG2)
Экспрессия
Стабильность
8x10^8
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
1,0
0,5
0,0
5Δ40
5Δ40/3Δ122
5Δ40/3Δ861
5Δ40/3Δ122+K
5Δ40/3Δ86 2
Полноразмерн.
5Δ48
5Δ67
3Δ60
Полноразмерн.
5Δ105
5Δ201
Полноразмерн.
5Δ158
5Δ76
3Δ37
Полноразмерн.
Полноразмерн.
5Δ51
Полноразмерн.
3Δ91
Полноразмерн.
5Δ46
5Δ93
3Δ47
Полноразмерн.+K
Имитация
CKV
ParaboV
AP
SZAL6
SZI
CrVB
CVB3
SAFV

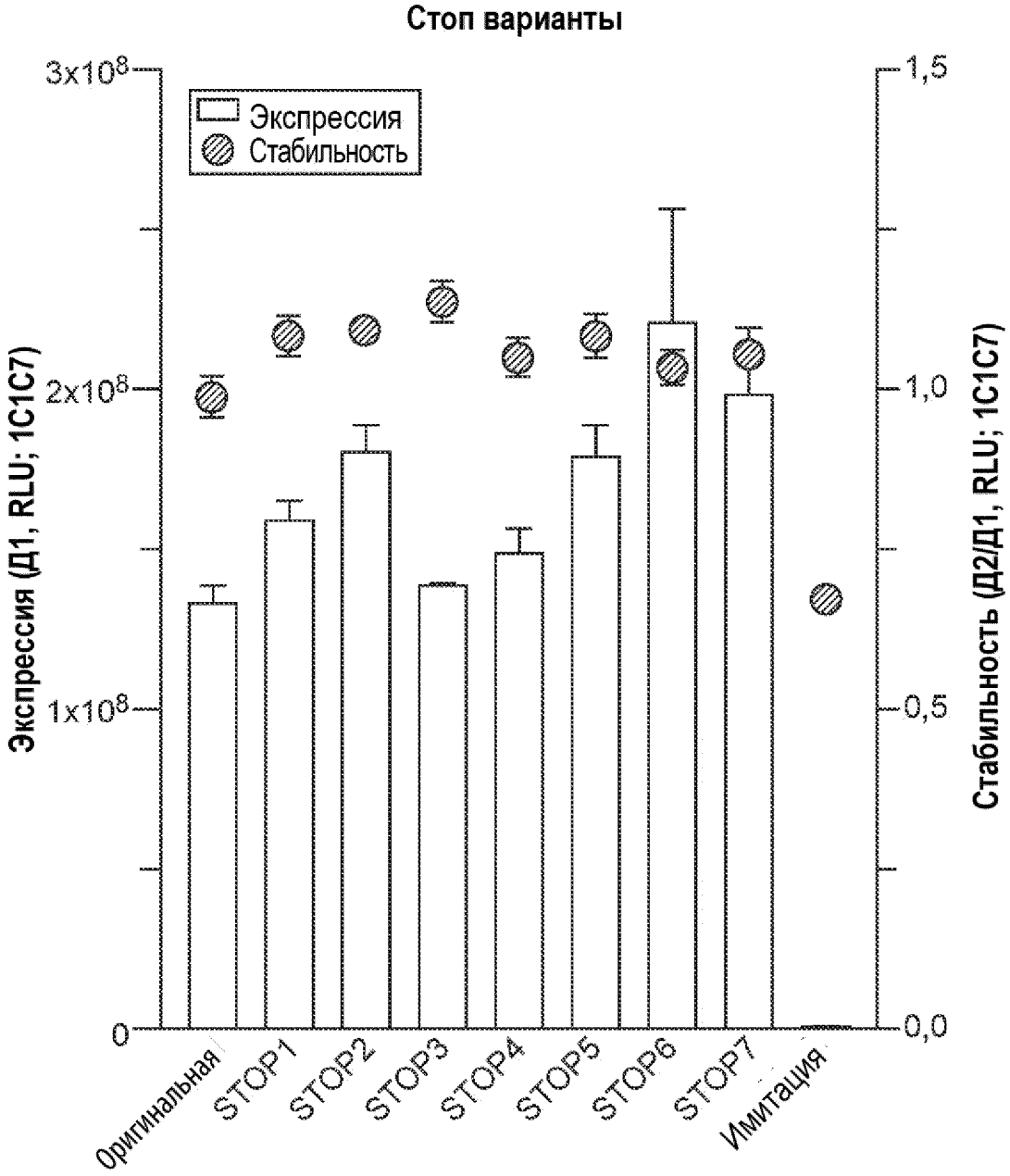
Фиг. 51


Экспрессия oРНК в 1C1C7
Экспрессия Gluc (RLU, 24 часа)
CK-739 IRES
AP-748 IRES
PV-743 IRES
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
CK-3.9
1 2 3 4 5
5 10 15 20 25 30 35 40
1 2 3 All
AP-748
20 40 60
20 40
PV-743
Все 6нт
25 50 75 100
6 нт перед началом
Пред-6нт делеция
Альтерн. Начал. Мут
Δ3
Δ5
Δ3
CH-739 IRES
AP-748 IRES
PV-743 IRES

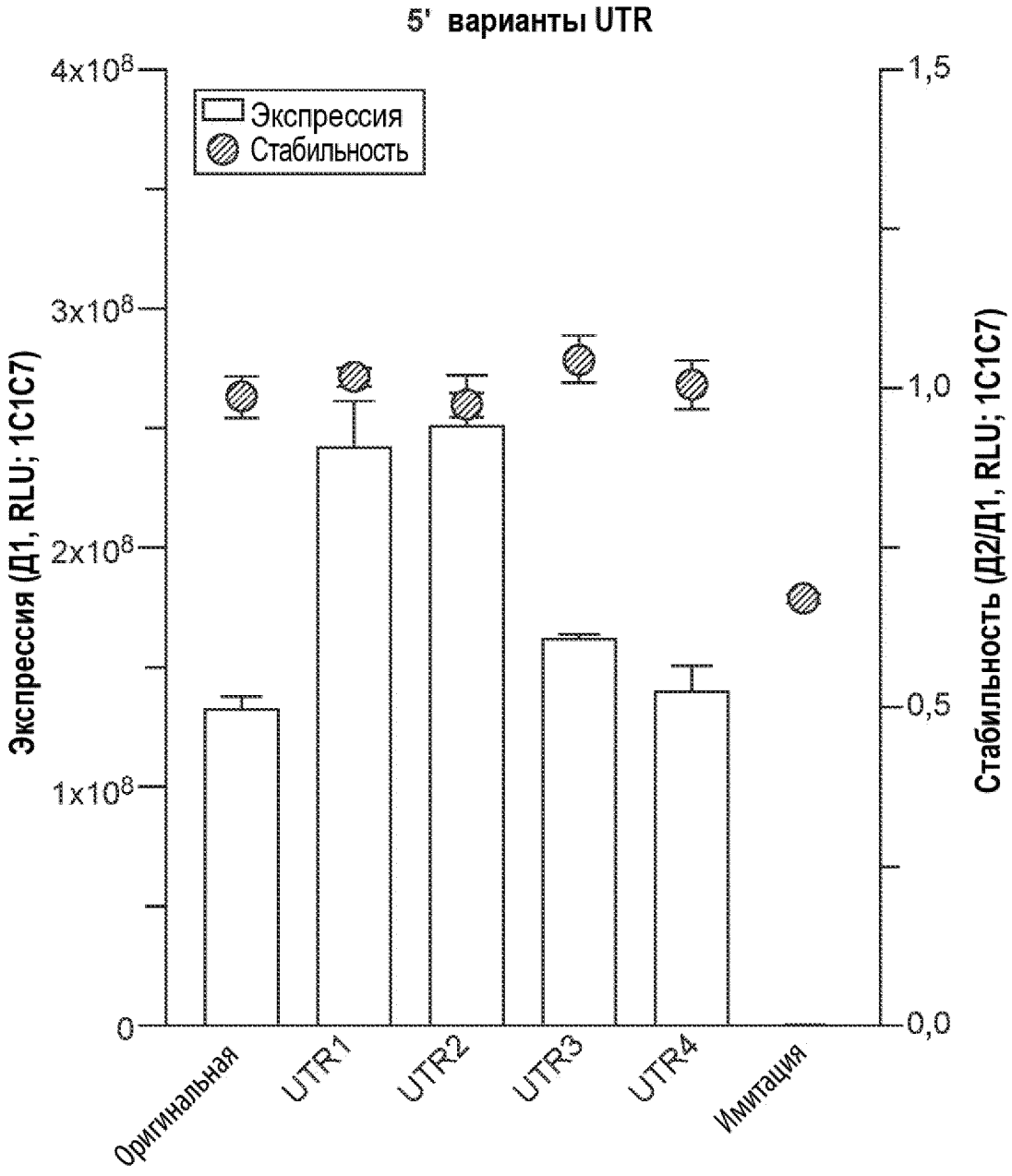
Фиг. 52


Варианты IRES
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU; HepG2)
Стабильность (Д2/Д1, RLU; HepG2)
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
1,5
1,0
0,5
0,0
Scr
S2M
CK
5U1
5U2
5U3
Scr
S2M
SZ1
5U1
5U2
5U3
SZ1-L1S
AV-S
AV-L1
SZ1-L2
AV-L2
Δs
ΔL1
ΔL2
3' UTR
5' UTR
3' UTR
5' UTR
CK IRES
SZ1 IRES
CK IRES Гибриды

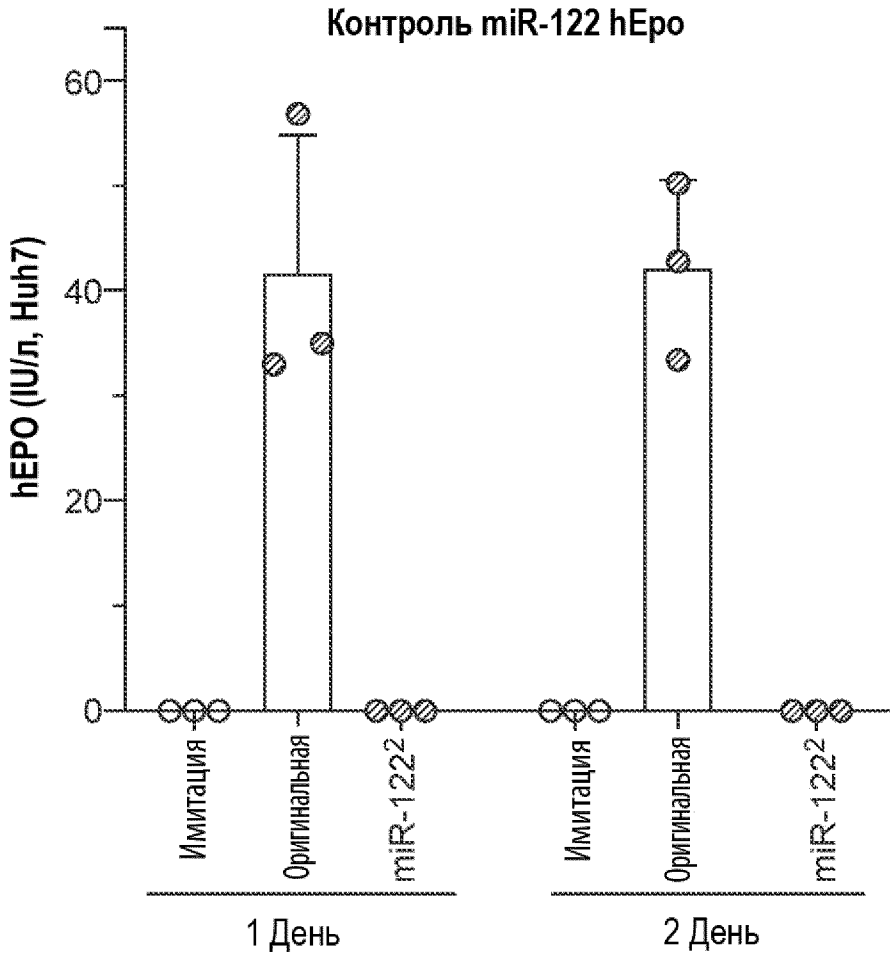
Фиг. 53


Стоп варианты
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU; 1C1C7)
Стабильность (Д2/Д1, RLU; 1C1C7)
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
1,5
1,0
0,5
0,0
Оригинальная
STOP1
STOP2
STOP3
STOP4
STOP5
STOP6
STOP7
Имитация

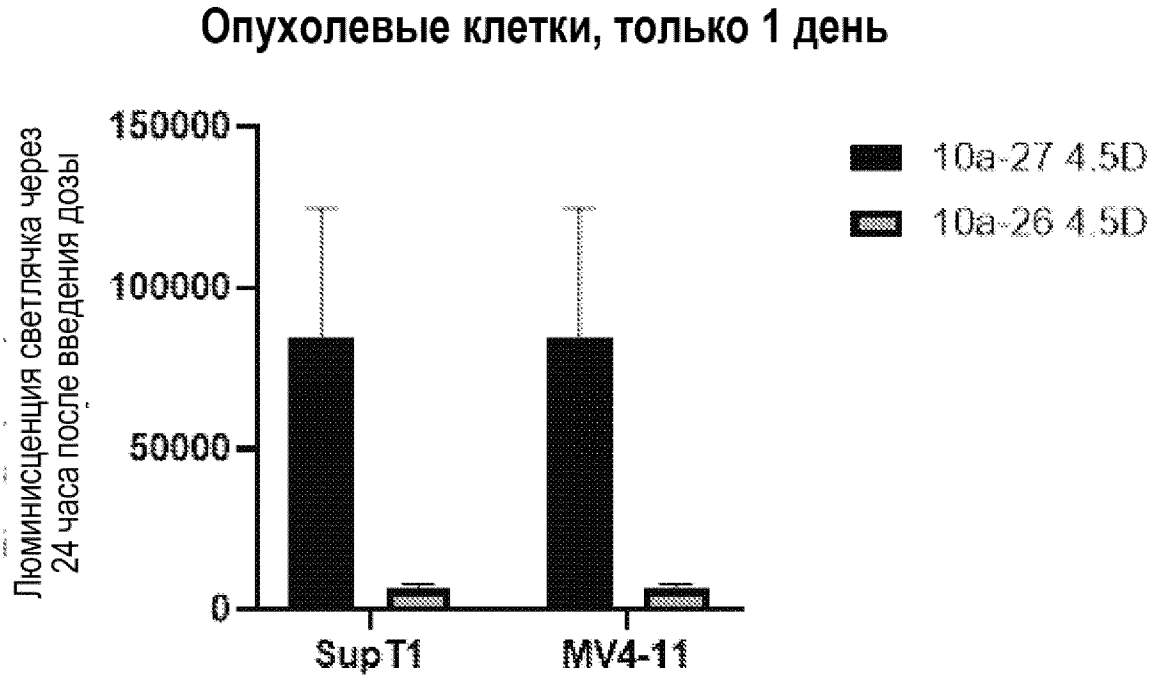
Фиг. 54


5' варианты UTR
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU; 1C1C7)
Стабильность (Д2/Д1, RLU; 1C1C7)
4x10^8
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
1,5
1,0
0,5
0,0
Оригинальная
UTR1
UTR2
UTR3
UTR4
Имитация

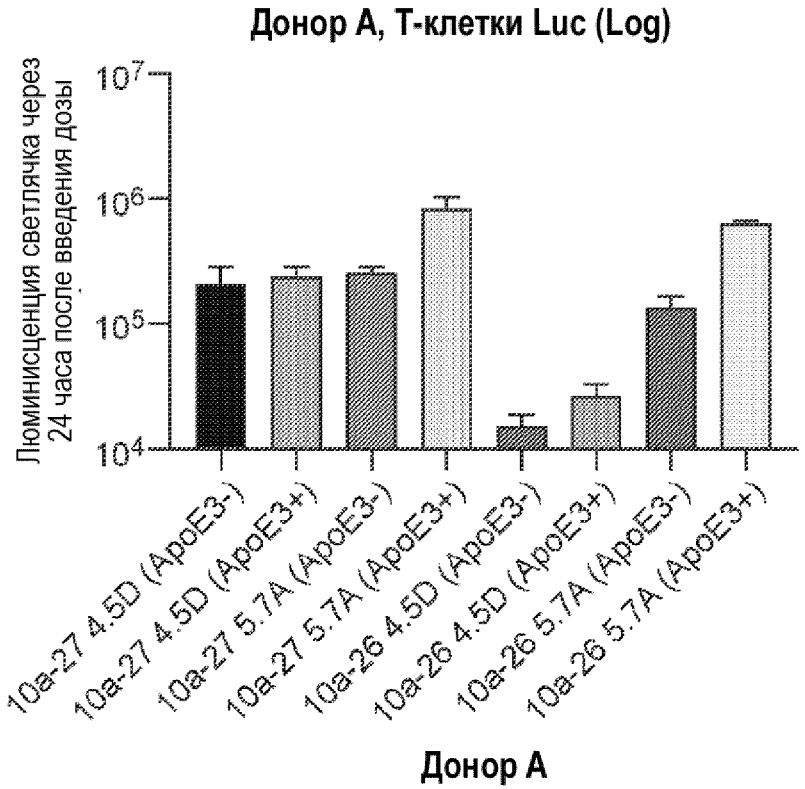
Фиг. 55

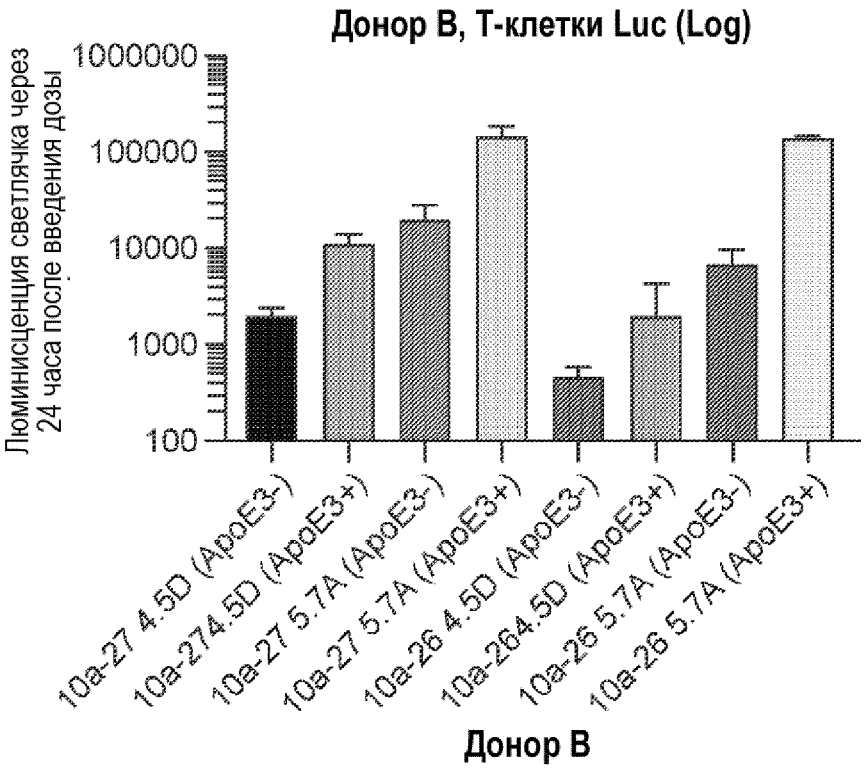

Контроль miR-122 hEpo
hEPO (IU/л, Huh7)
60
40
20
0
Имитация
Оригинальная
miR-122
Имитация
Оригинальная
miR-122
1 День
2 День

Фиг. 56

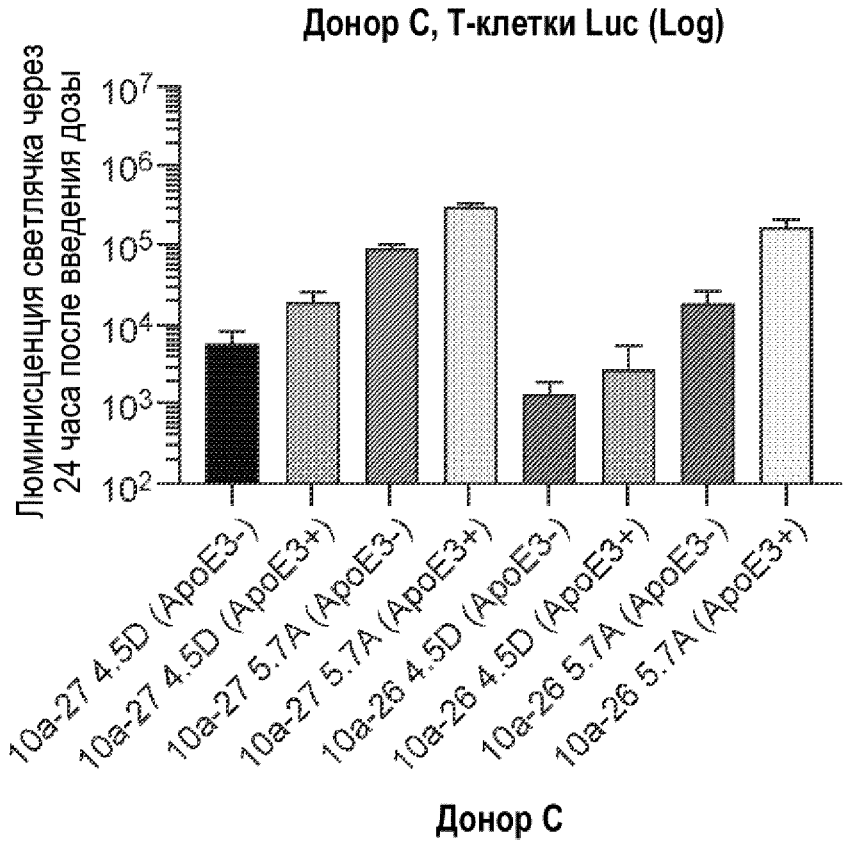

Опухолевые клетки, только 1 день
Люминисценция светлячка через 24 часа после введения дозы
150000
100000
50000
0
SupT1
MV4-11
10a-27 4.5D
10a-26 4.5D

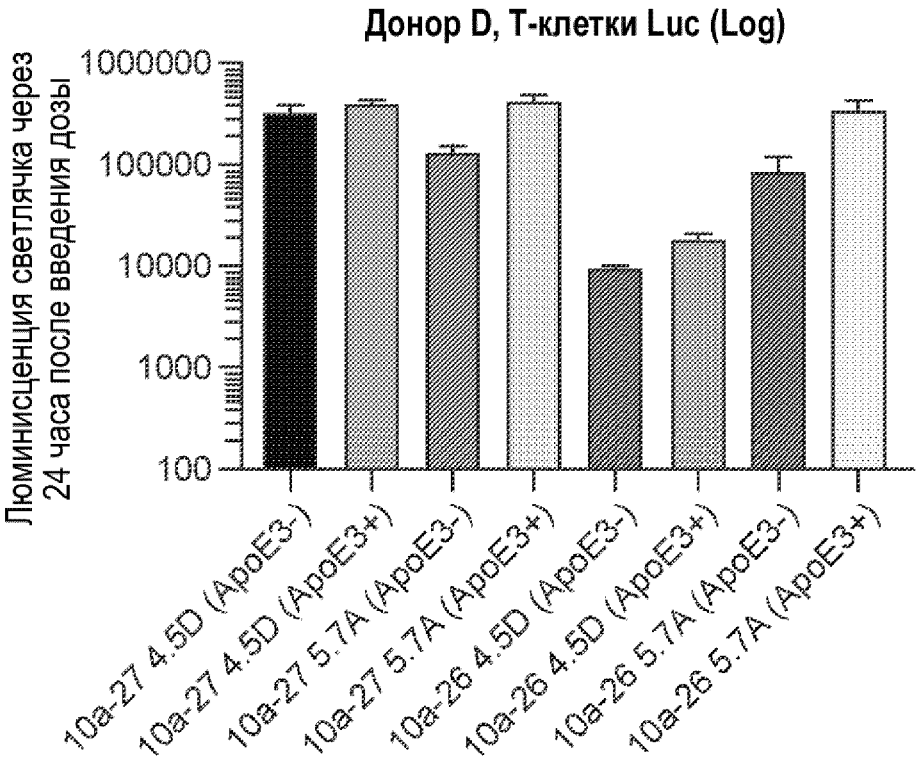
Фиг. 57


Донор A, T-клетки Luc (Log)
Люминисценция светлячка через 24 часа после введения дозы
10^7
10^6
10^5
10^4
10a-27 4.5D (ApoE3-)
10a-27 4.5D (ApoE3+)
10a-27 5.7A (ApoE3-)
10a-27 5.7A (ApoE3+)
10a-26 4.5D (ApoE3-)
10a-26 4.5D (ApoE3+)
10a-26 5.7A (ApoE3-)
10a-26 5.7A (ApoE3+)
Донор A

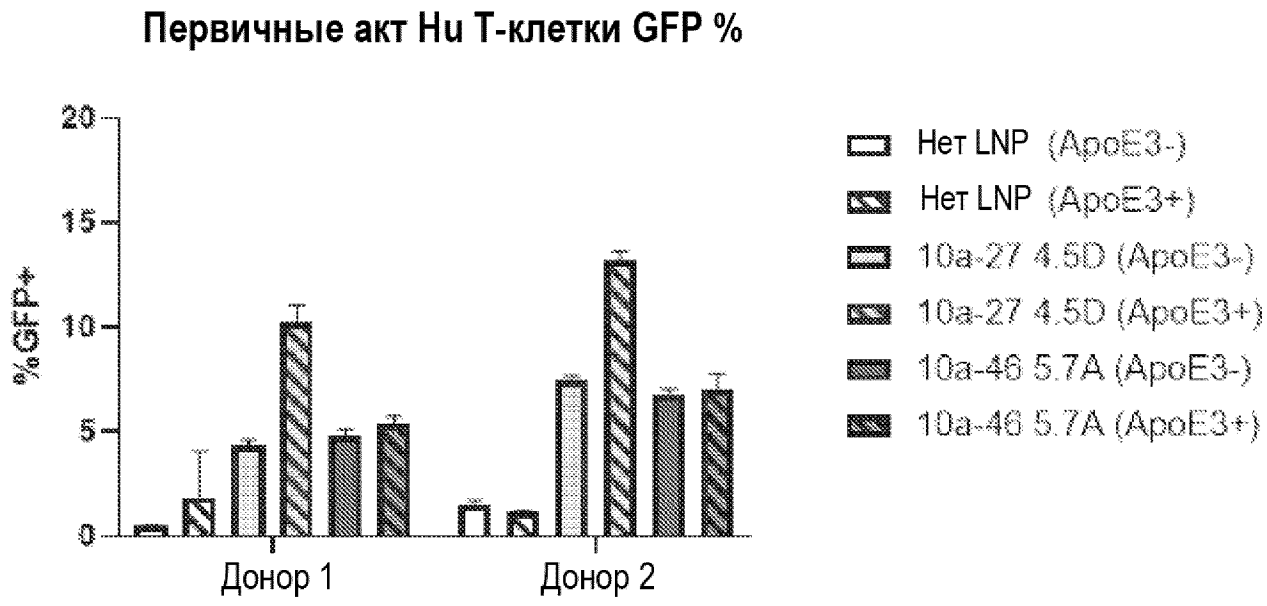

Донор B, T-клетки Luc (Log)
Люминисценция светлячка через 24 часа после введения дозы
1000000
100000
10000
1000
100
10a-27 4.5D (ApoE3-)
10a-274.5D (ApoE3+)
10a-27 5.7A (ApoE3-)
10a-27 5.7A (ApoE3+)
10a-26 4.5D (ApoE3-)
10a-264.5D (ApoE3+)
10a-26 5.7A (ApoE3-)
10a-26 5.7A (ApoE3+)
Донор B

Фиг. 58

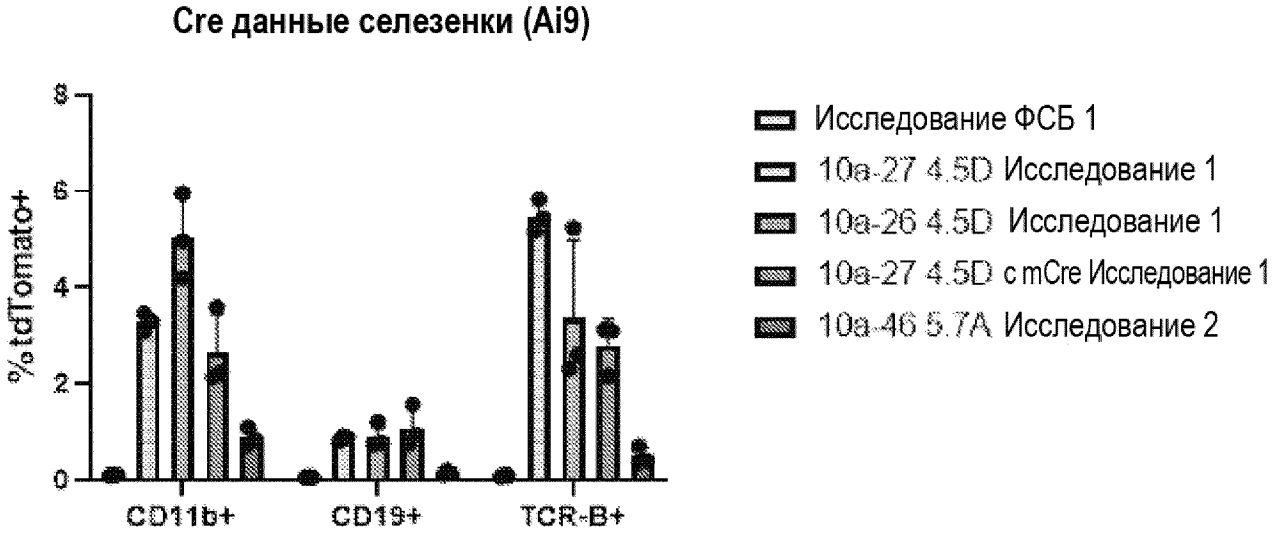




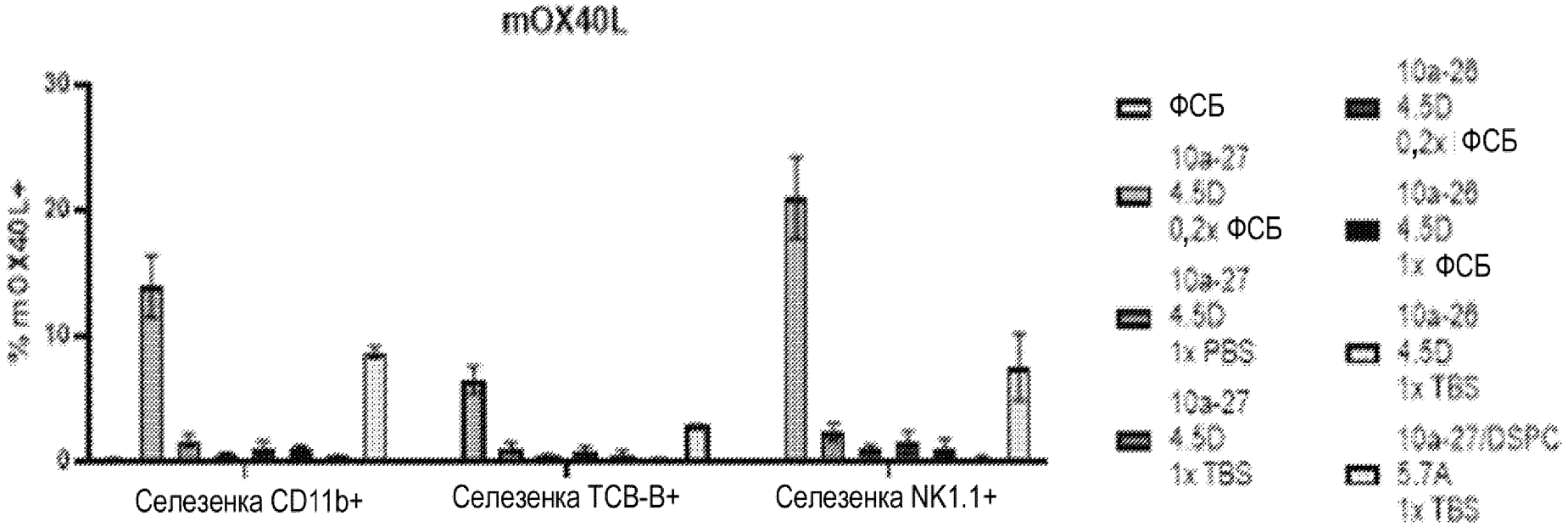
Фиг. 58 (продолж.)


Первичные акт Hu T-клетки GFP %
% GFP+
20
15
10
5
0
Донор 1
Донор 2
Нет LNP (ApoE3-)
Нет LNP (ApoE3+)
10a-27 4.5D (ApoE3-)
10a-27 4.5D (ApoE3+)
10a-46 5.7A (ApoE3-)
10a-46 5.7A (ApoE3+)

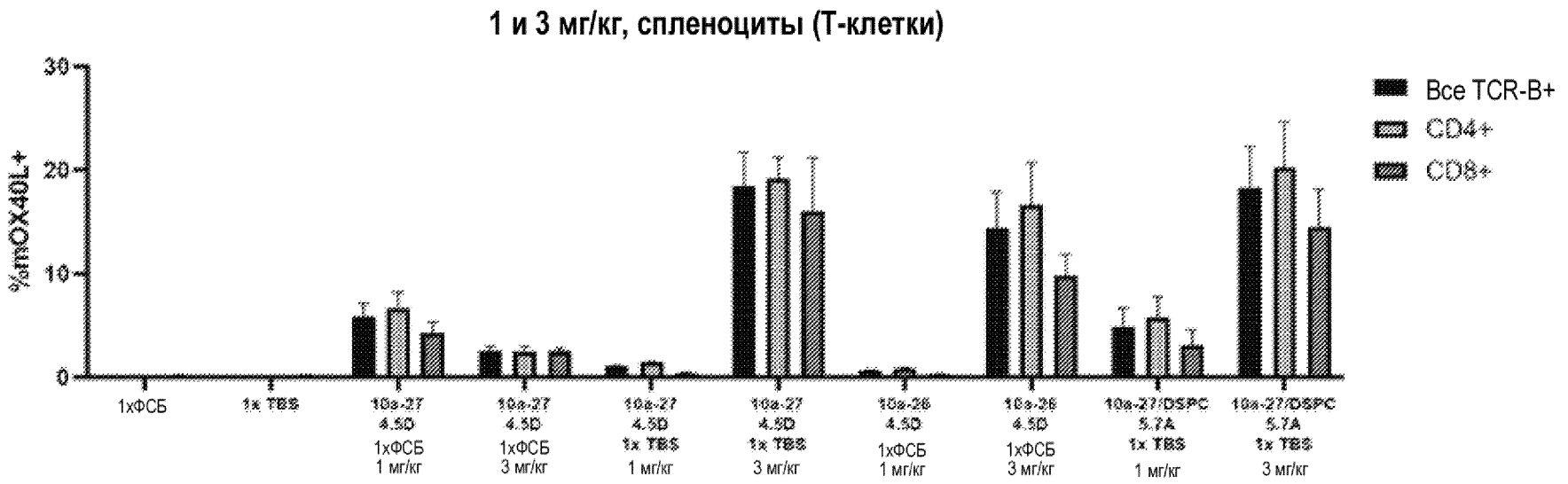
Фиг. 59


Cre данные селезенки (Ai9)
% tdTomato+
8
6
4
2
0
CD11b+
CD19+
TCR-B+
Исследование ФСБ 1
10a-27 4.5D Исследование 1
10a-26 4.5D Исследование 1
10a-27 4.5D с mCre Исследование 1
10a-46 5.7A Исследование 2

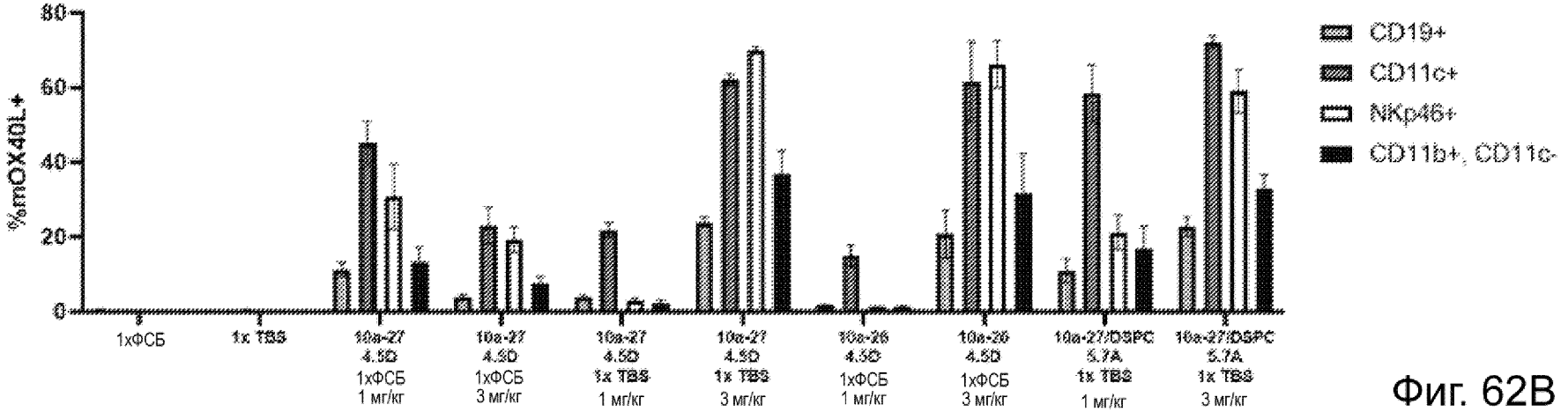
Фиг. 60


mOX40L
% mOX40L+
30
20
10
0
Селезенка CD11b+
Селезенка TCB-B+
Селезенка NK1.1+
ФСБ
10a-27
4.5D
0,2x ФСБ
10a-27
4.5D
1x PBS
10a-27
4.5D
1x TBS
10a-28
4.5D
0,2x ФСБ
10a-28
4.5D
1x ФСБ
10a-28
4.5D
1x TBS
10a-27/DSPC
5.7A
1x TBS

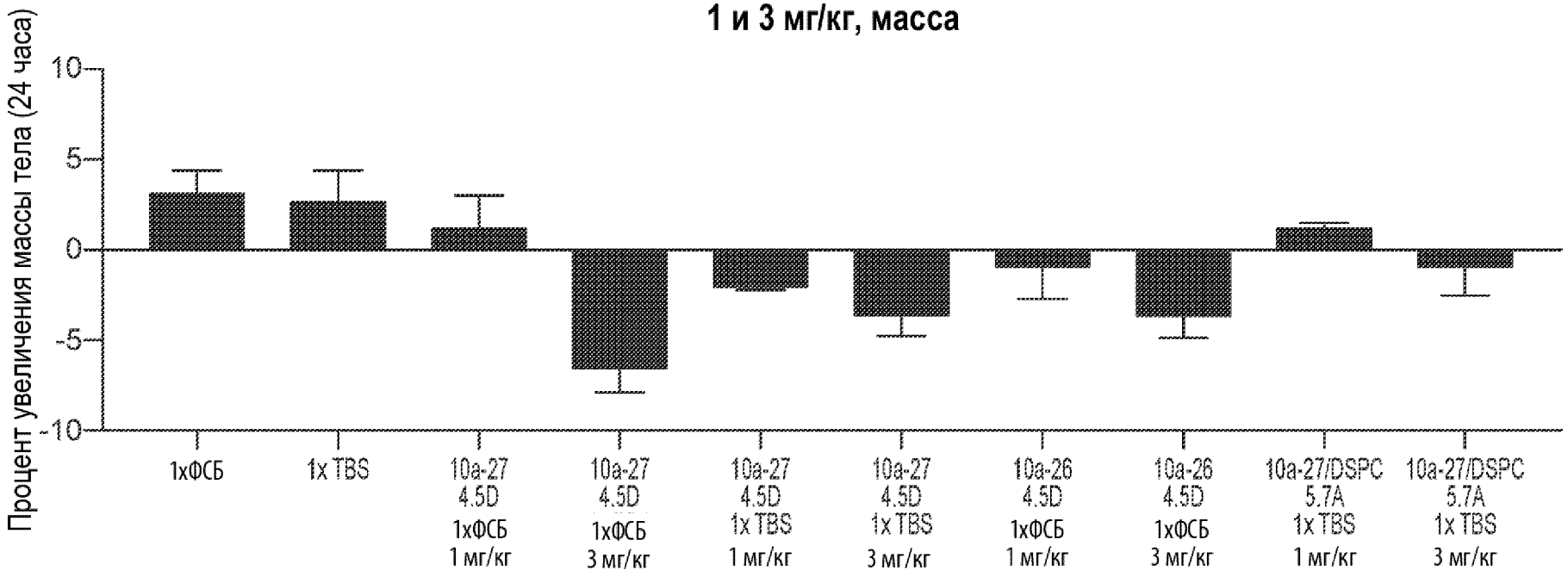
Фиг. 61



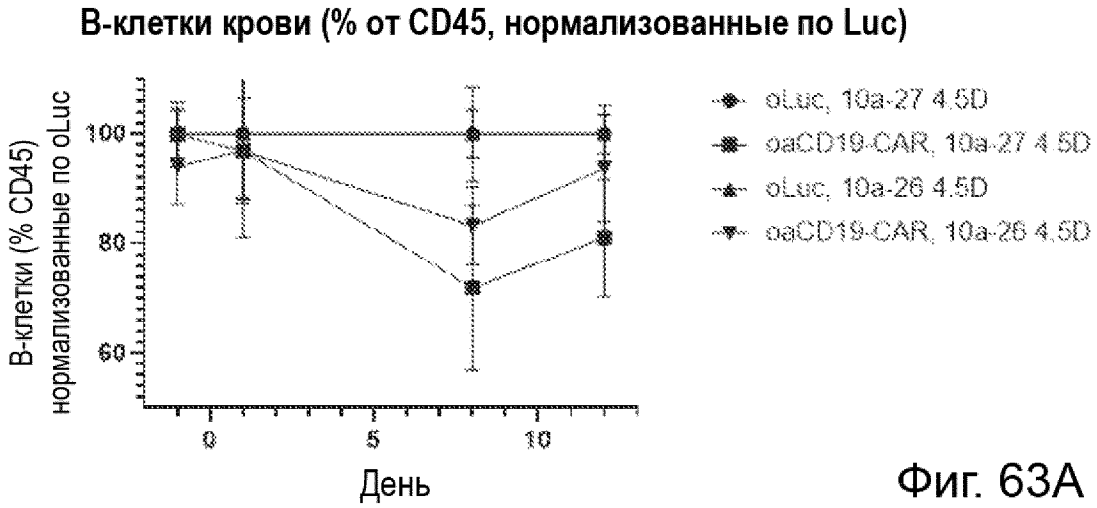
Фиг. 62A



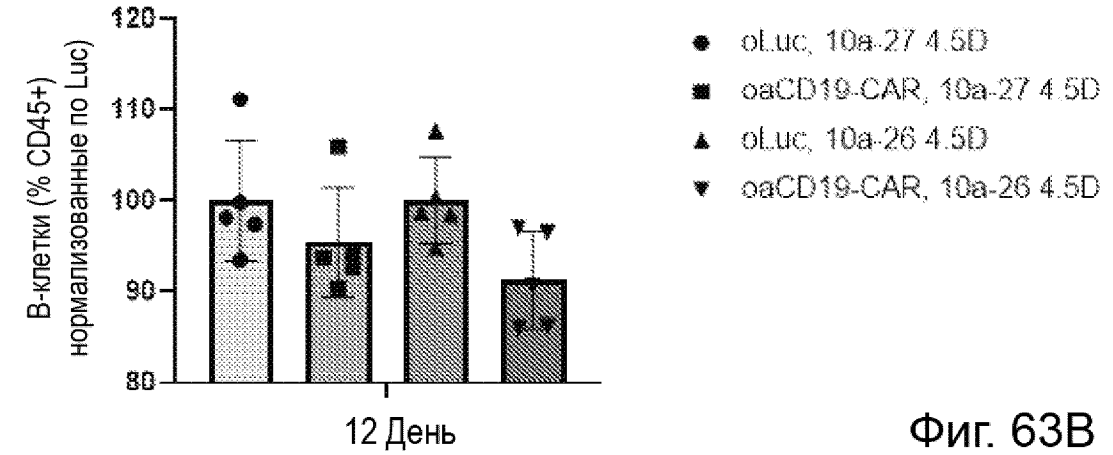
Фиг. 62B


1 и 3 мг/кг, масса
Процент увеличения массы тела (24 часа)
10
5
0
-5
-10
1хФСБ
1x TBS
10a-27 4.5D 1хФСБ 1 мг/кг
10a-27 4.5D 1хФСБ 3 мг/кг
10a-27 4.5D 1x TBS 1 мг/кг
10a-27 4.5D 1x TBS 3 мг/кг
10a-26 4.5D 1хФСБ 1 мг/кг
10a-26 4.5D 1хФСБ 3 мг/кг
10a-27/DSPC 5.7A 1x TBS 1 мг/кг
10a-27/DSPC 5.7A 1x TBS 3 мг/кг

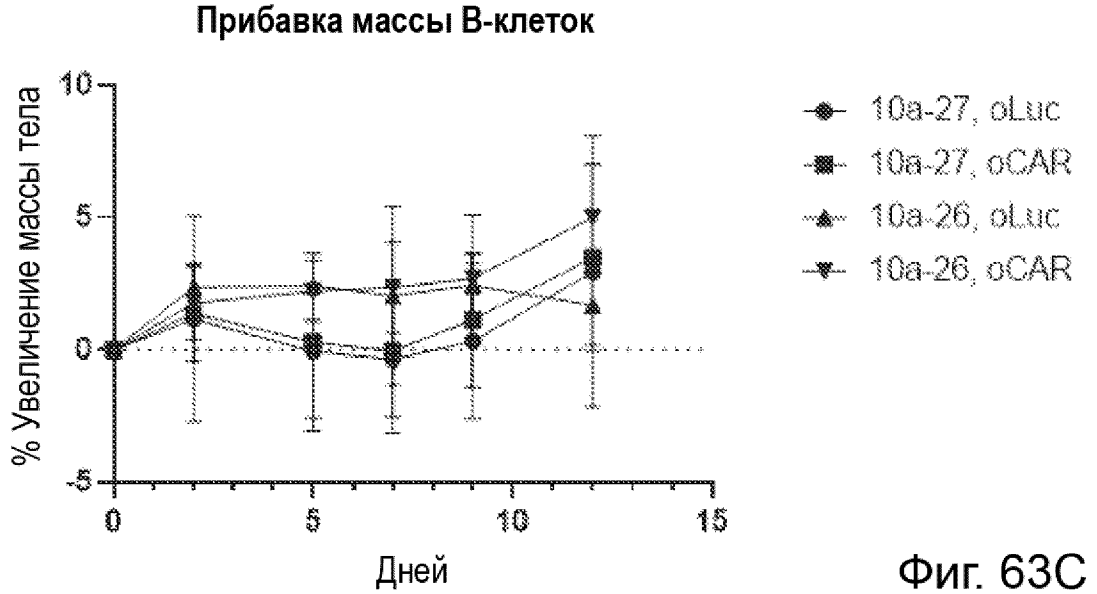
Фиг. 62C



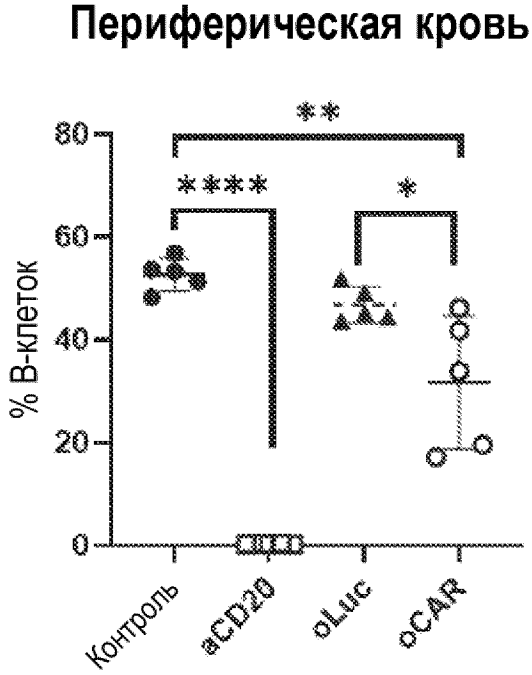
Фиг. 63A



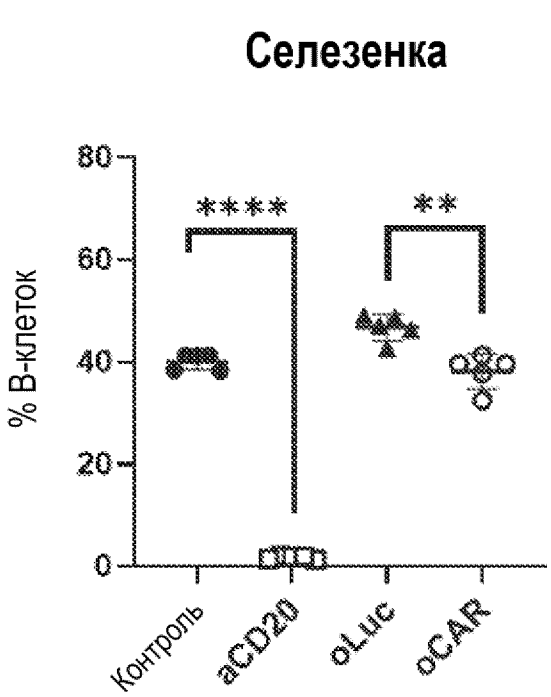
Фиг. 63B



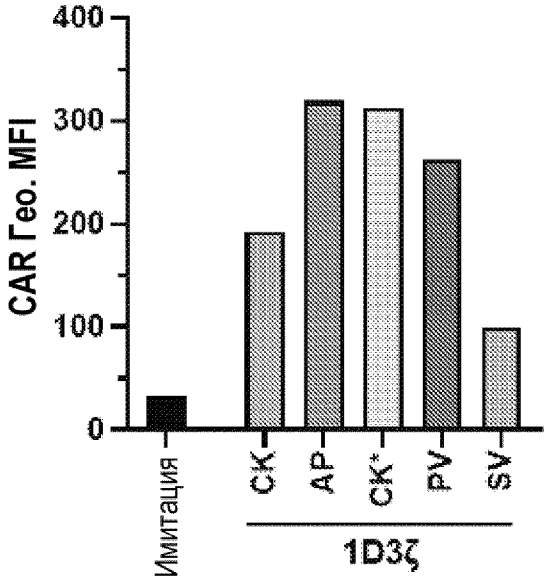
Фиг. 63C



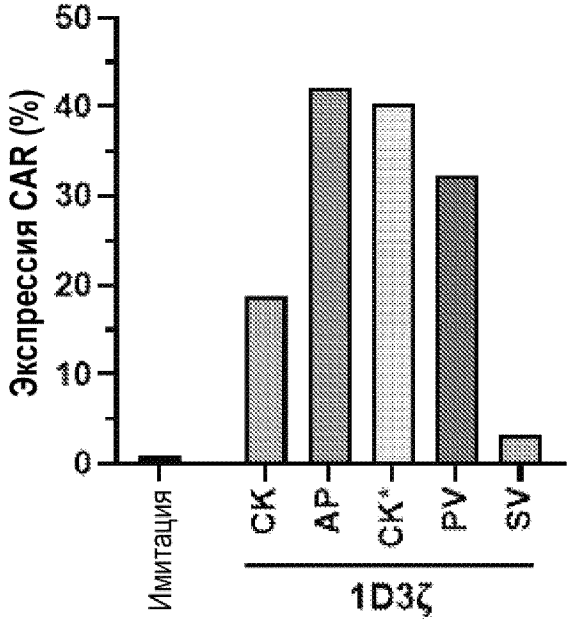
Фиг. 64A



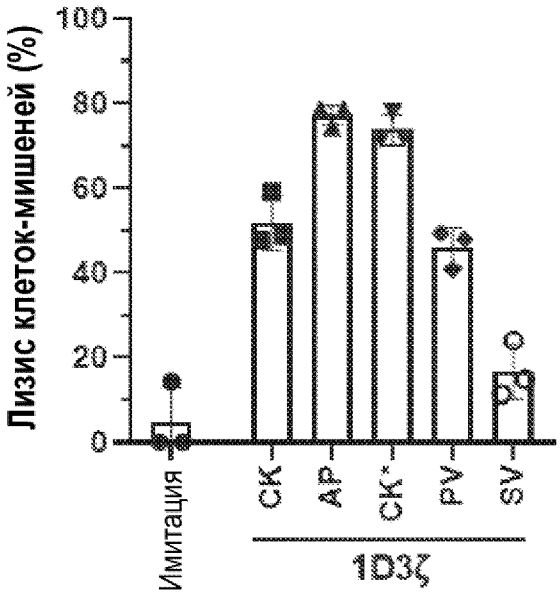
Фиг. 64B



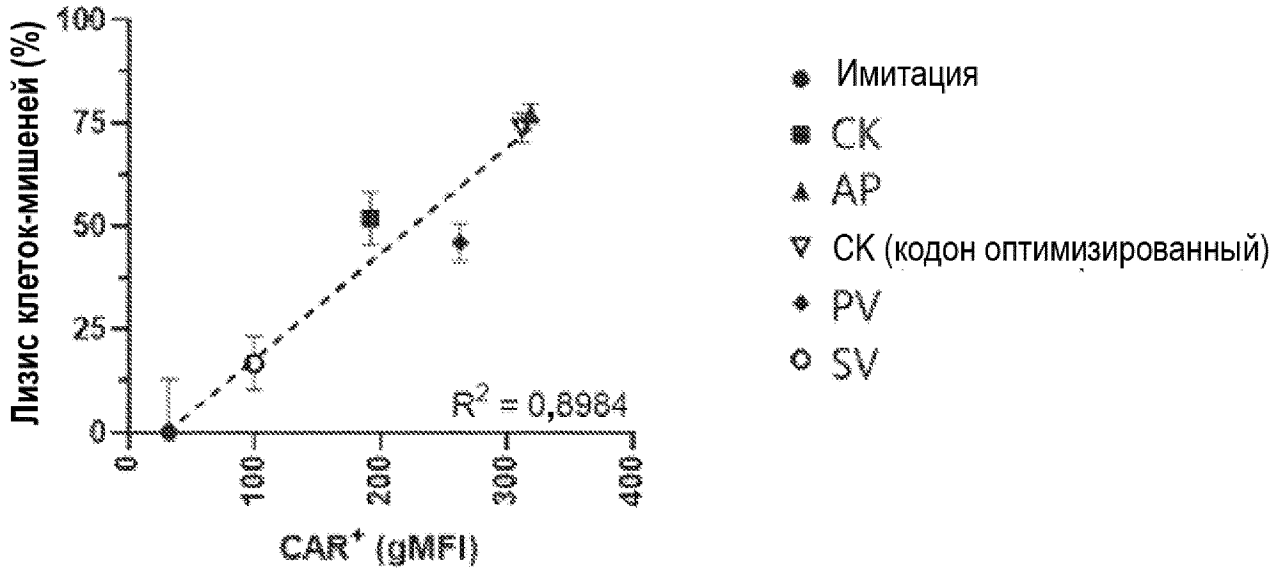
Фиг. 65A



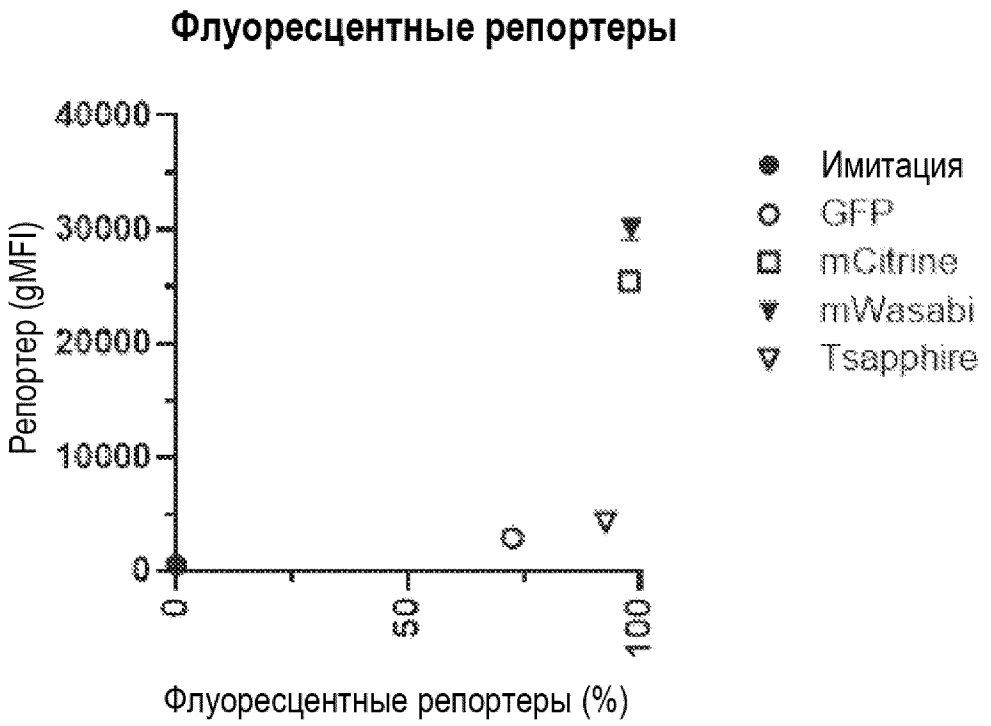
Фиг. 65B



Фиг. 65C


Лизис клеток-мишеней (%)
100
75
50
25
0
0
100
200
300
400
CAR+ (gMFI)
R2 = 0,8984
Имитация
CK
AP
CK (кодон оптимизированный)
PV
SV

Фиг. 66

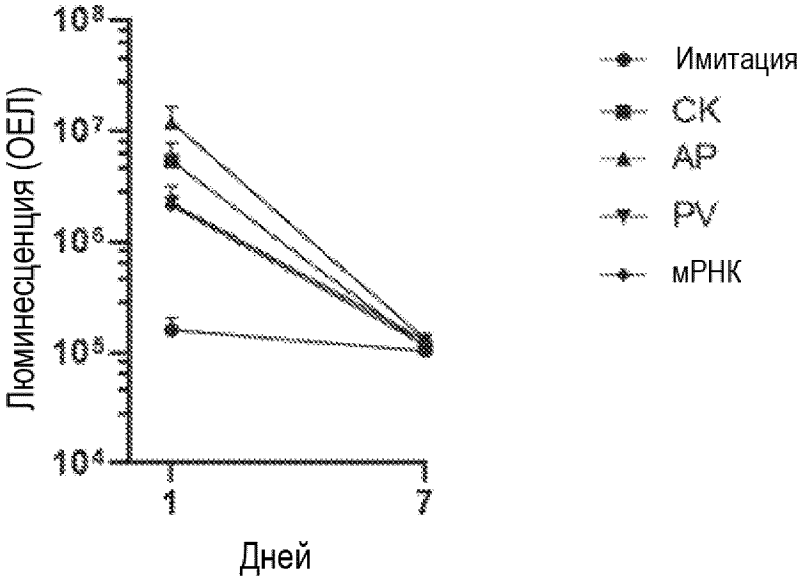


Фиг. 67A



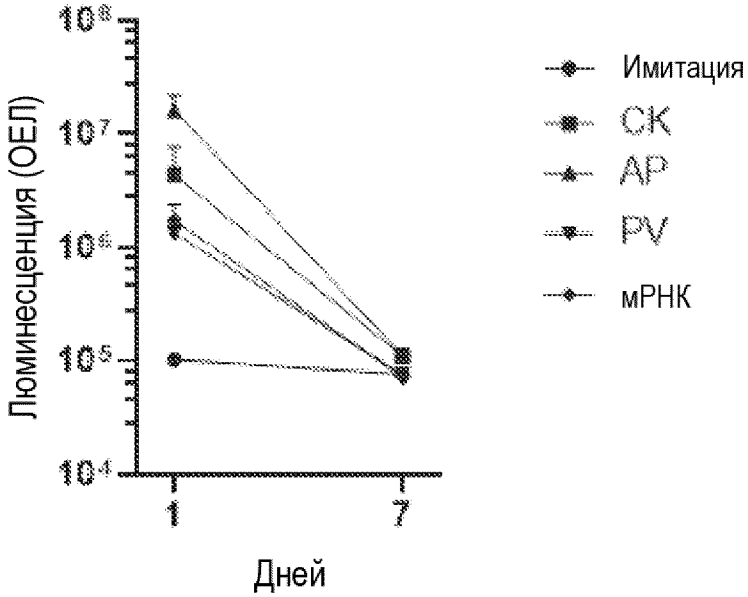
Фиг. 67B

Донор A

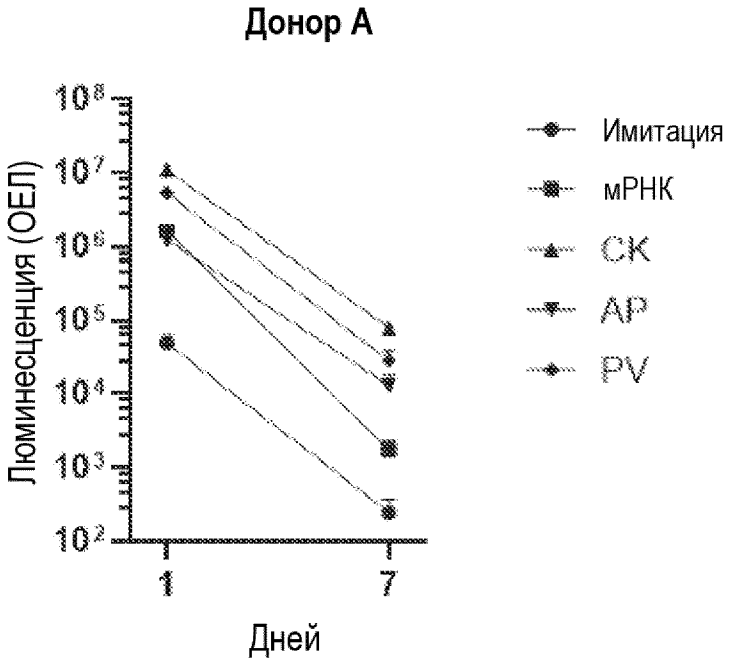


Фиг. 68A

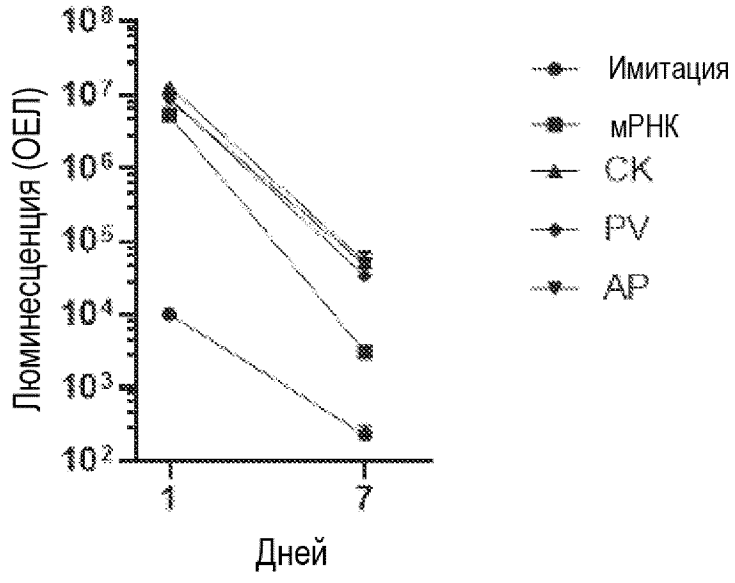
Донор B



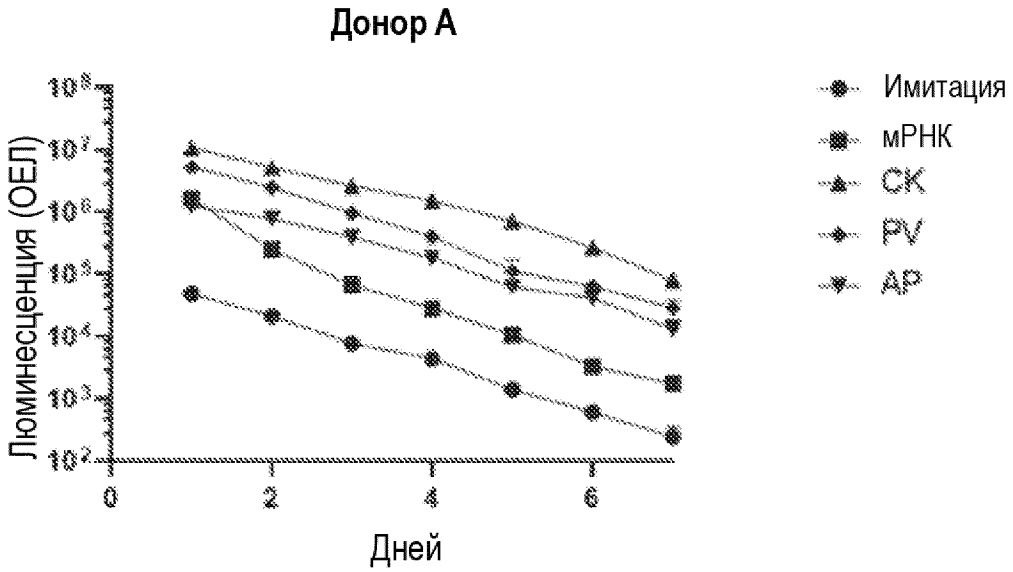
Фиг. 68B



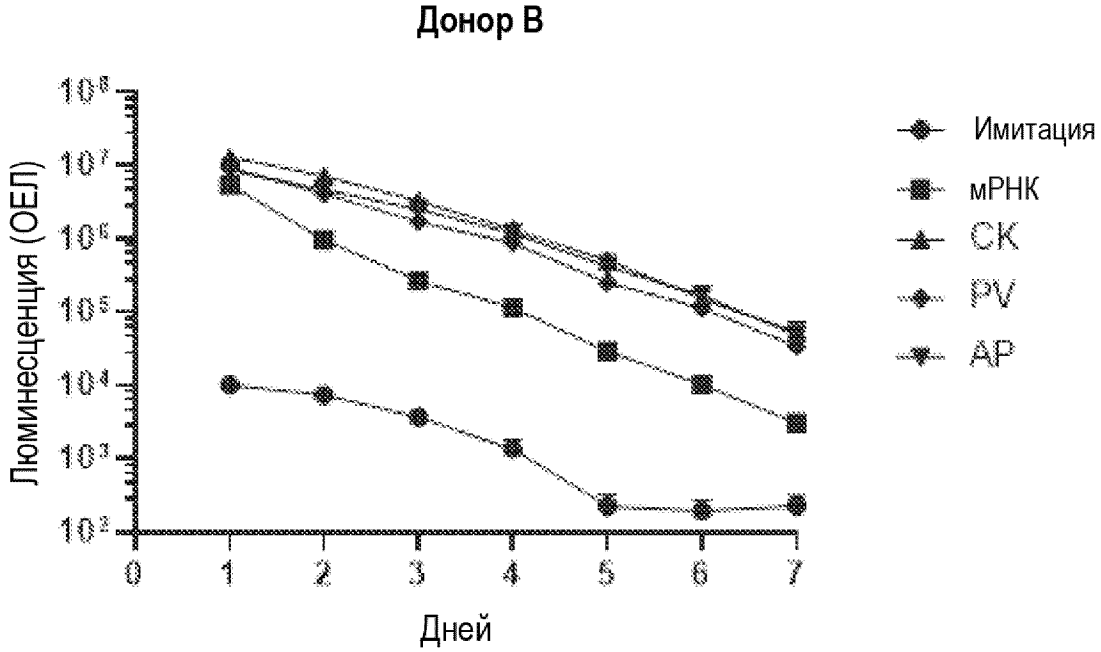
Фиг. 68C



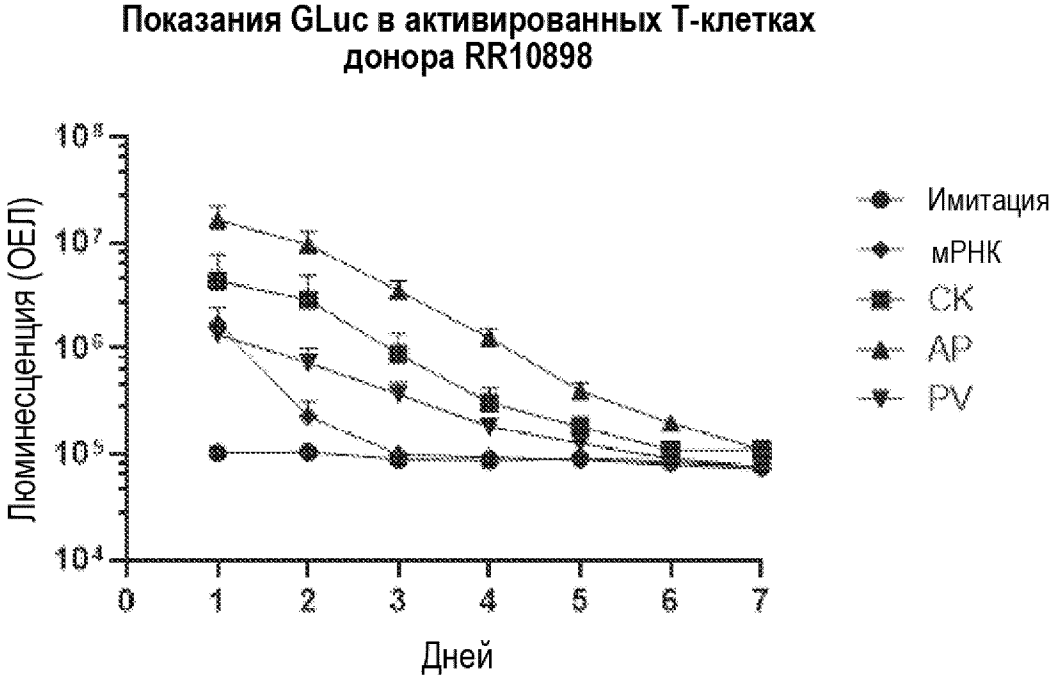
Фиг. 68D



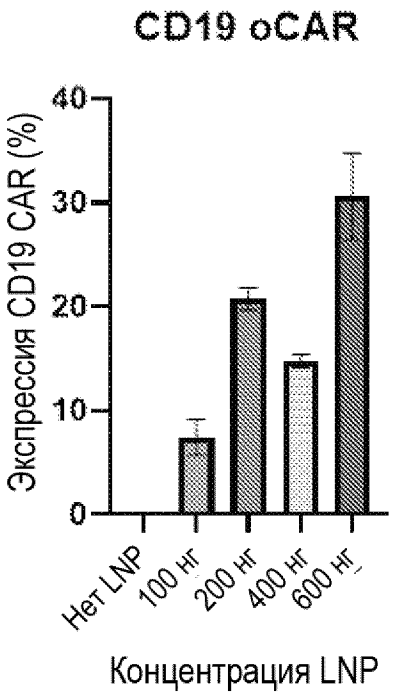
Фиг. 68E



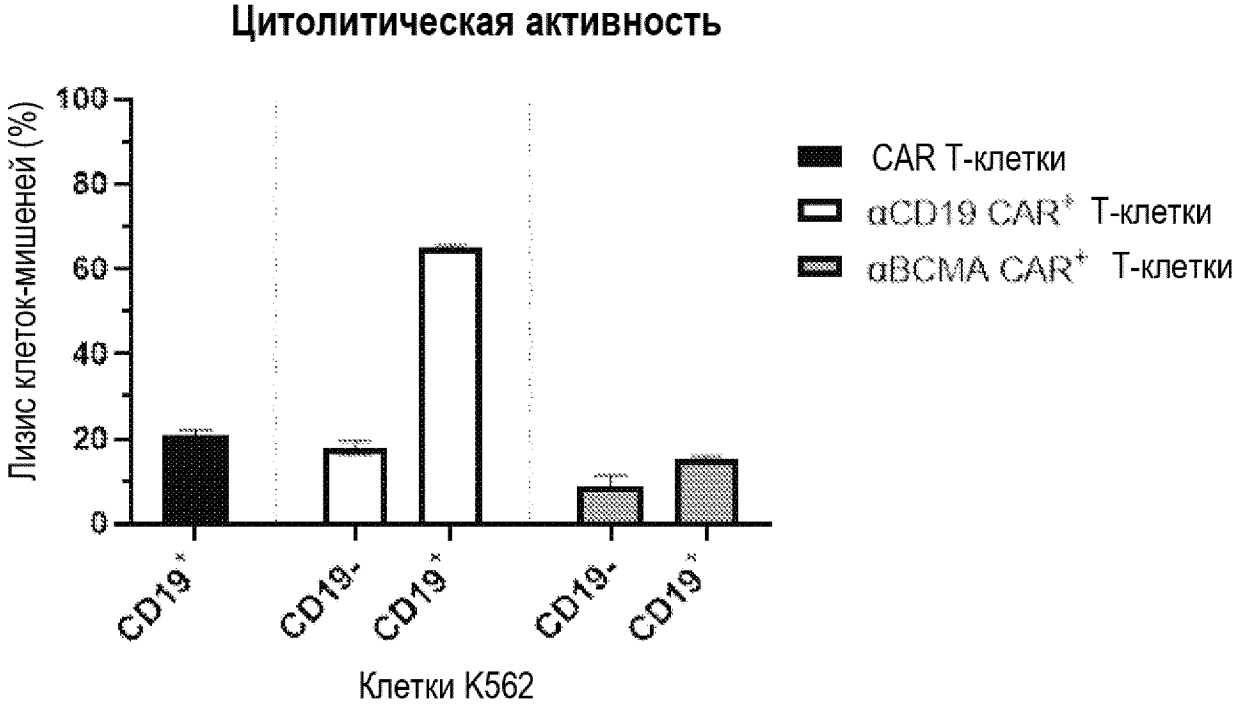
Фиг. 68F


Показания GLuc в активированных Т-клетках
донора RR10898
Люминесценция (ОЕЛ)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
0
1
2
3
4
5
6
7
Дней
Имитация
мРНК
СК
АР
PV

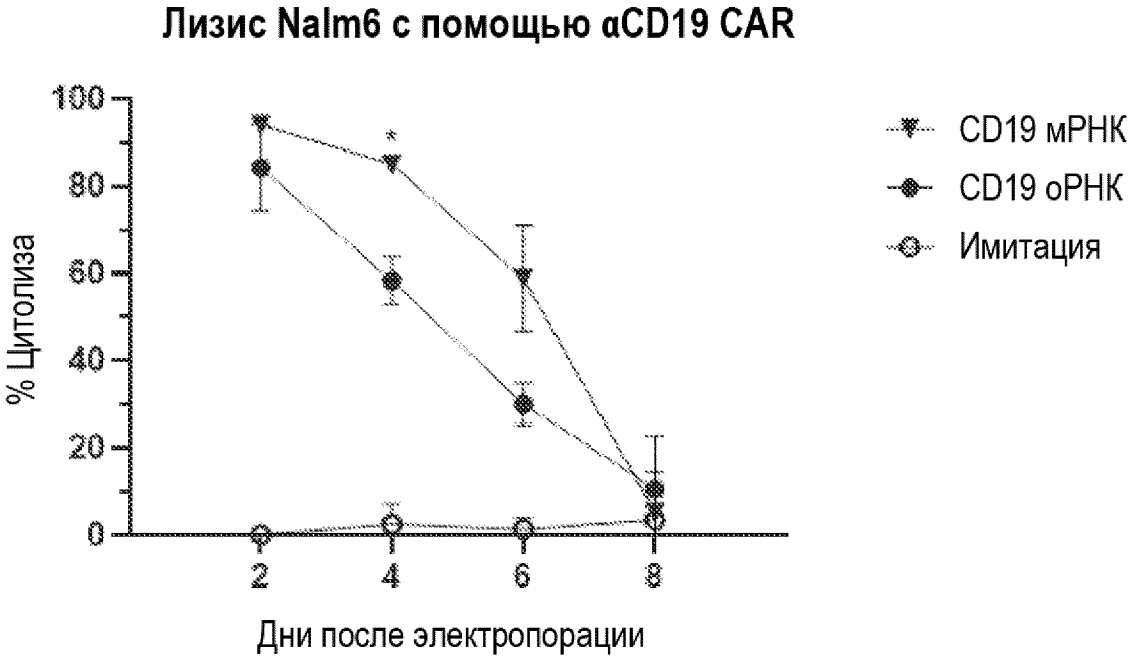
Фиг. 68G



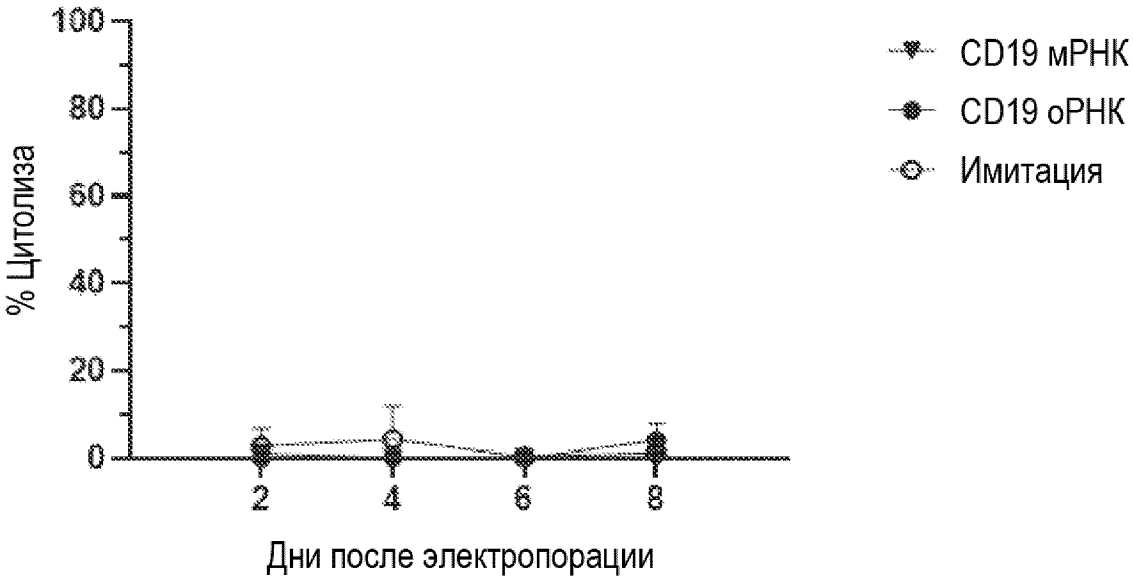
Фиг. 69A



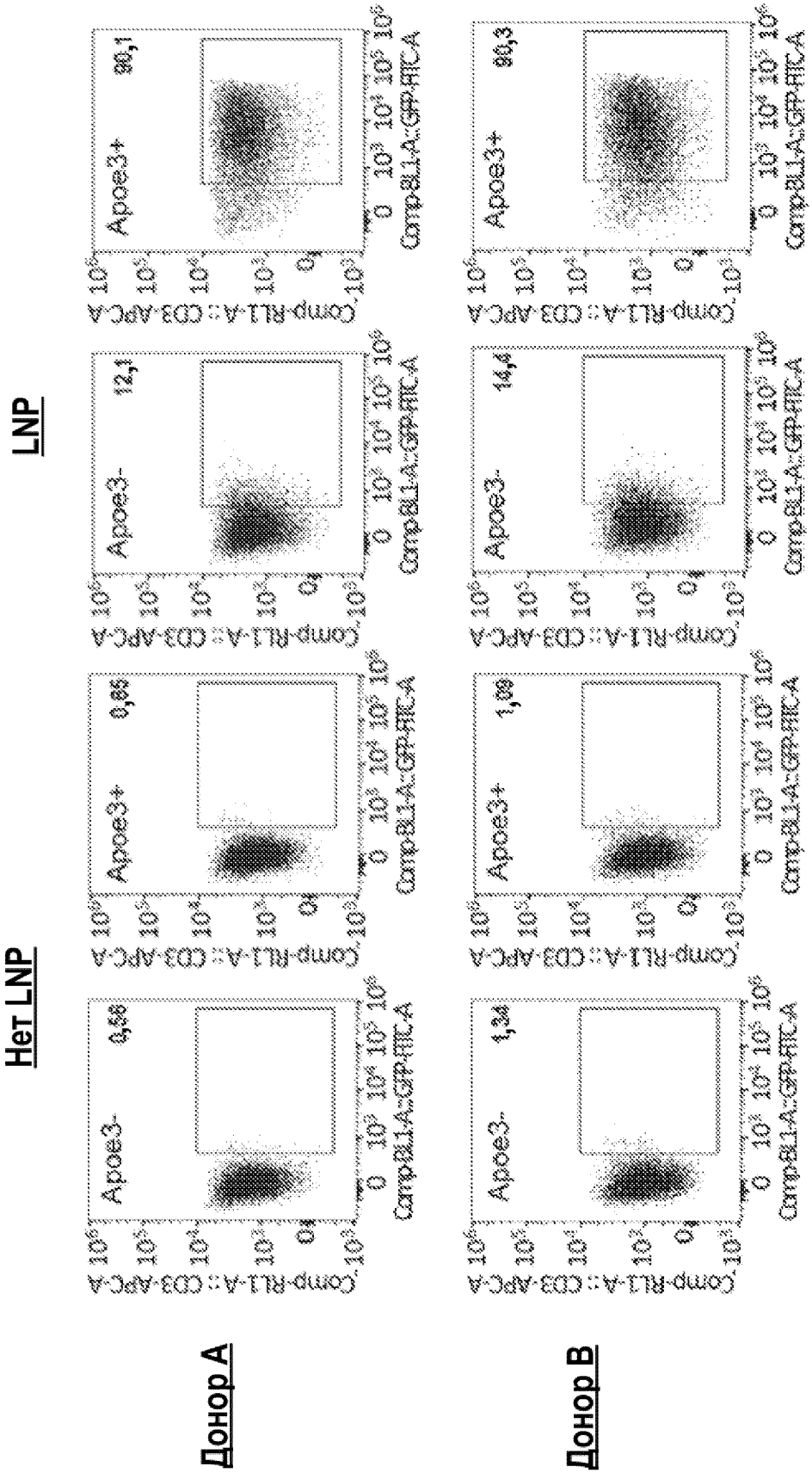
Фиг. 69B



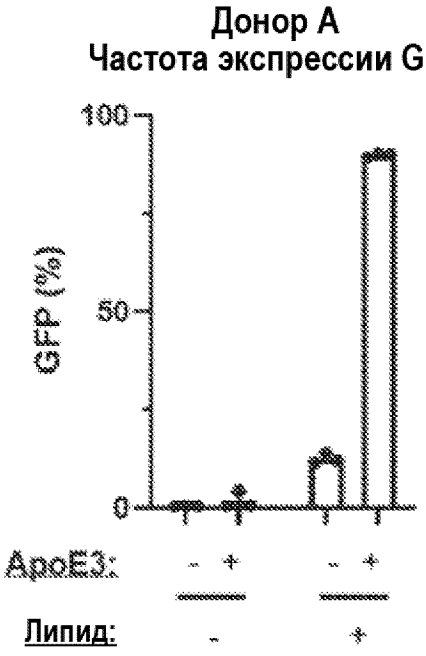
Фиг. 70A



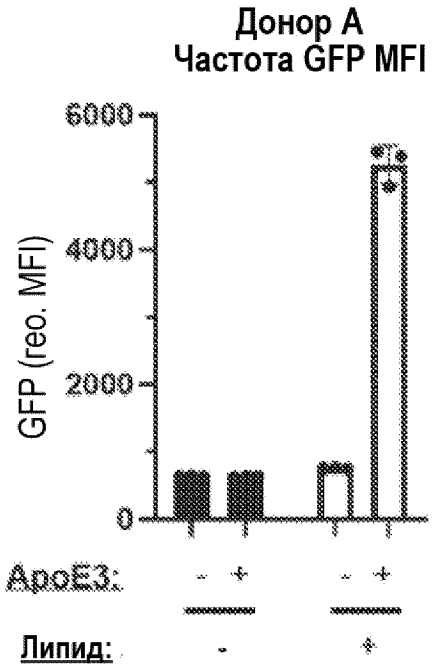
Фиг. 70B


Нет LNP
LNP
Донор A
Донор B
Apoe3-
Apoe3+
0,58
0,85
1,34
1,09
12,1
14,4
80,1
80,3
Comp-RL1-A :: CD3-APC-A
Comp-BL1-A :: GFP-FITC-A

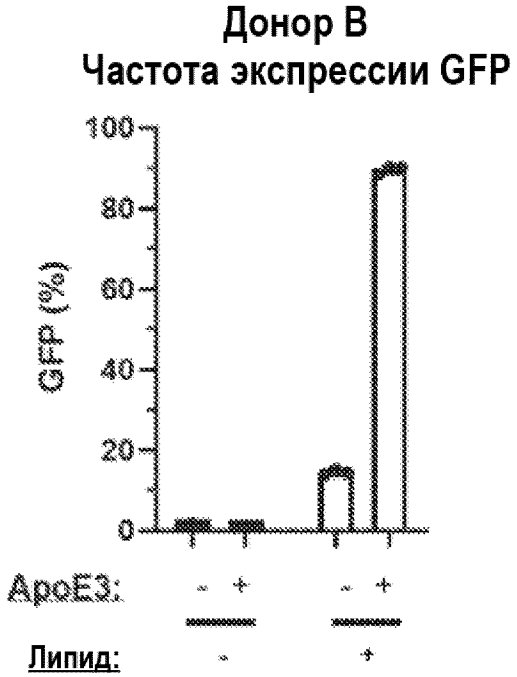
Фиг. 71A



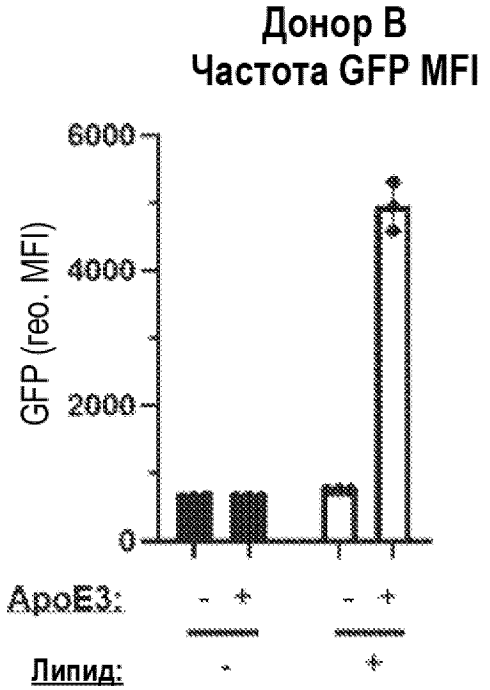
Фиг. 71B



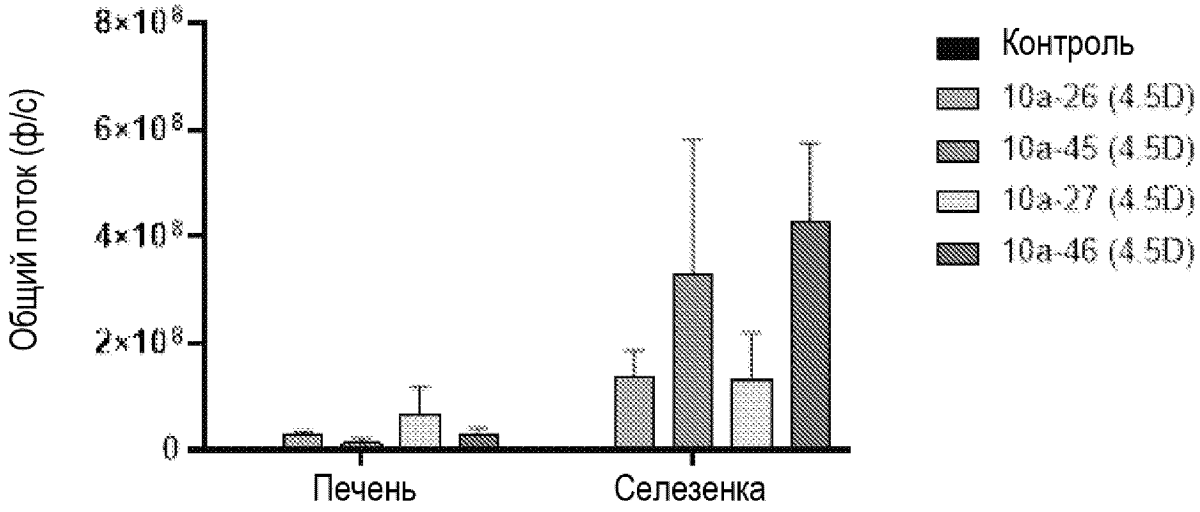
Фиг. 71C



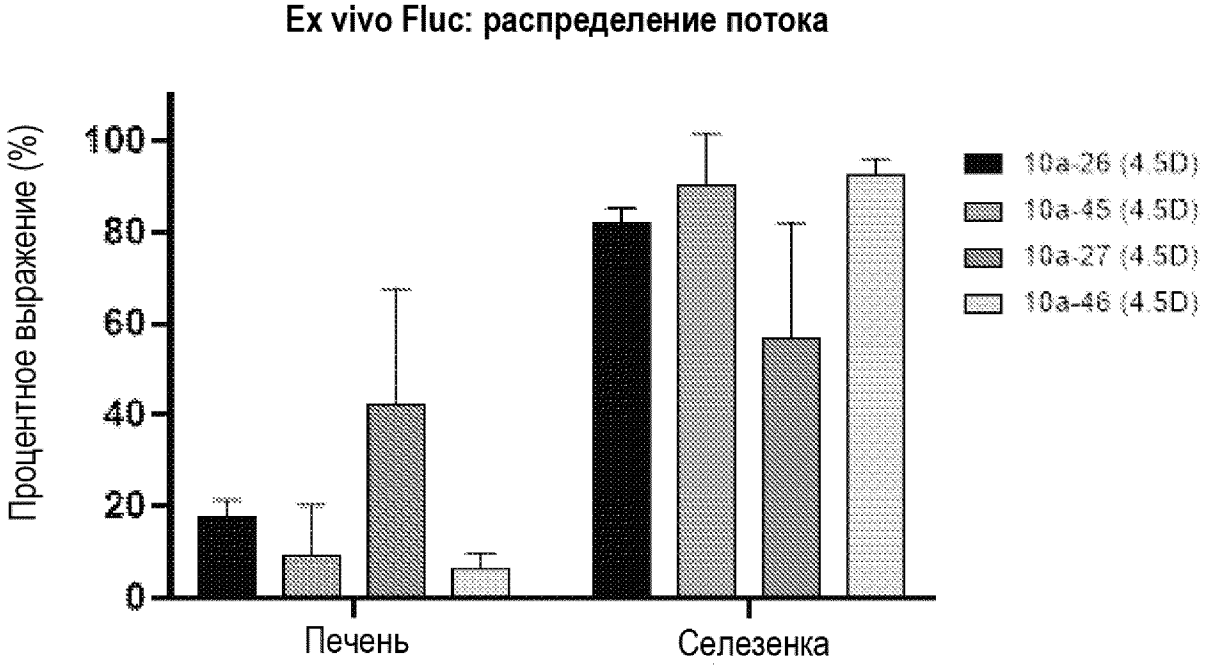
Фиг. 71D



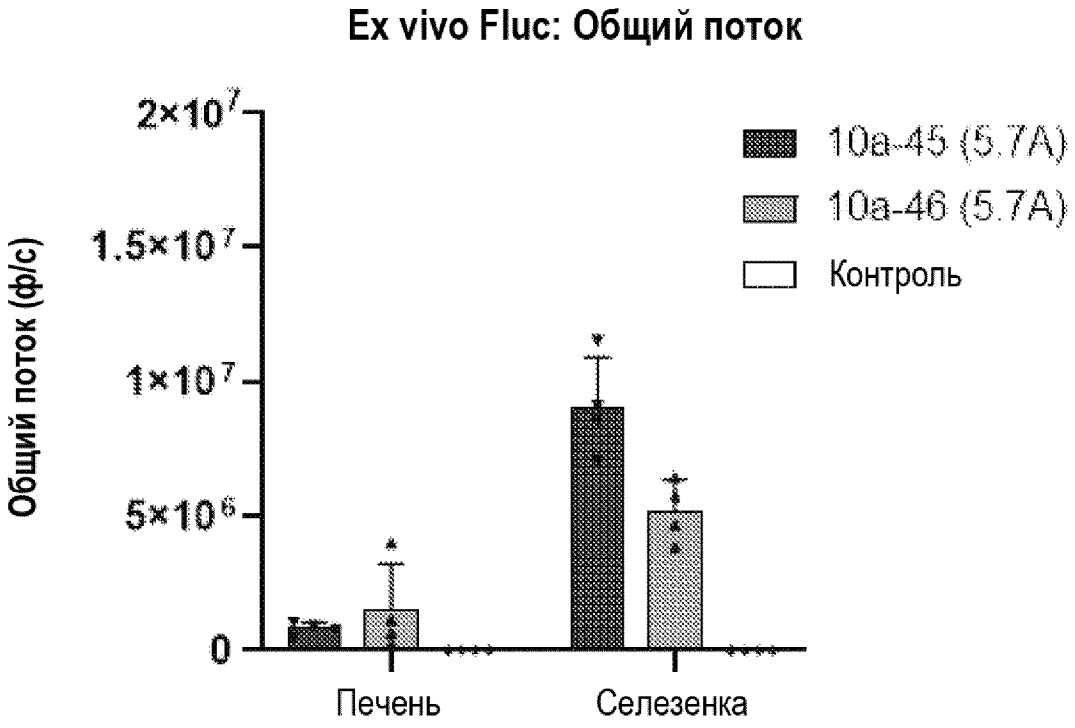
Фиг. 71E



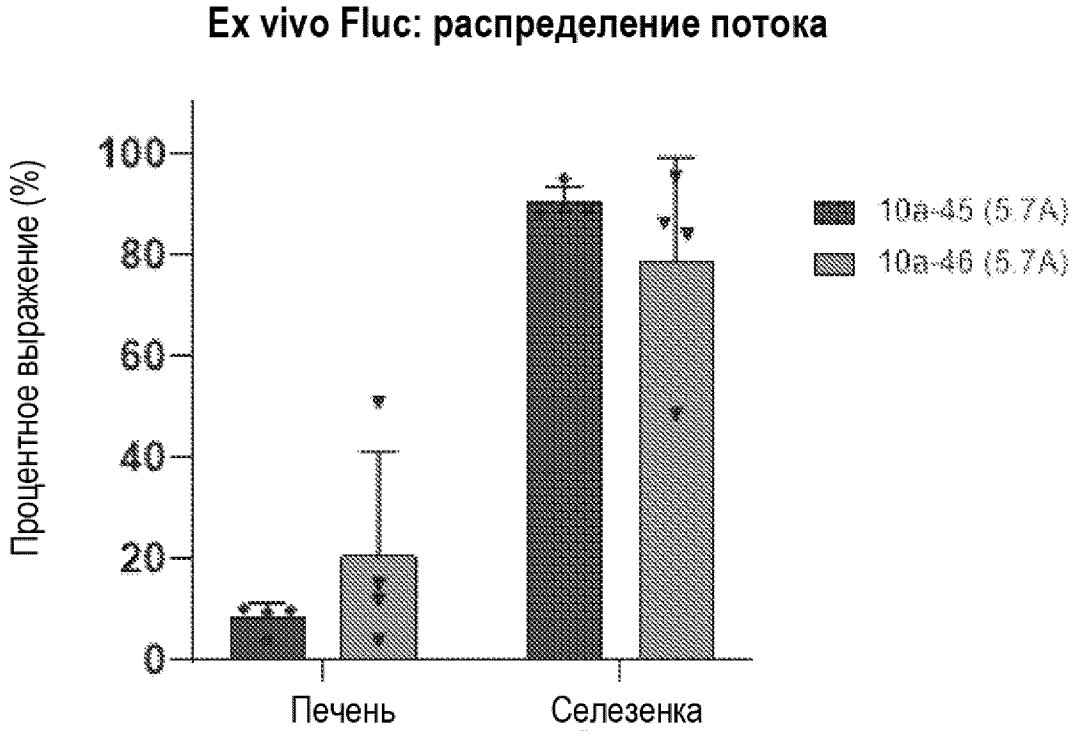
Фиг. 72A



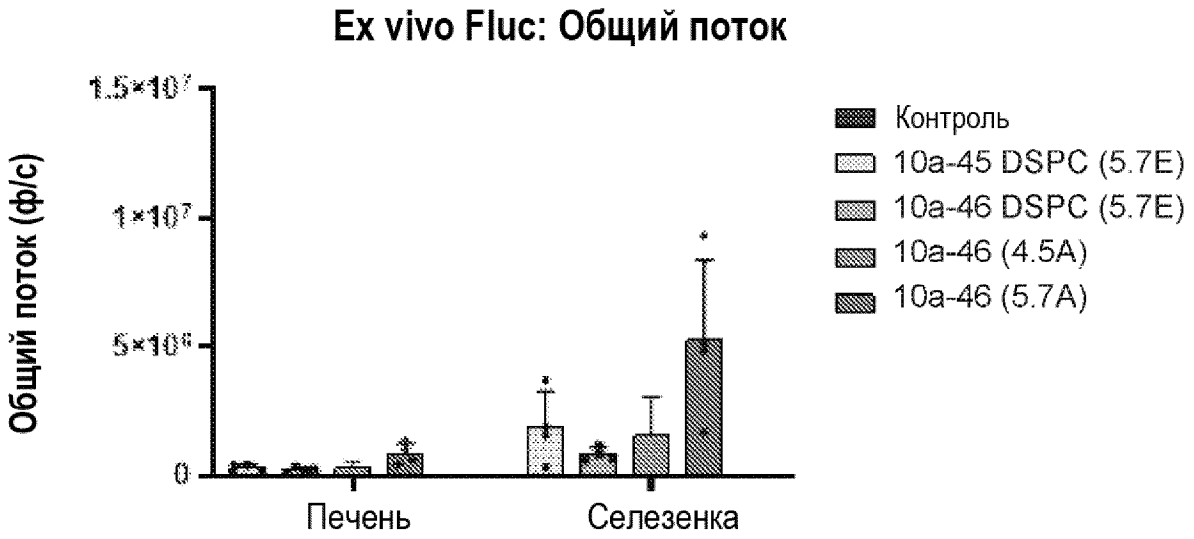
Фиг. 72B



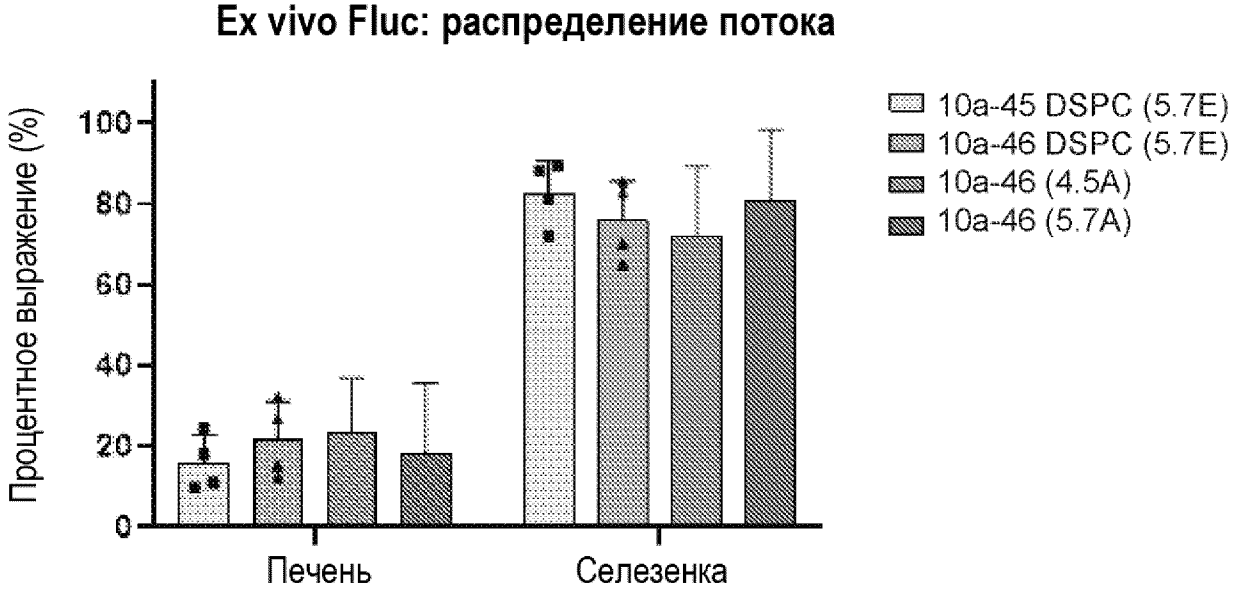
Фиг. 72C



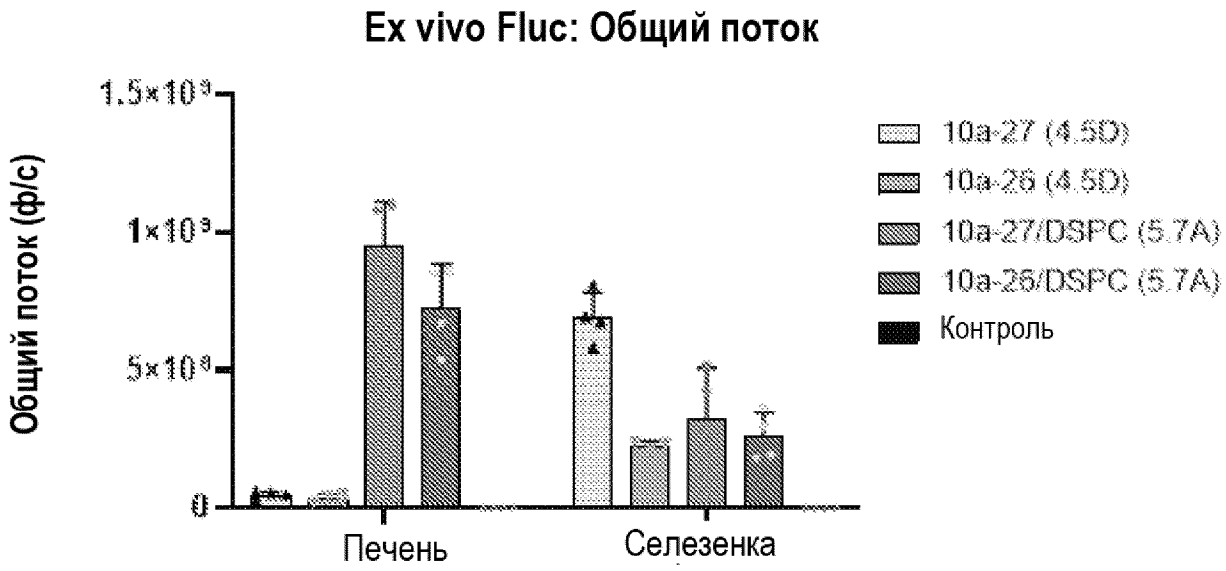
Фиг. 72D



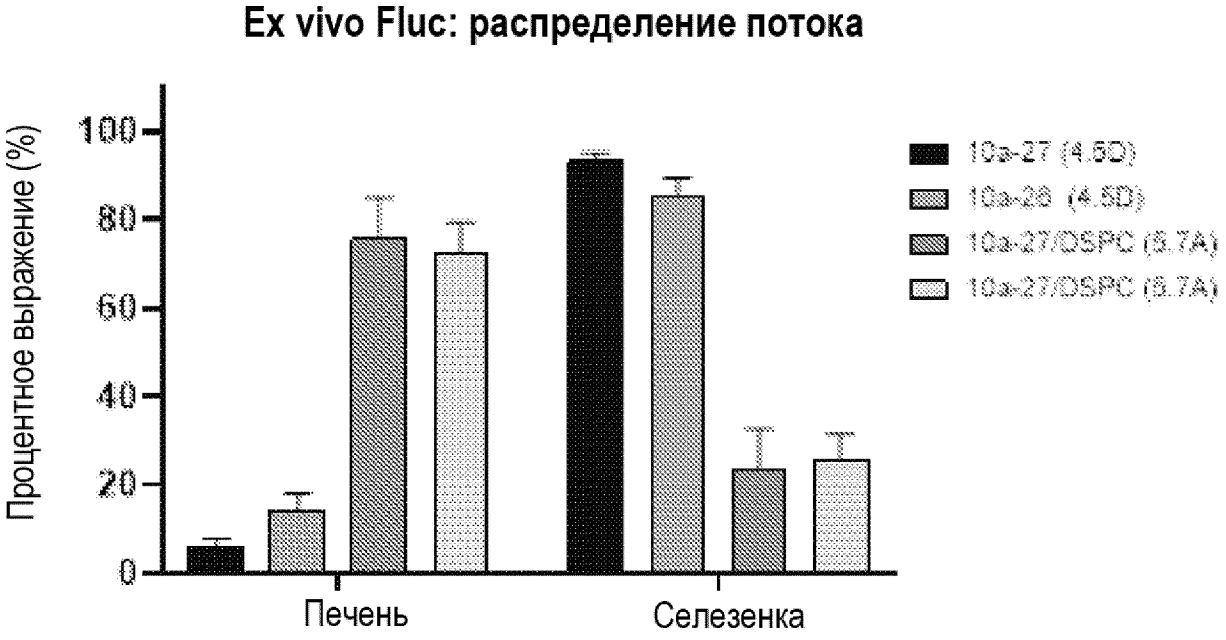
Фиг. 72E



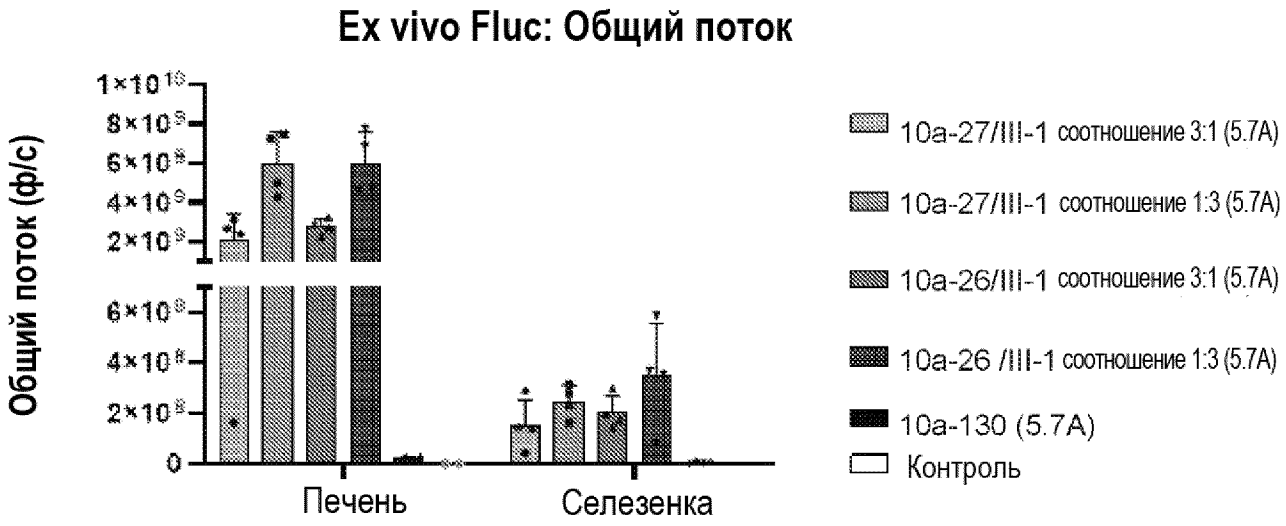
Фиг. 72F



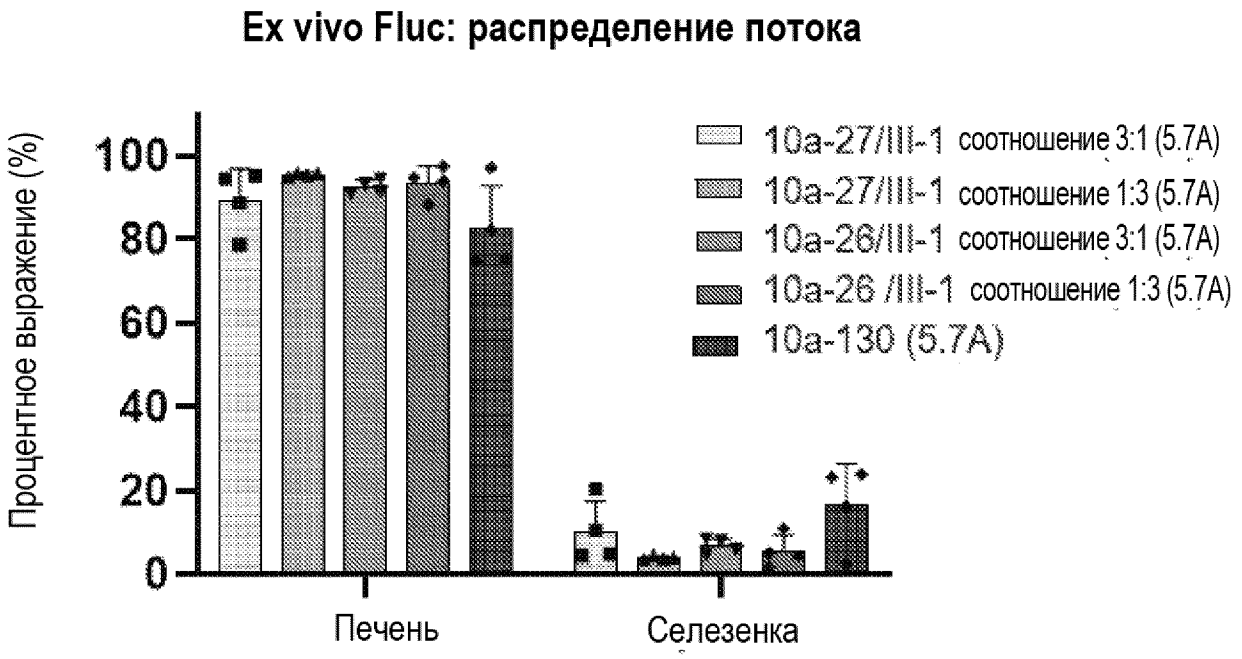
Фиг. 72G



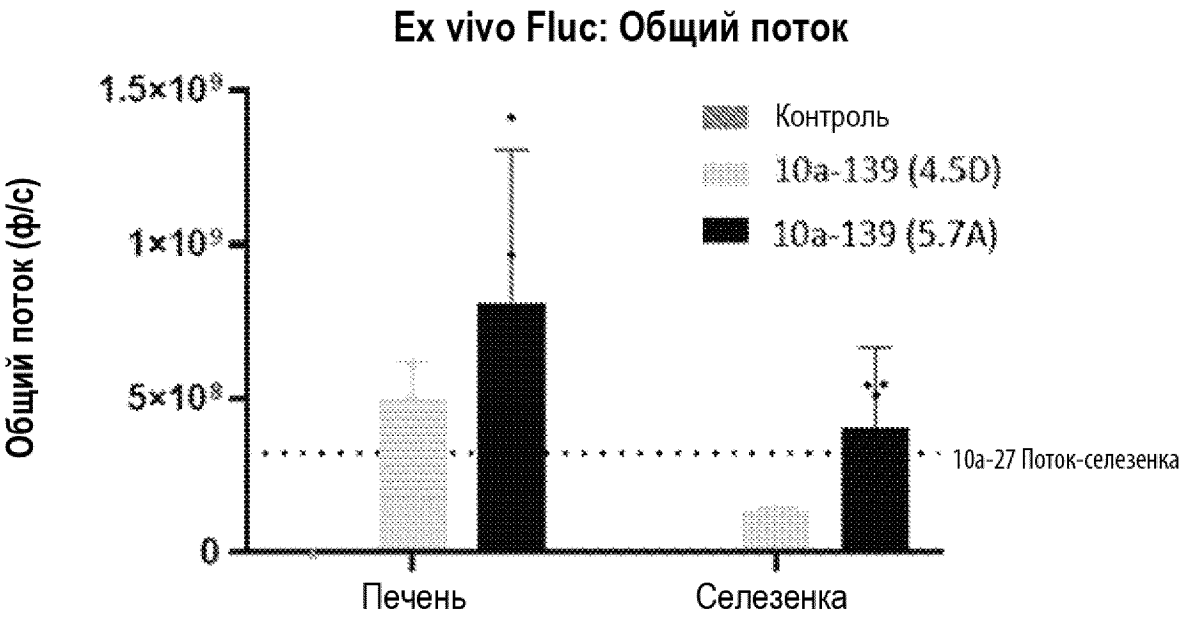
Фиг. 72H



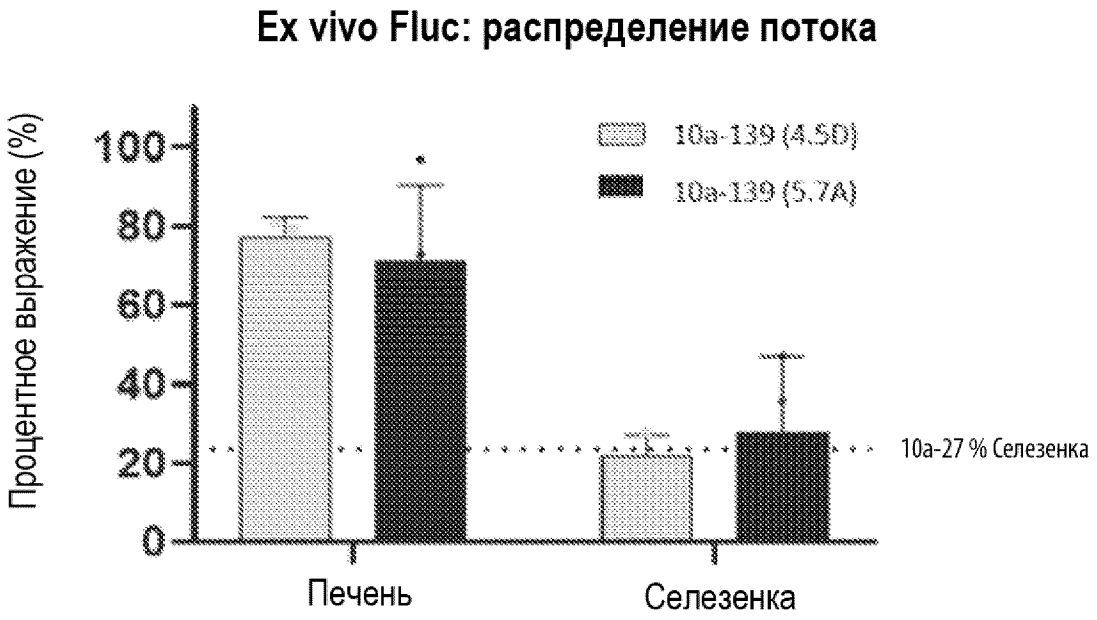
Фиг. 72I



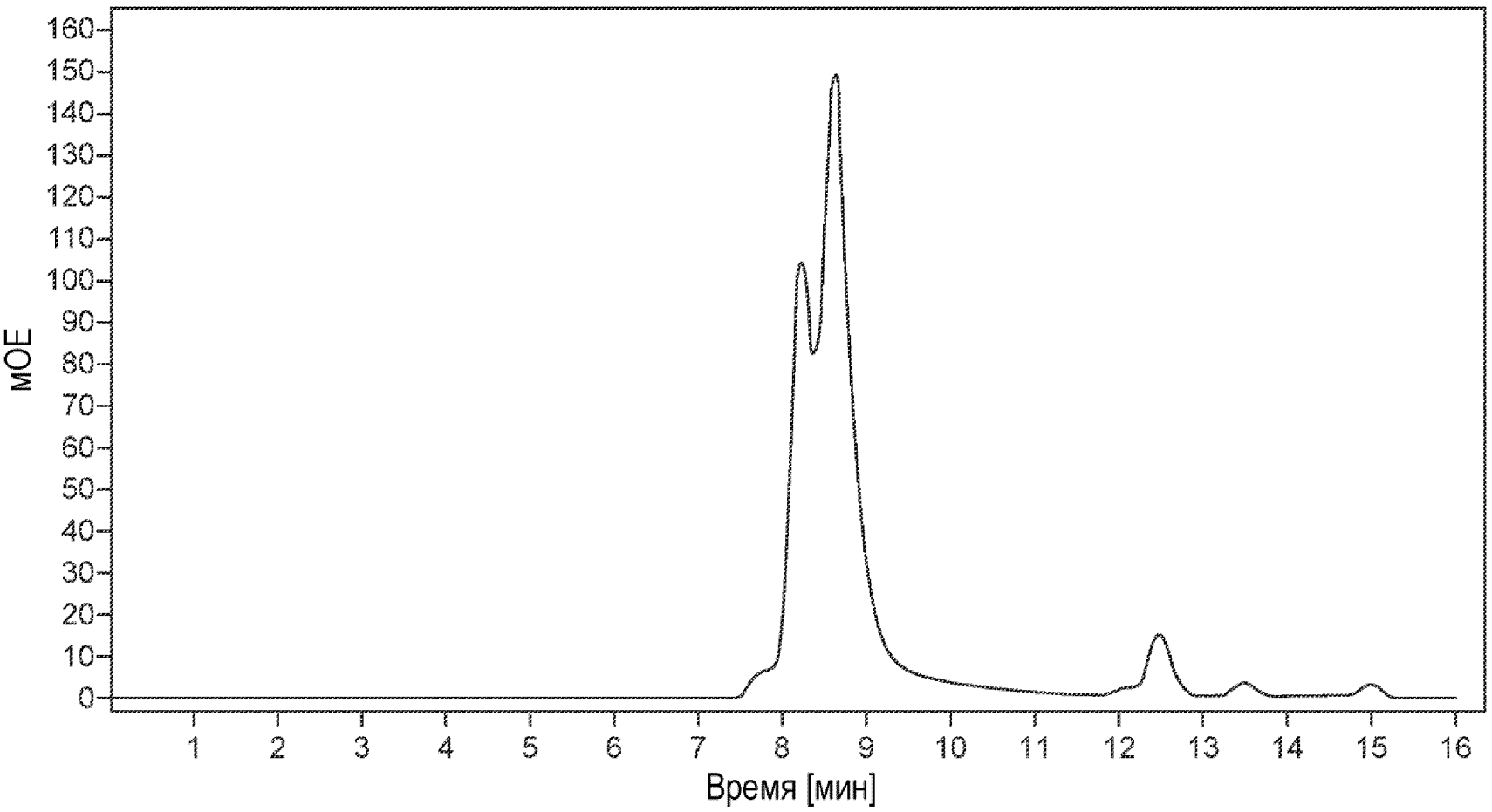
Фиг. 72J



Фиг. 72K



Фиг. 72L


мОЕ
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
Время [мин]

Фиг. 73A

Имитация
Гисто
Спайковый белок
СК-Orna 1
Спайк
Гисто
Спайковый белок
СК-Orna 2
Спайк
Гисто
Спайковый белок

Фиг. 73B

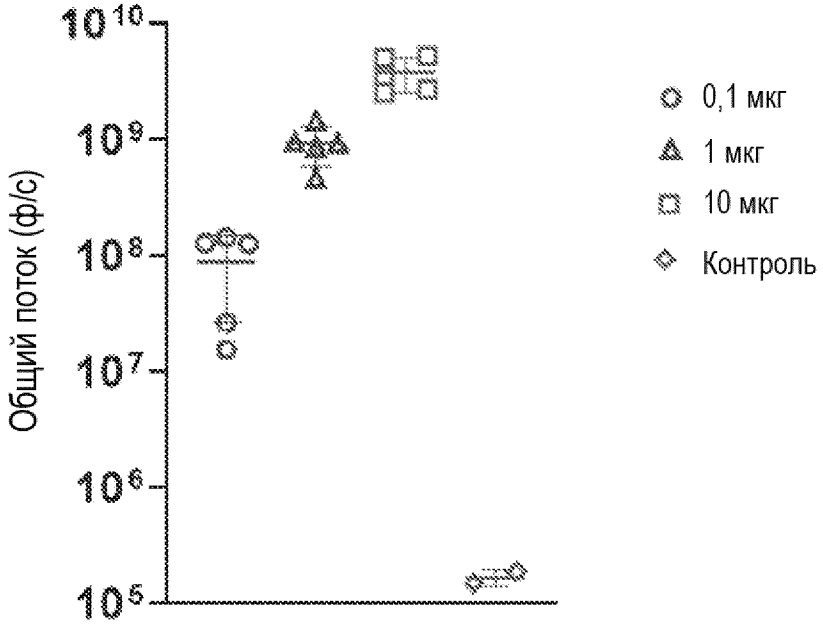
Имитация
СК-Ома 1
Спайк
СК-Ома 2
Спайк
Неокрашенный
Окрашенный
0,17
0,15
0,093
0,67
92,0
95,3
SSC
Спайковый белок

Фиг. 73C

Цитокиновый ответ in vivo
Белок (пг/мл)
600
400
200
60
40
20
0
IL-1β
IL-6
IL-10
IL-12p70
RANTES
TNFα
ФСБ
кольцРНК
m1Ψ-мРНК
3р-кольцРНК

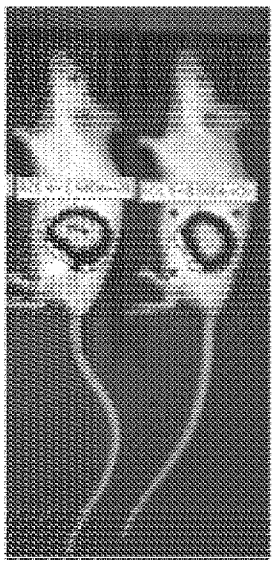
Фиг. 74

Живой поток всего тела через 6 часов после внутримышечной инъекции

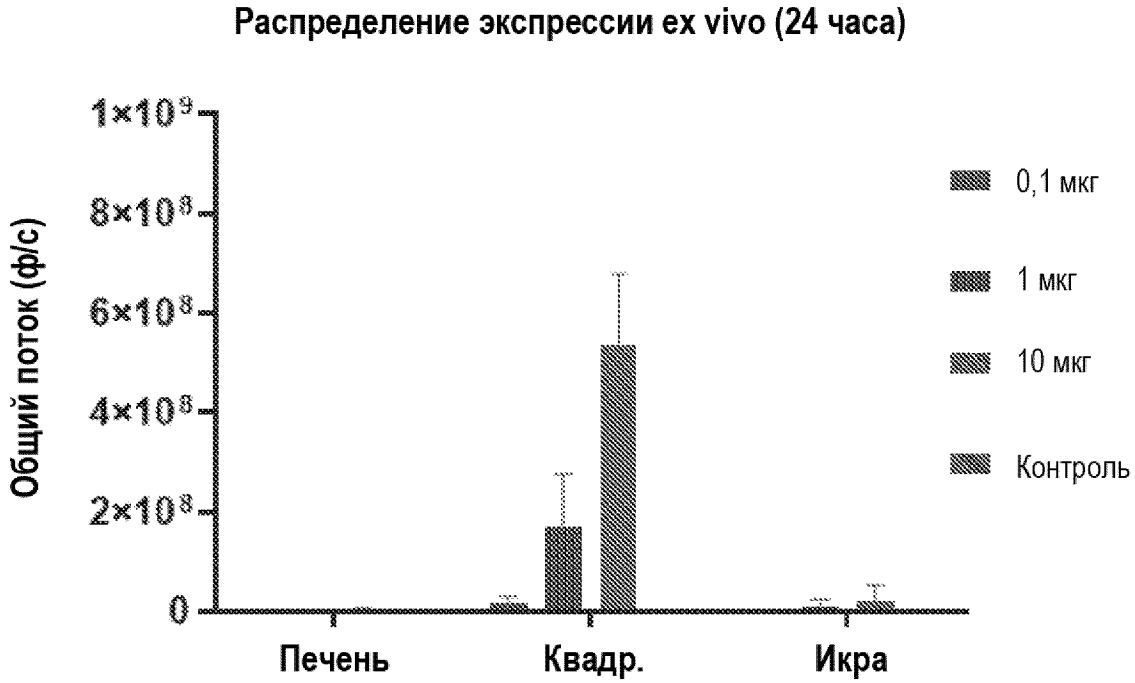


Фиг. 75A

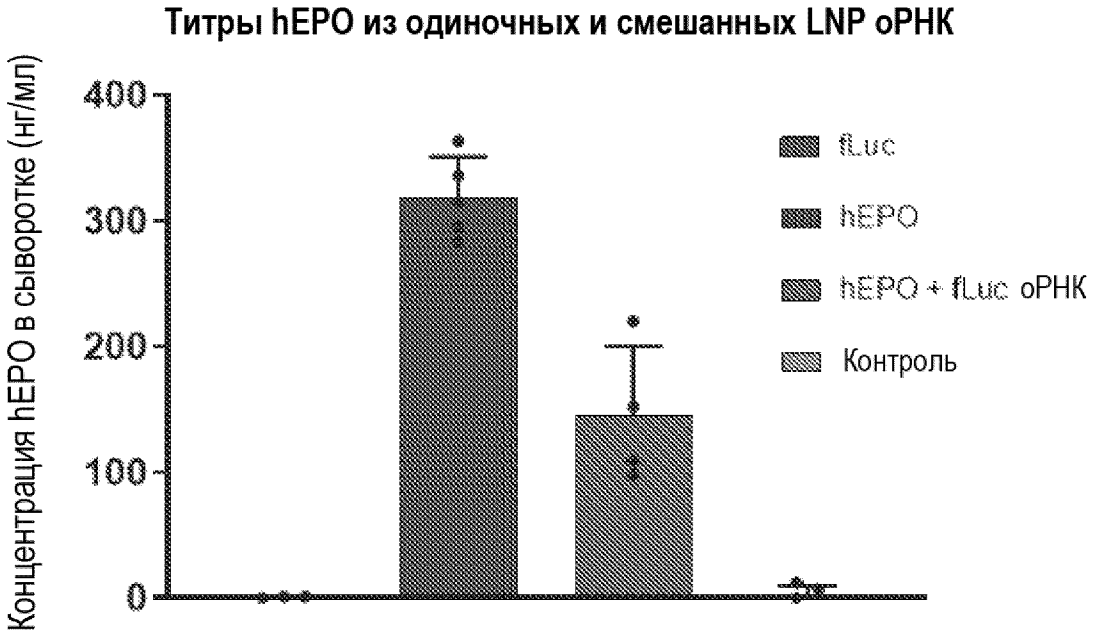
IVIS всего тела: 1 мкг дозы внутримышечно через 6 часов



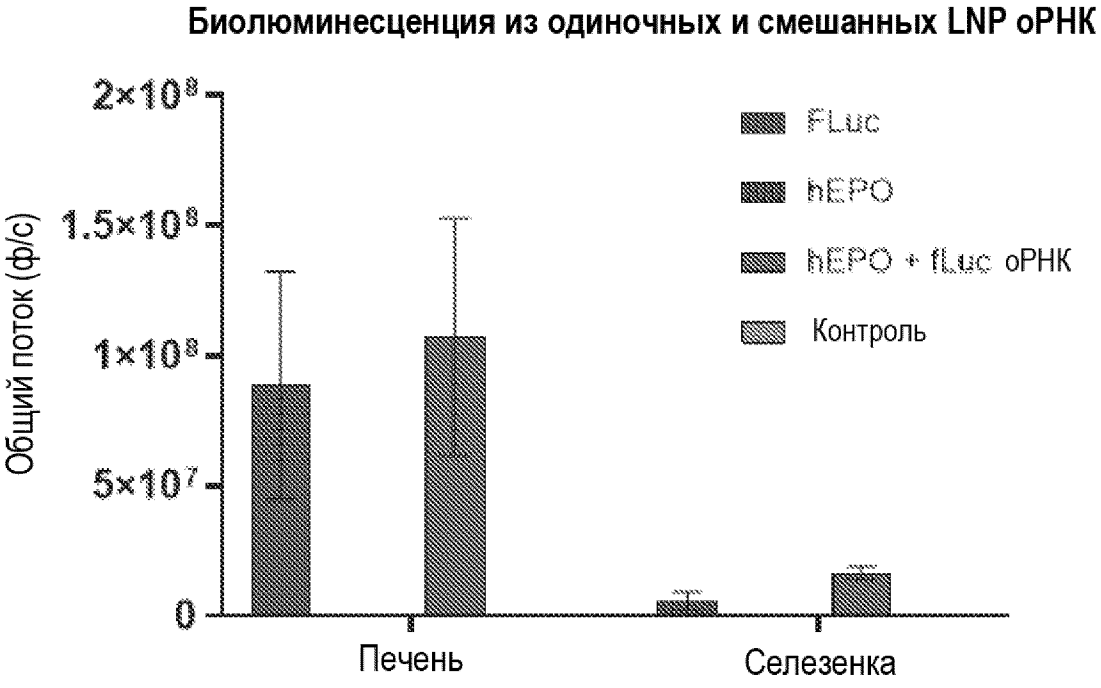
Фиг. 75B


Распределение экспрессии ex vivo (24 часа)
Общий поток (ф/с)
1×10⁹
8×10⁸
6×10⁸
4×10⁸
2×10⁸
0
Печень
Квадр.
Икра
0,1 мкг
1 мкг
10 мкг
Контроль

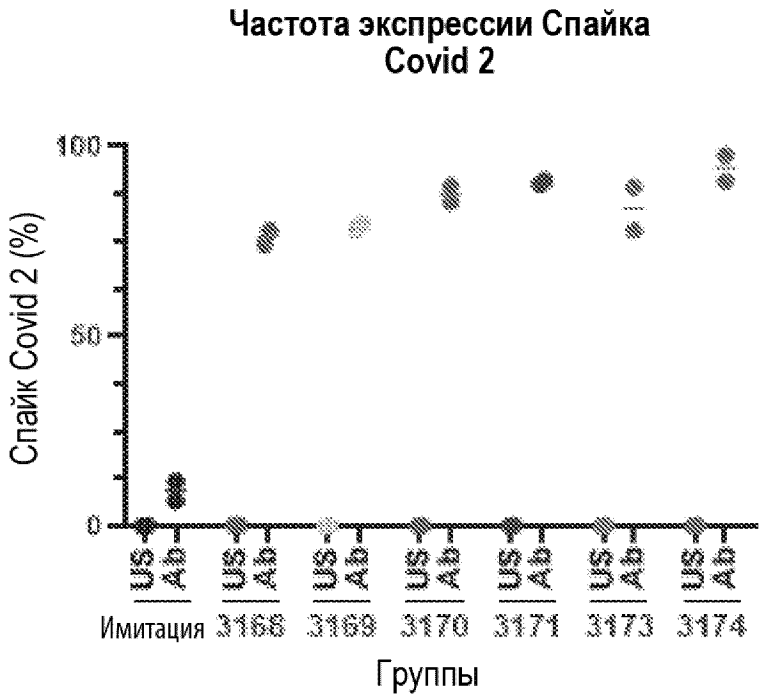
Фиг. 75C



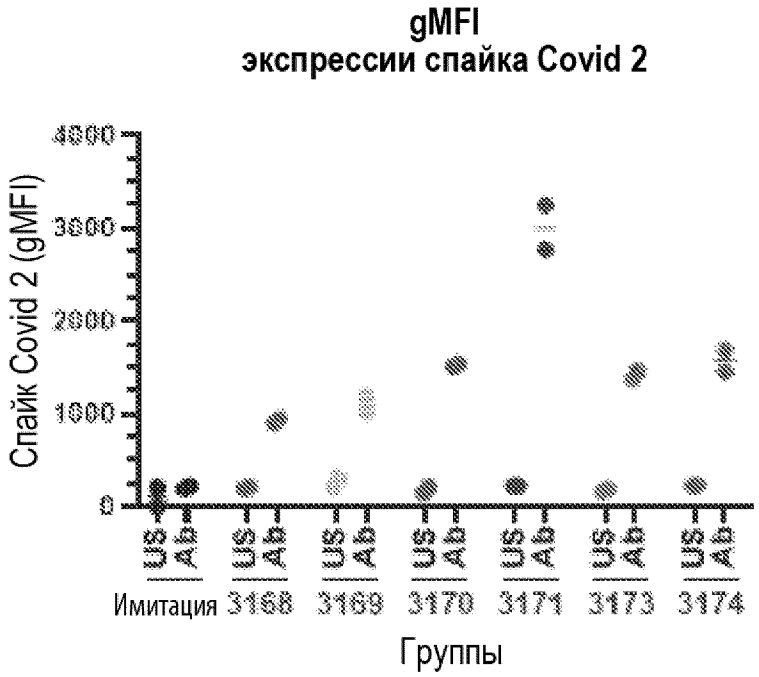
Фиг. 76A



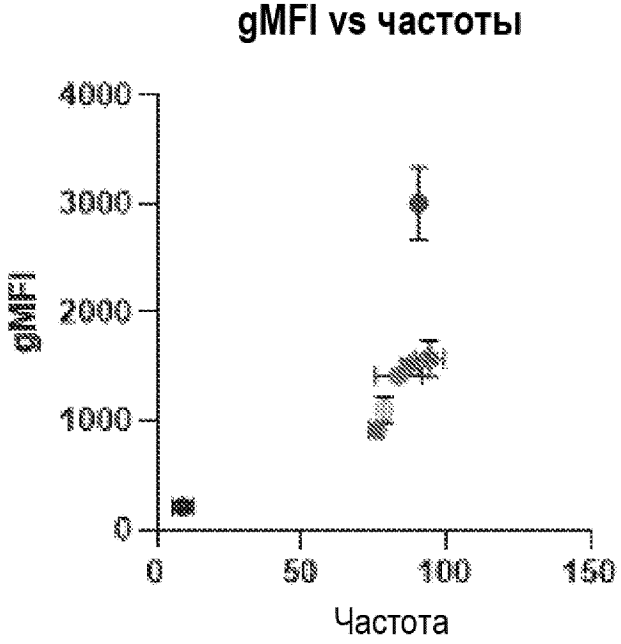
Фиг. 76B



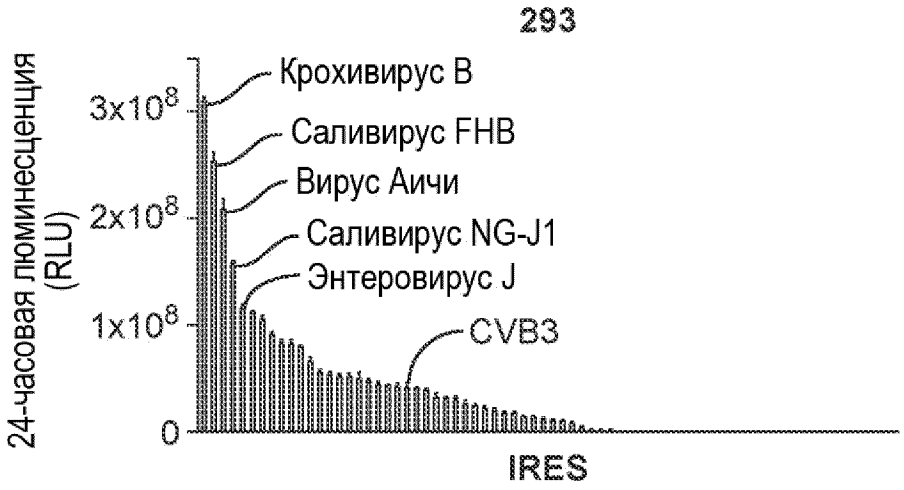
Фиг. 77A



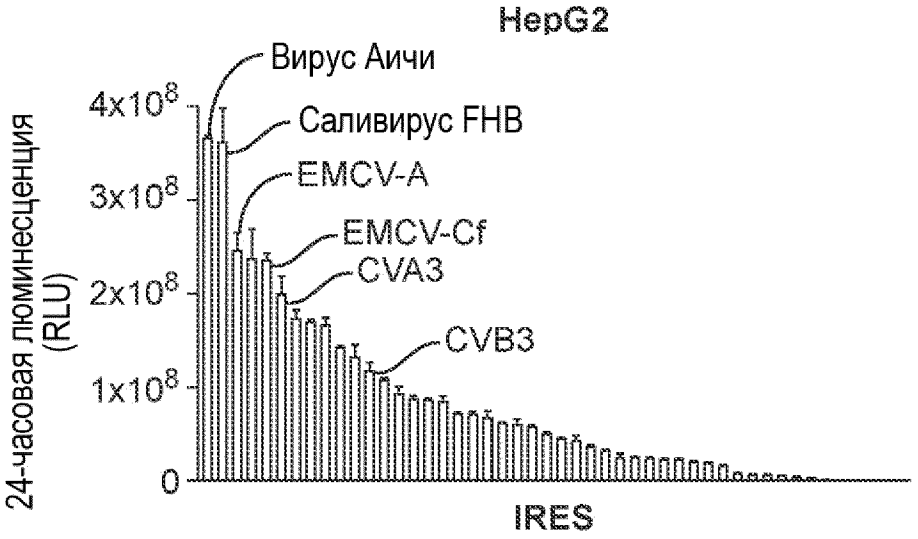
Фиг. 77B


gMFI vs частоты
4000
3000
2000
1000
0
gMFI
0
50
100
150
Частота

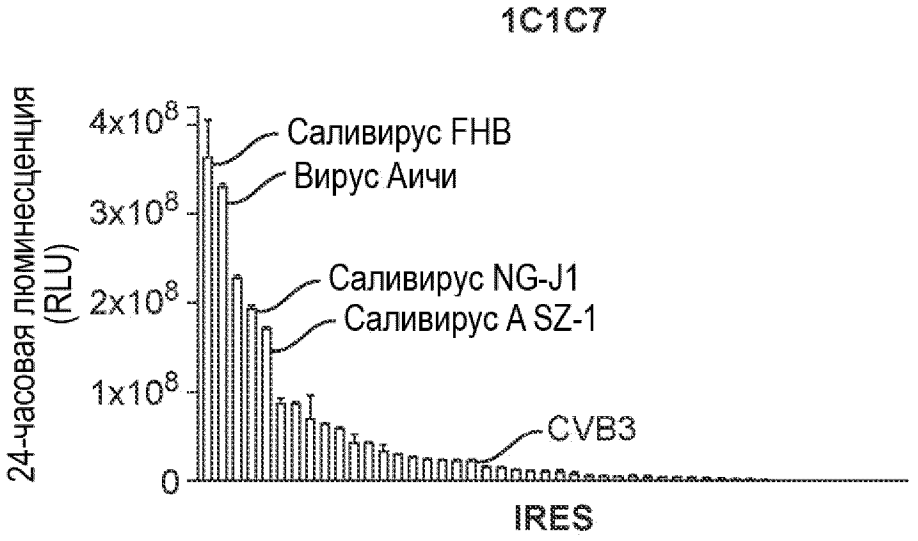
Фиг. 77C



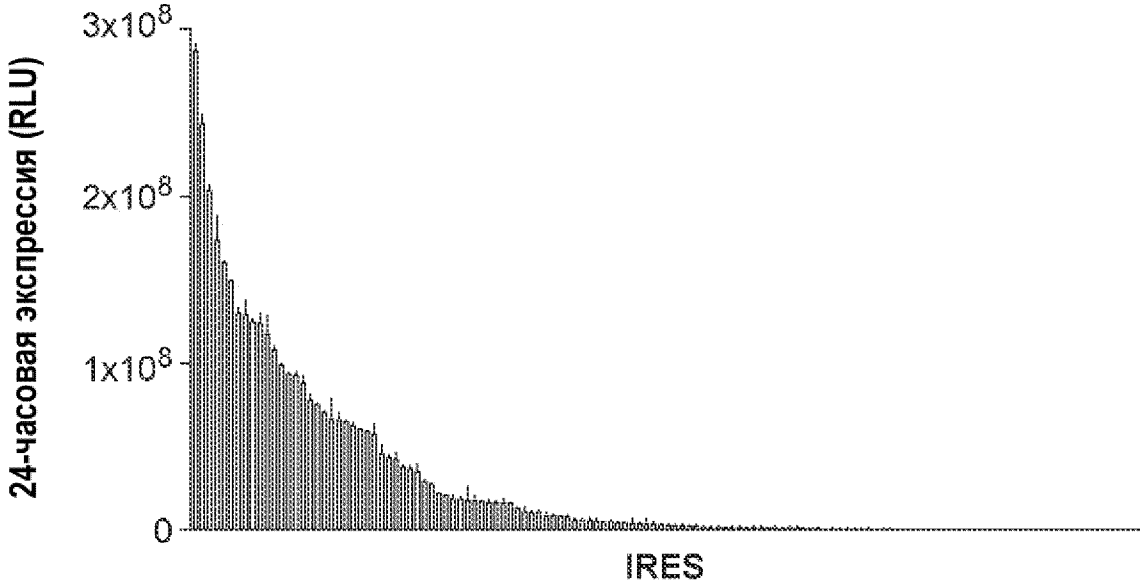
Фиг. 1A



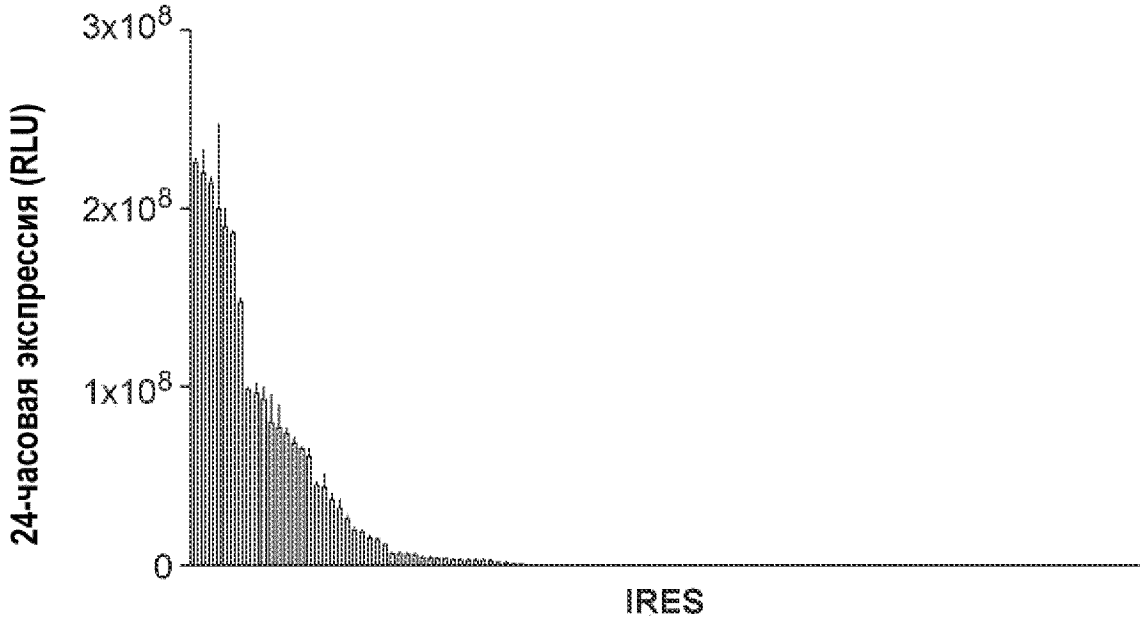
Фиг. 1B



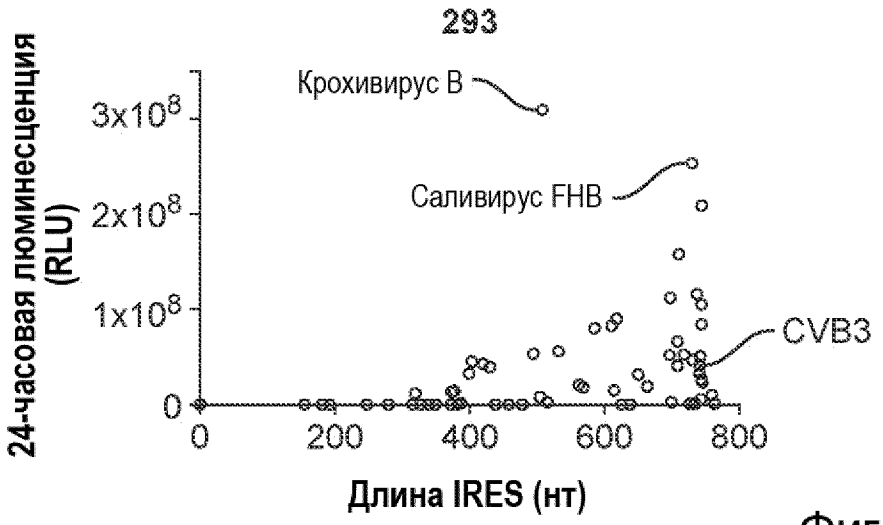
Фиг. 1C


24-часовая экспрессия (RLU)
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
IRES

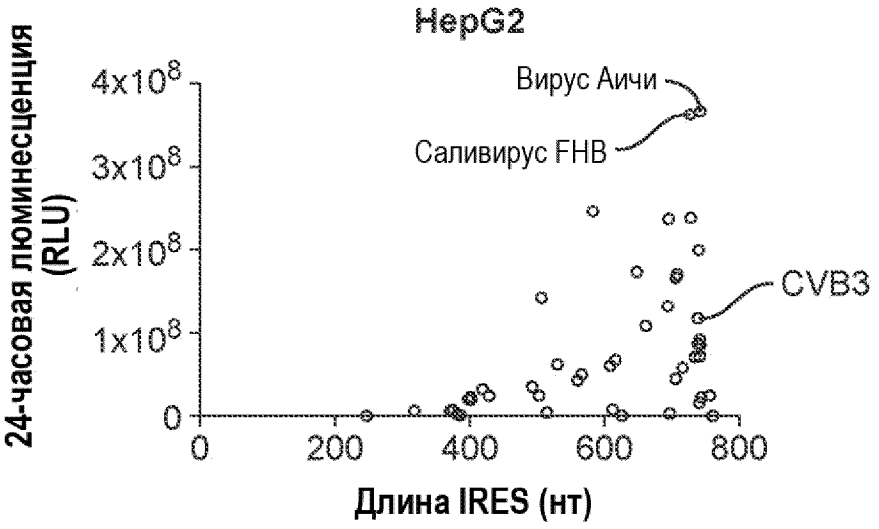
Фиг. 1D


24-часовая экспрессия (RLU)
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
IRES

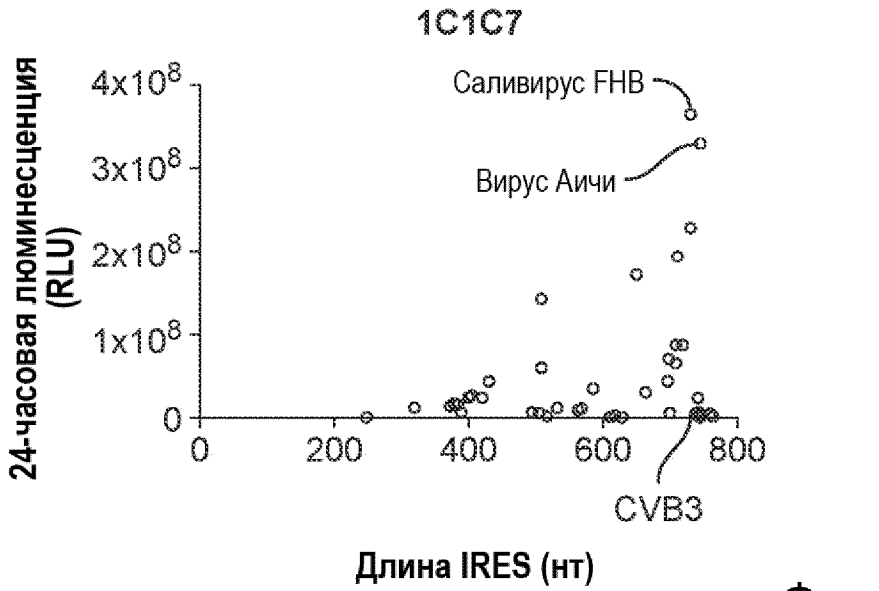
Фиг. 1E



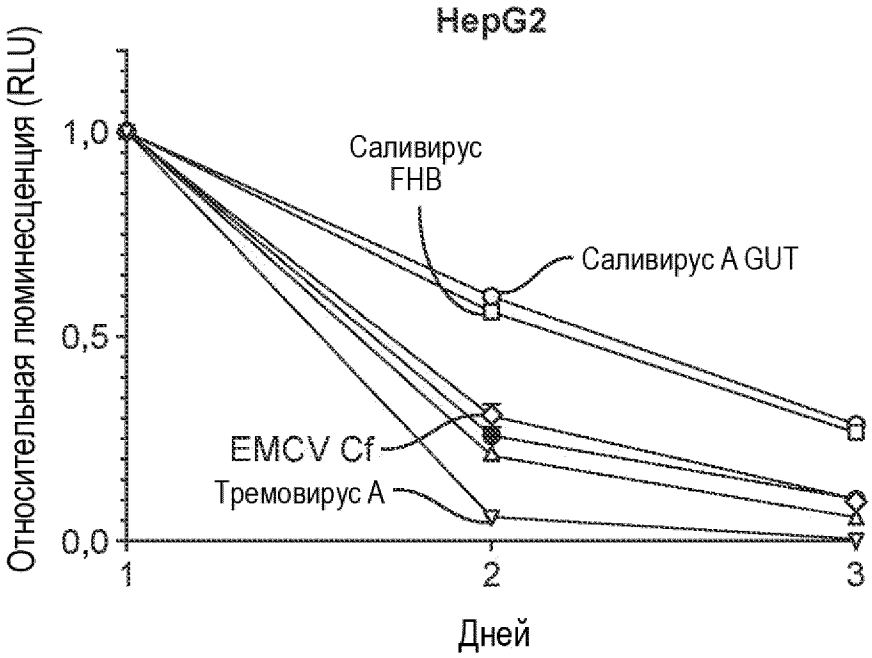
Фиг. 2A



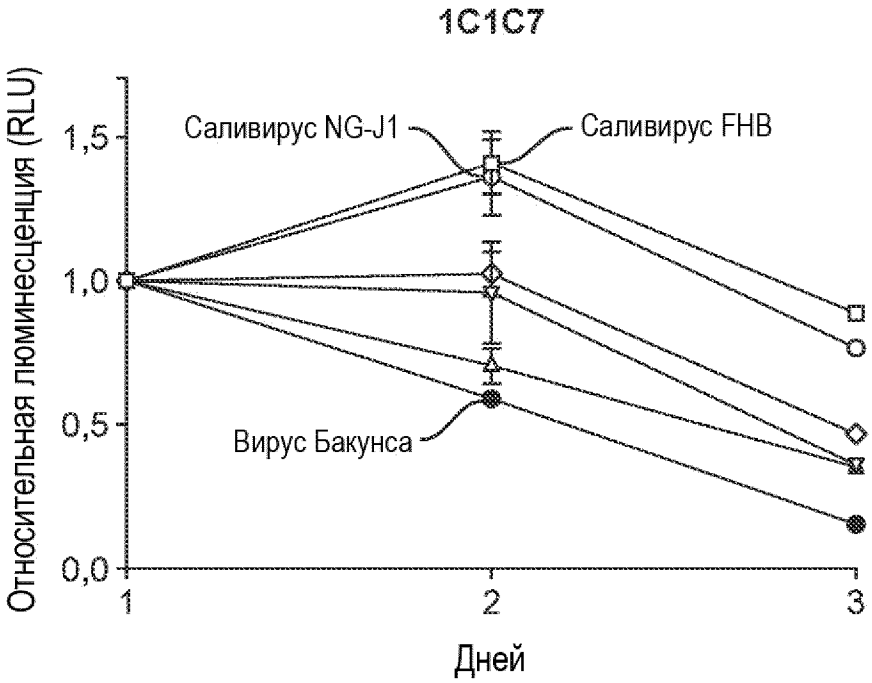
Фиг. 2B



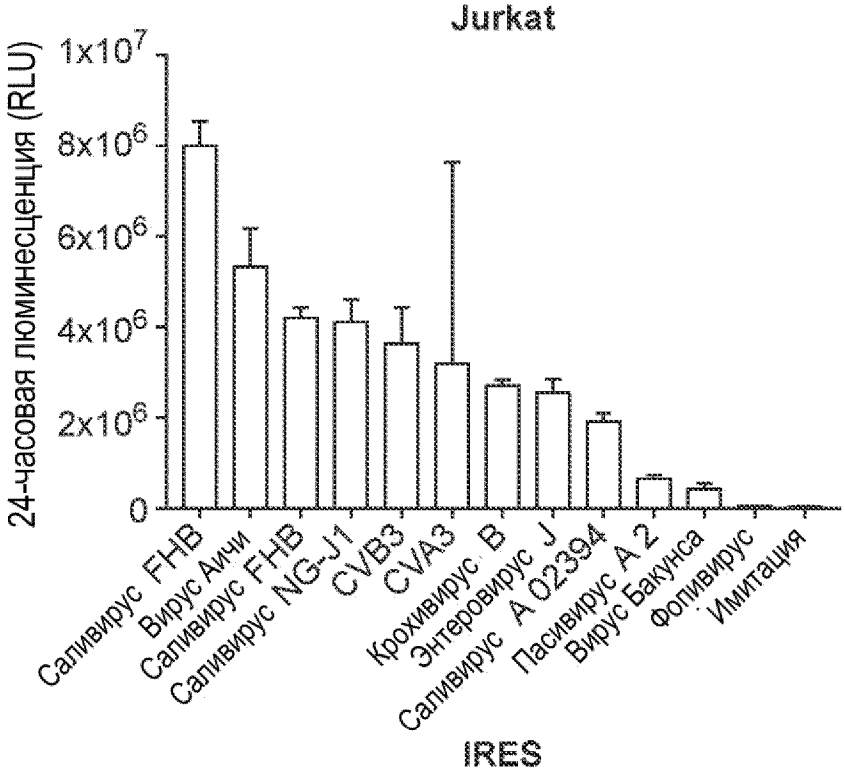
Фиг. 2C


HepG2
Относительная люминесценция (RLU)
1,0
0,5
0,0
1
2
3
Дней
Саливирус FHB
Саливирус A GUT
EMCV Cf
Тремовирус A

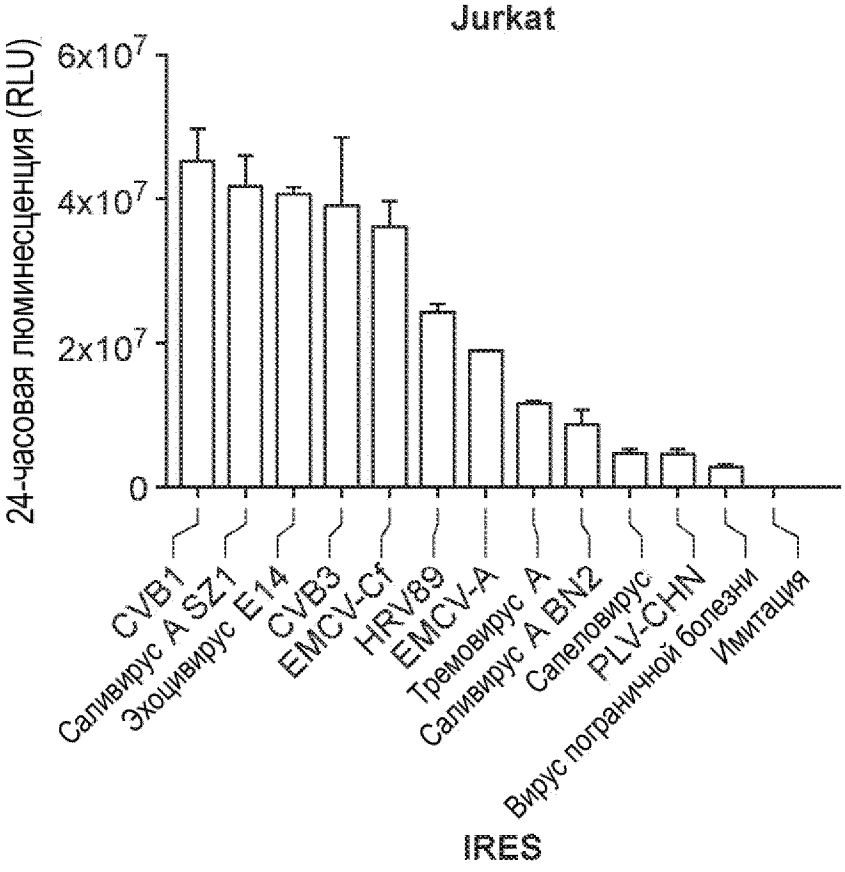
Фиг. 3A


1C1C7
Относительная люминесценция (RLU)
1,5
1,0
0,5
0,0
1
2
3
Дней
Саливирус NG-J1
Саливирус FHB
Вирус Бакунса

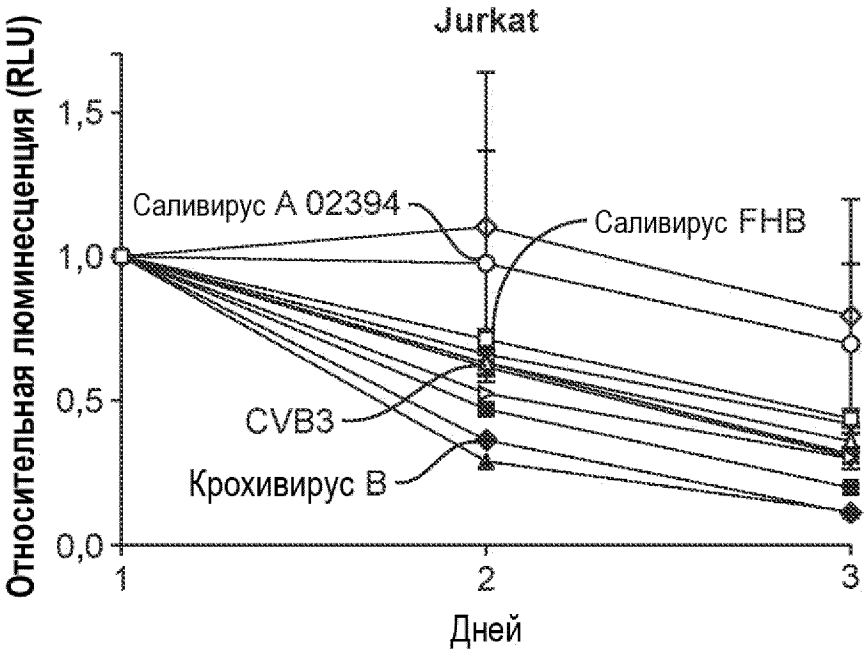
Фиг. 3B


Jurkat
24-часовая люминесценция (RLU)
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
Саливирус FHB
Вирус Аичи
Саливирус FHB
Саливирус NG-J1
CVB3
CVA3
Крохивирус B
Энтеровирус J
Саливирус A 02394
Пасивирус A 2
Вирус Бакунса
Фопивирус
Имитация
IRES

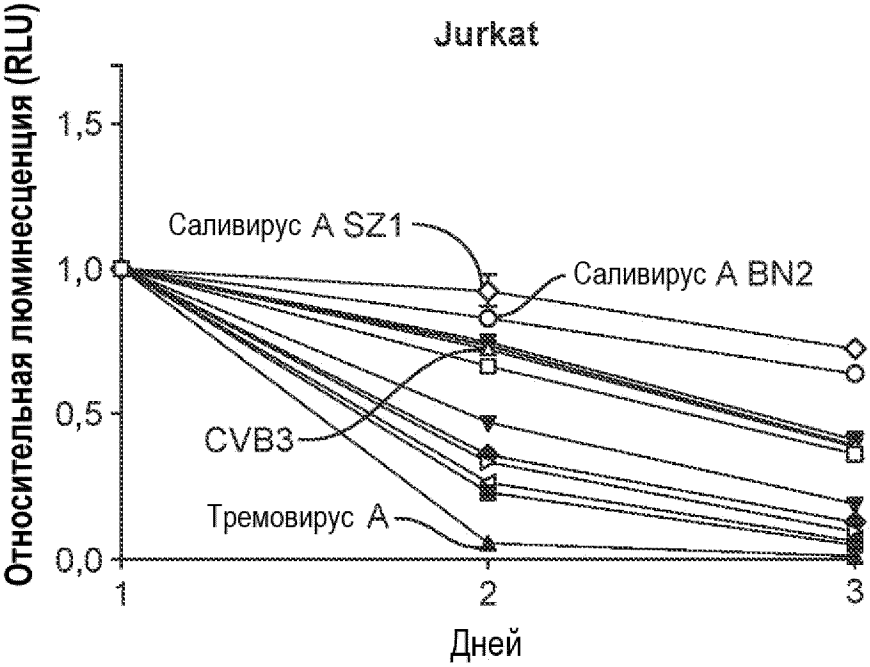
Фиг. 4A


Jurkat
24-часовая люминесценция (RLU)
6x10^7
4x10^7
2x10^7
0
CVB1
Саливирус A SZ1
Эхоцивирус E14
CVB3
EMCV-Cf
HRV89
EMCV-A
Тремовирус A
Саливирус A BN2
Сапеловирус
PLV-CHN
Вирус пограничной болезни
Имитация
IRES

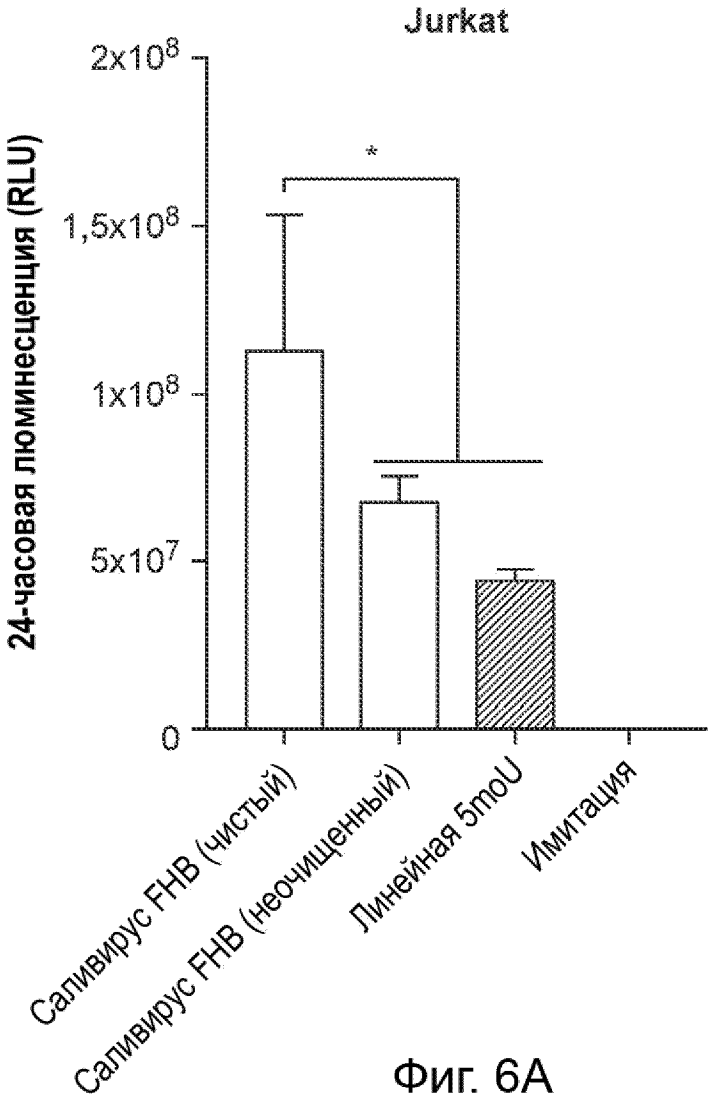
Фиг. 4B


Jurkat
Относительная люминесценция (RLU)
1,5
1,0
0,5
0,0
Саливирус A 02394
Саливирус FHB
CVB3
Крохивирус B
1
2
3
Дней

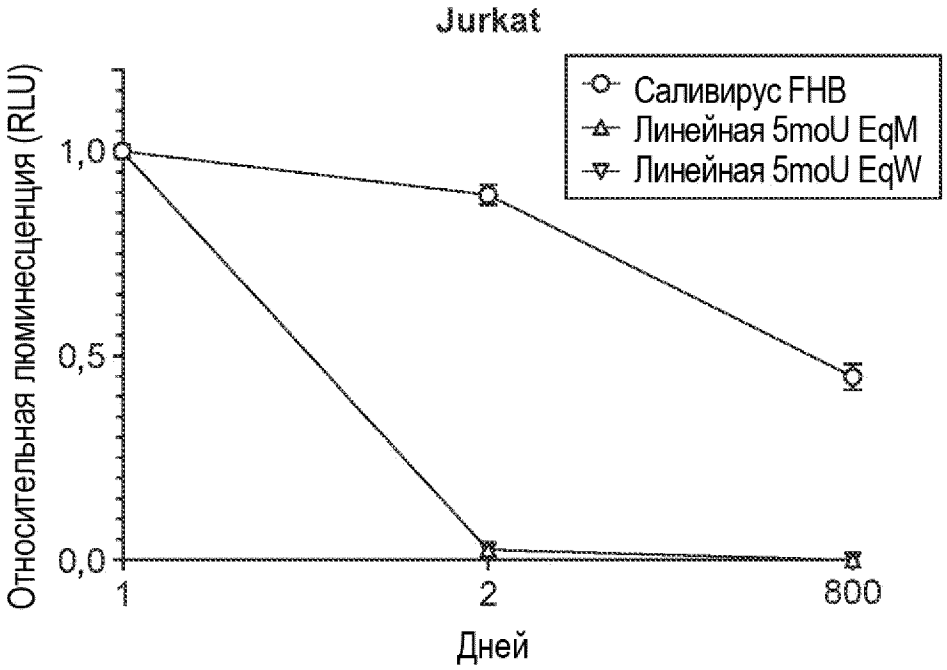
Фиг. 5A


Jurkat
Относительная люминесценция (RLU)
1,5
1,0
0,5
0,0
Саливирус A SZ1
Саливирус A BN2
CVB3
Тремовирус A
1
2
3
Дней

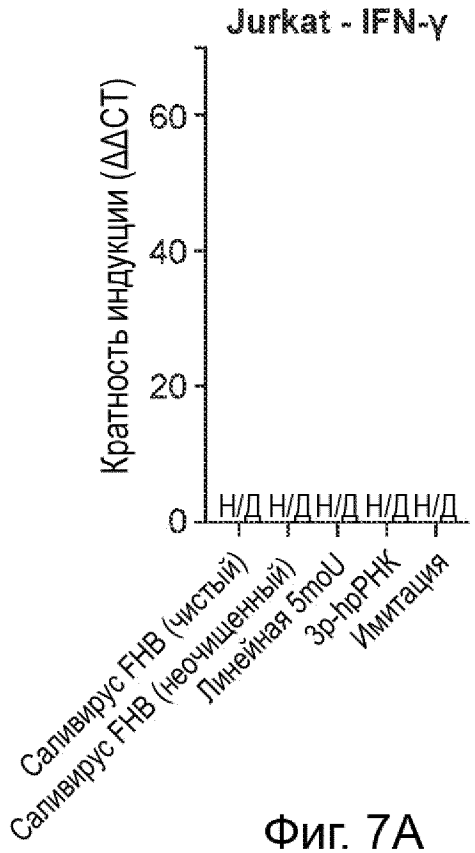
Фиг. 5B


Jurkat
24-часовая люминесценция (RLU)
2x10^8
1,5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
*
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
Имитация

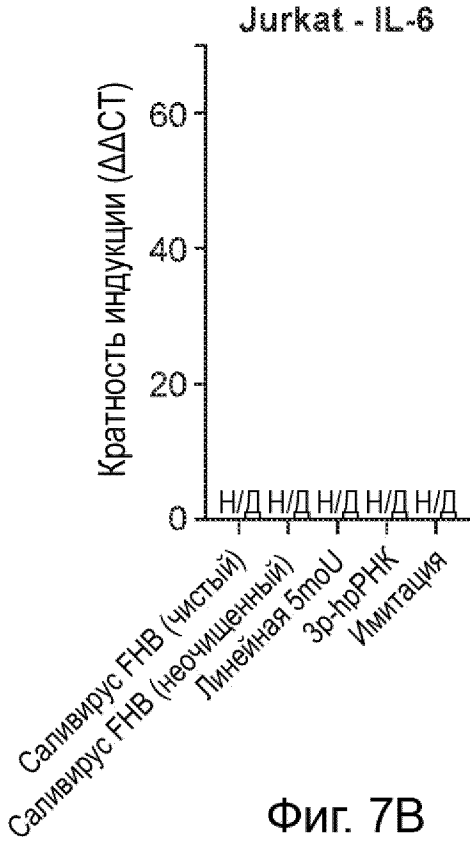
Фиг. 6A


Jurkat
Саливирус FHB
Линейная 5moU EqM
Линейная 5moU EqW
Относительная люминесценция (RLU)
1,0
0,5
0,0
1
2
800
Дней

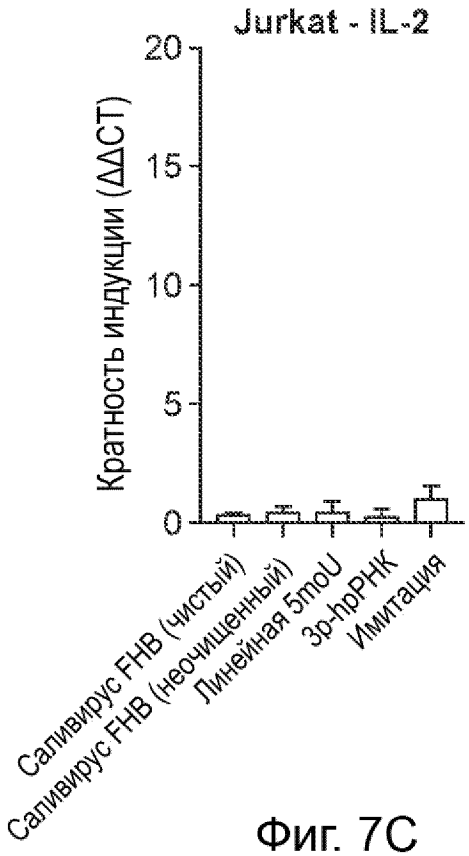
Фиг. 6B


Jurkat - IFN-γ
Кратность индукции (ΔΔCT)
60
40
20
0
Н/Д Н/Д Н/Д Н/Д Н/Д
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpPHK
Имитация

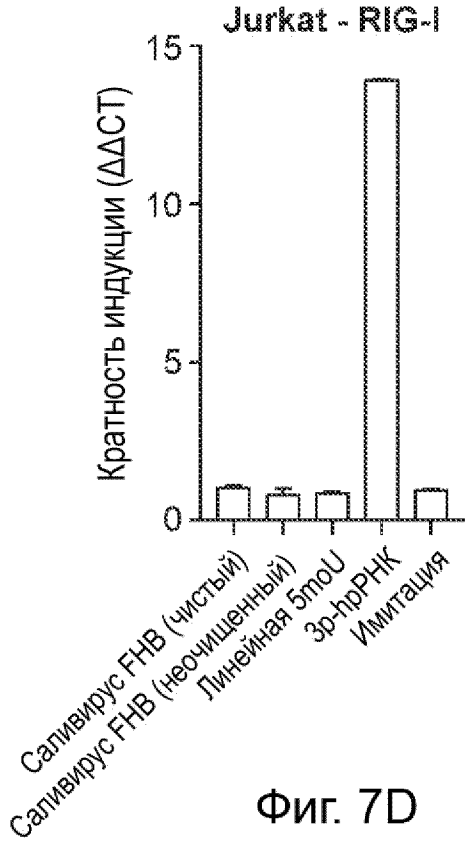
Фиг. 7A


Jurkat - IL-6
Кратность индукции (ΔΔCT)
60
40
20
0
Н/Д Н/Д Н/Д Н/Д Н/Д
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpPHK
Имитация

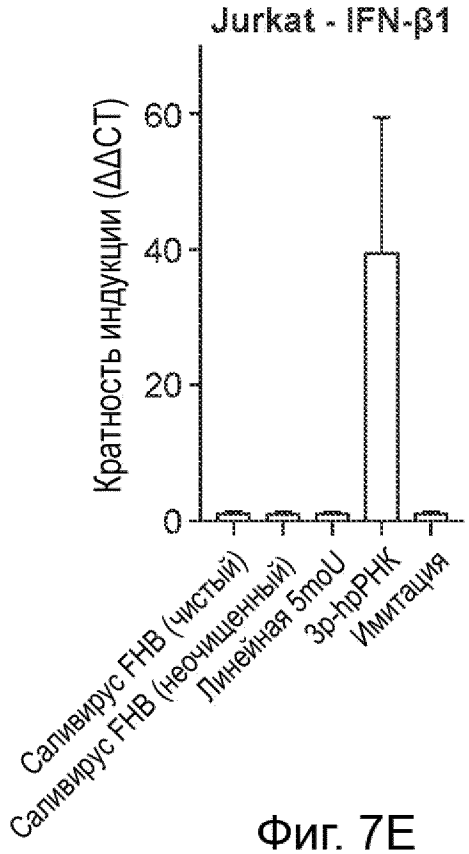
Фиг. 7B


Jurkat - IL-2
Кратность индукции (ΔΔCT)
20
15
10
5
0
Салвирус FHB (чистый)
Салвирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpРНК
Имитация

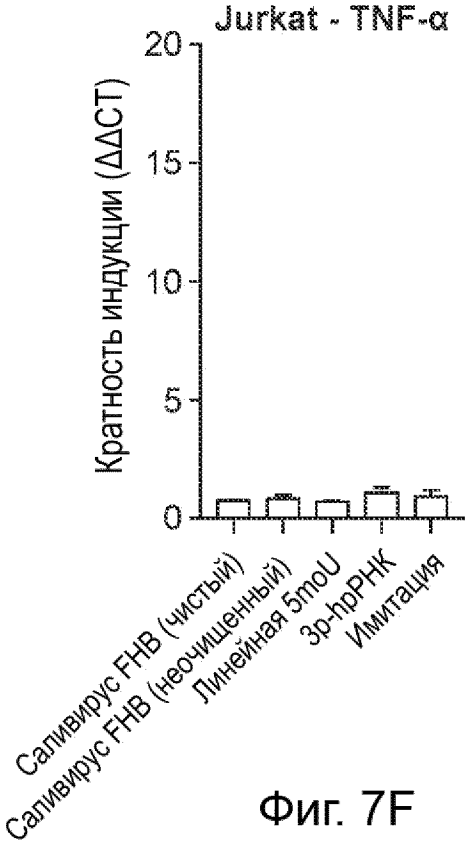
Фиг. 7C


Jurkat - RIG-I
Кратность индукции (ΔΔCT)
15
10
5
0
Салвирус FHB (чистый)
Салвирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpРНК
Имитация

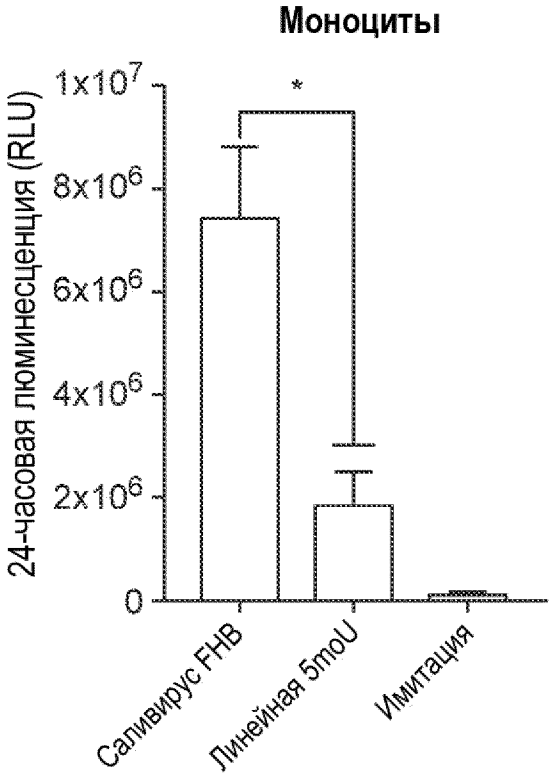
Фиг. 7D


Jurkat - IFN-β1
Кратность индукции (ΔΔCT)
60
40
20
0
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpРНК
Имитация

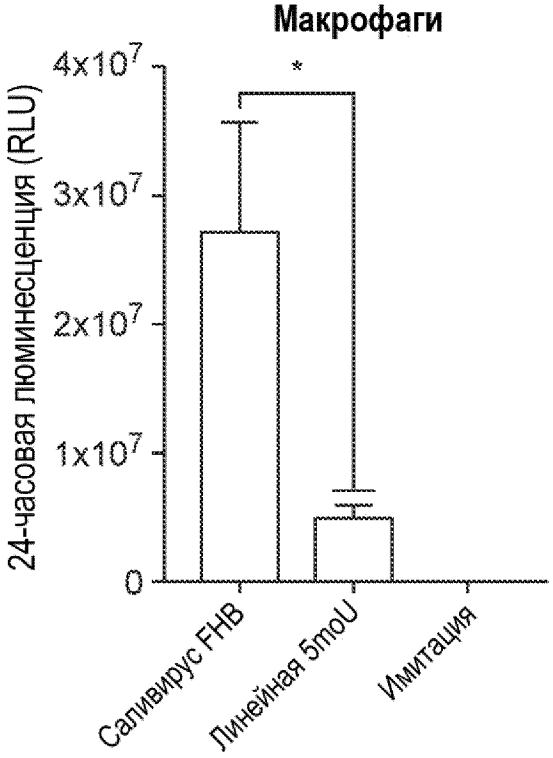
Фиг. 7E


Jurkat - TNF-α
Кратность индукции (ΔΔCT)
20
15
10
5
0
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
3p-hpРНК
Имитация

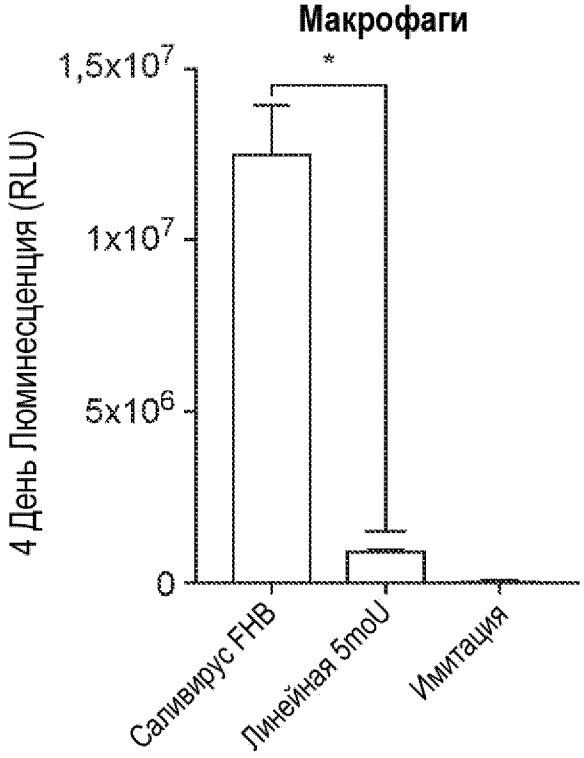
Фиг. 7F


Моноциты
24-часовая люминесценция (RLU)
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
*
Саливирус FHB
Линейная 5moU
Имитация

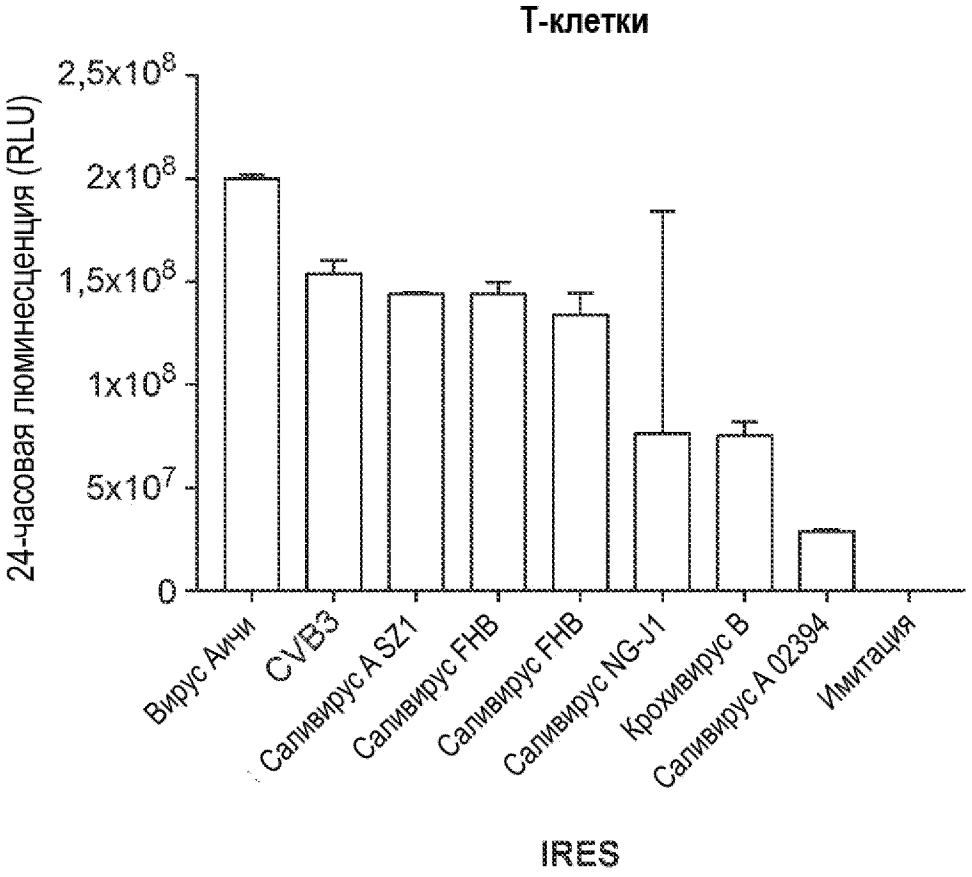
Фиг. 8A


Макрофаги
24-часовая люминесценция (RLU)
4x10^7
3x10^7
2x10^7
1x10^7
0
*
Саливирус FHB
Линейная 5moU
Имитация

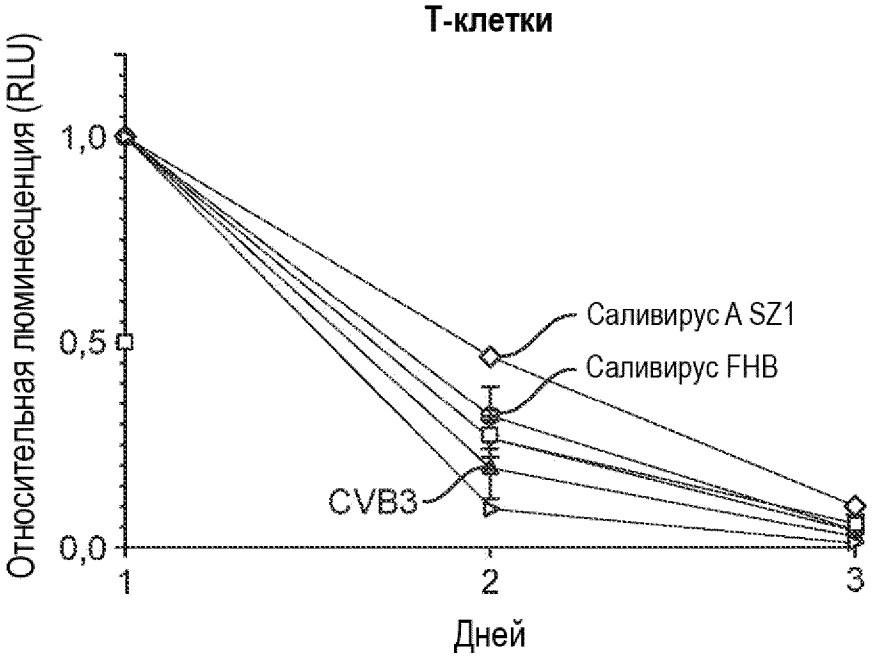
Фиг. 8B


Макрофаги
4 День Люминесценция (RLU)
1,5x10^7
1x10^7
5x10^6
0
*
Саливирус FHB
Линейная 5moU
Имитация

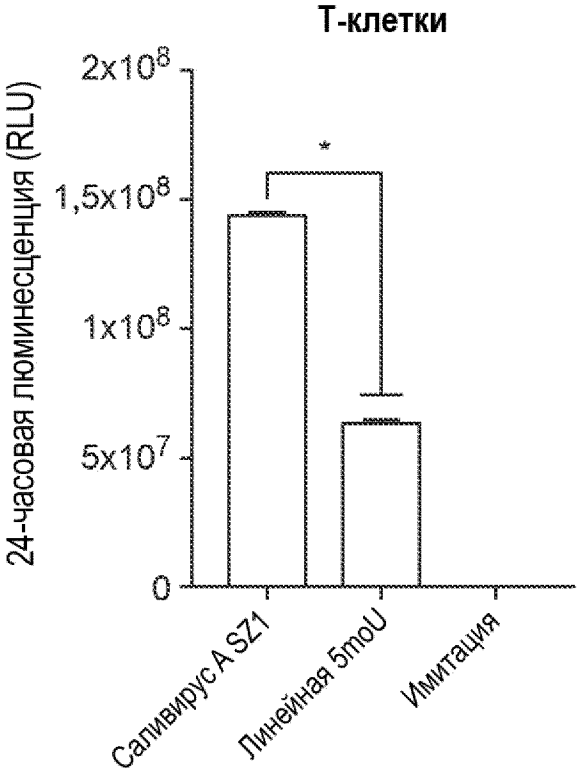
Фиг. 8C


Т-клетки
24-часовая люминесценция (RLU)
2,5x10^8
2x10^8
1,5x10^8
1x10^8
5x10^7
0
Вирус Аичи
CVB3
Саливирус A SZ1
Саливирус FHB
Саливирус FHB
Саливирус NG-J1
Крохивирус B
Саливирус A 02394
Имитация
IRES

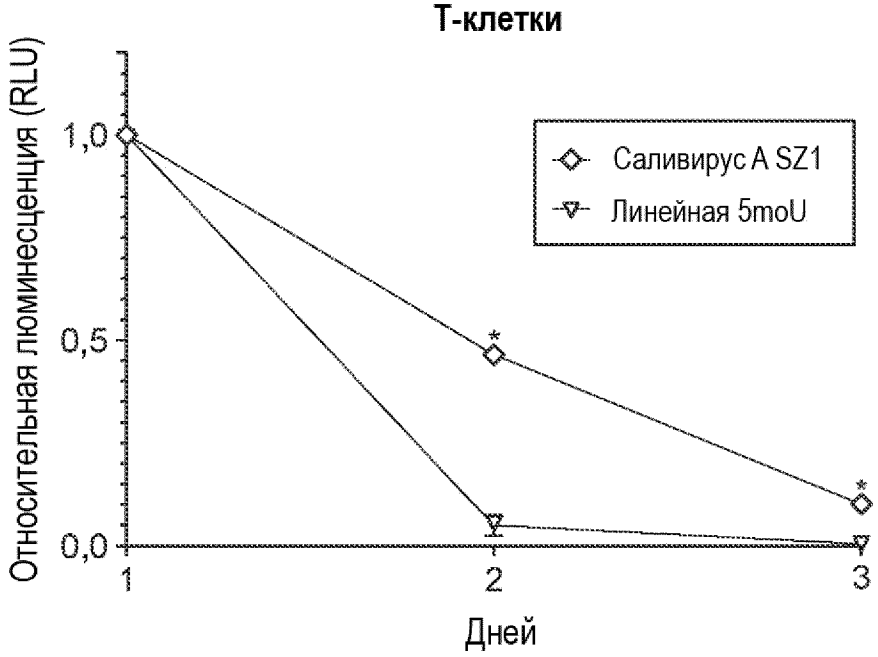
Фиг. 9A


Т-клетки
Относительная люминесценция (RLU)
1,0
0,5
0,0
Саливирус A SZ1
Саливирус FHB
CVB3
1
2
3
Дней

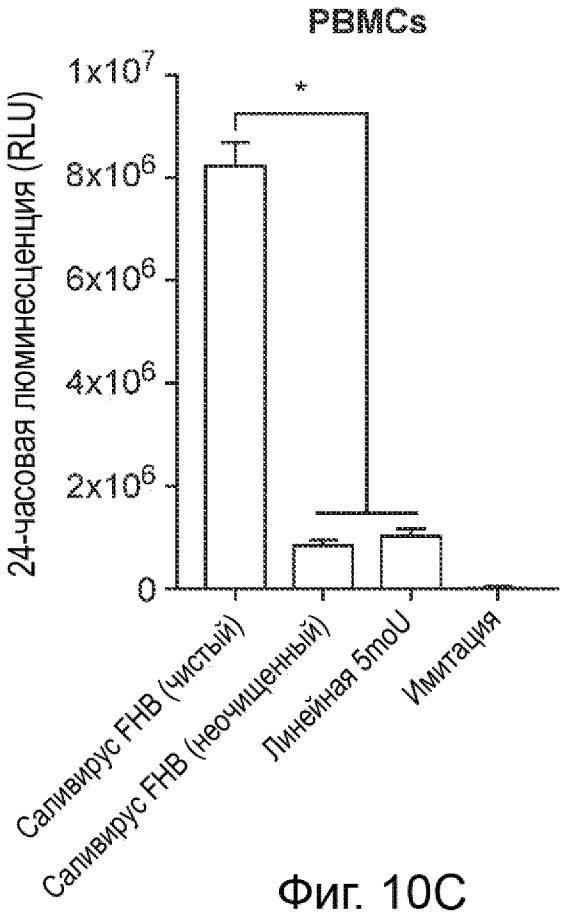
Фиг. 9B



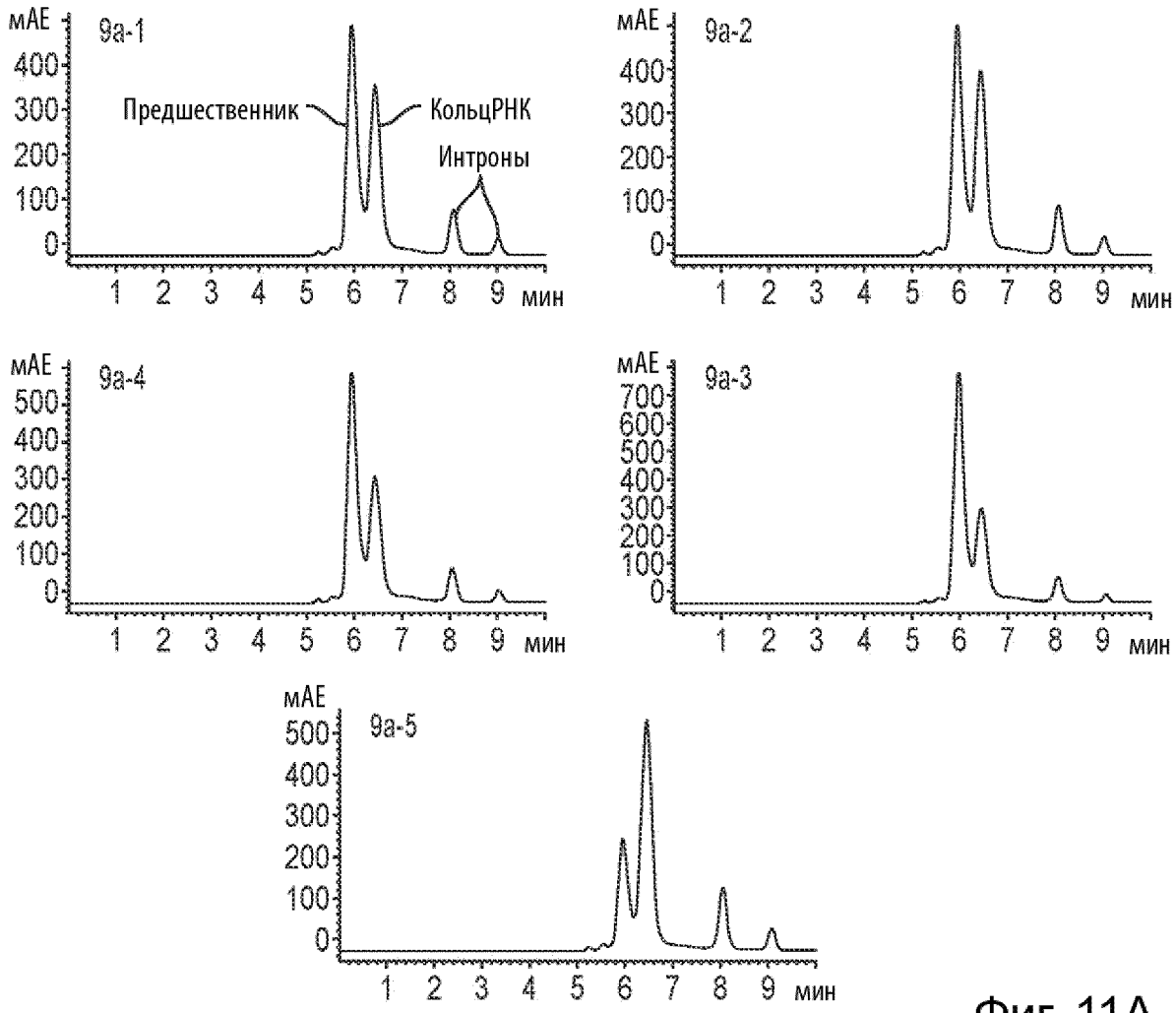
Фиг. 10A



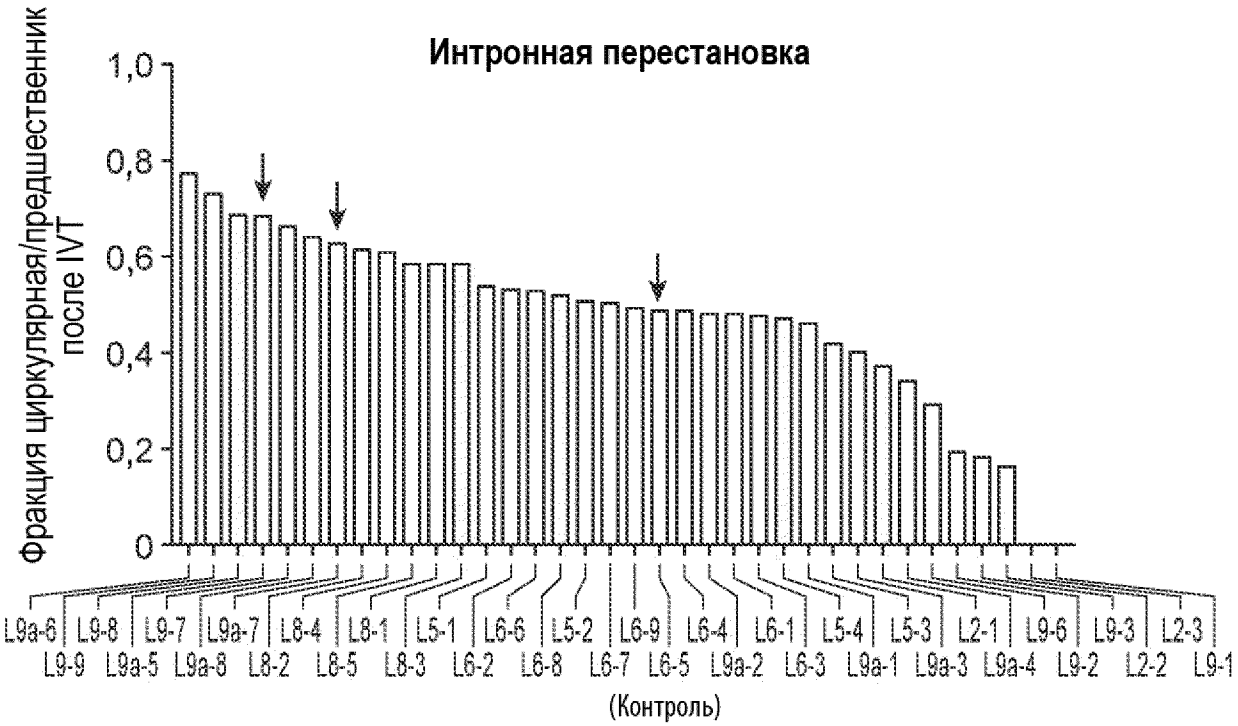
Фиг. 10B


PBMCs
24-часовая люминесценция (RLU)
1x10^7
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
*
Саливирус FHB (чистый)
Саливирус FHB (неочищенный)
Линейная 5moU
Имитация

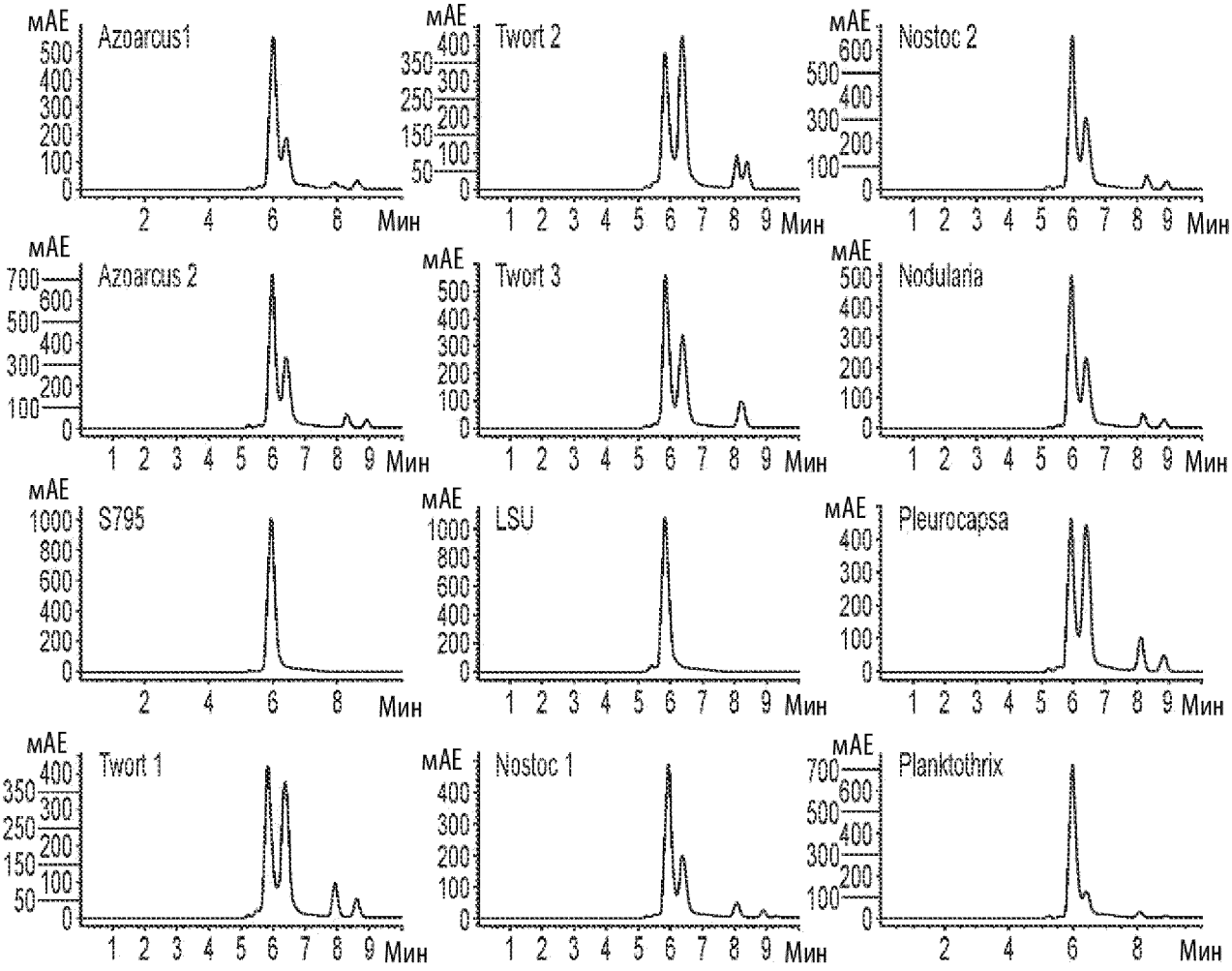
Фиг. 10C



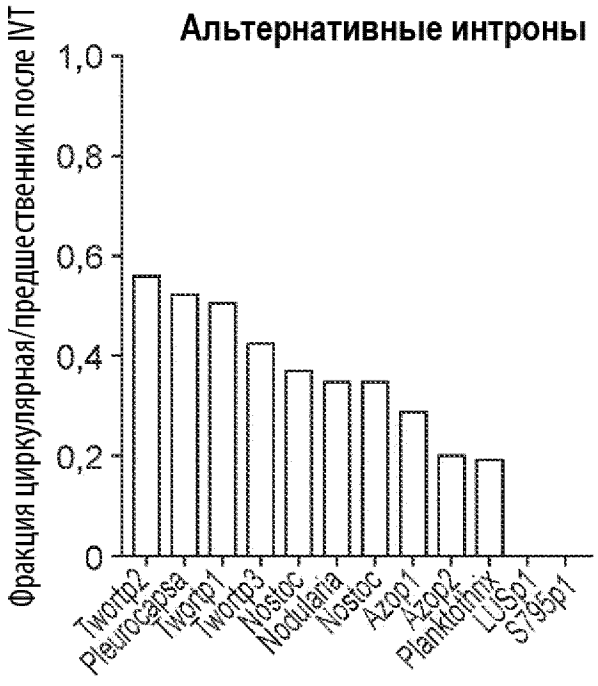
Фиг. 11A



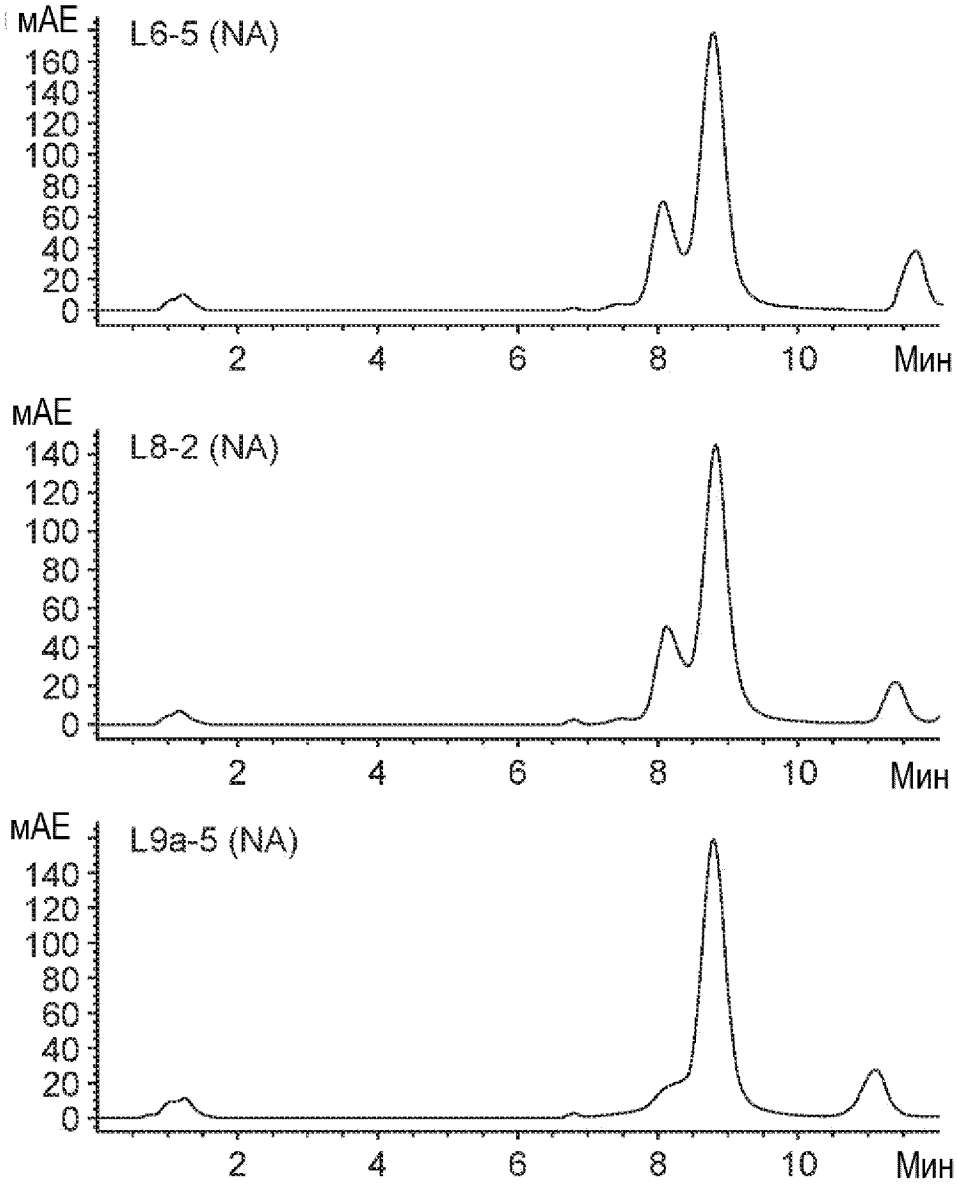
Фиг. 11B



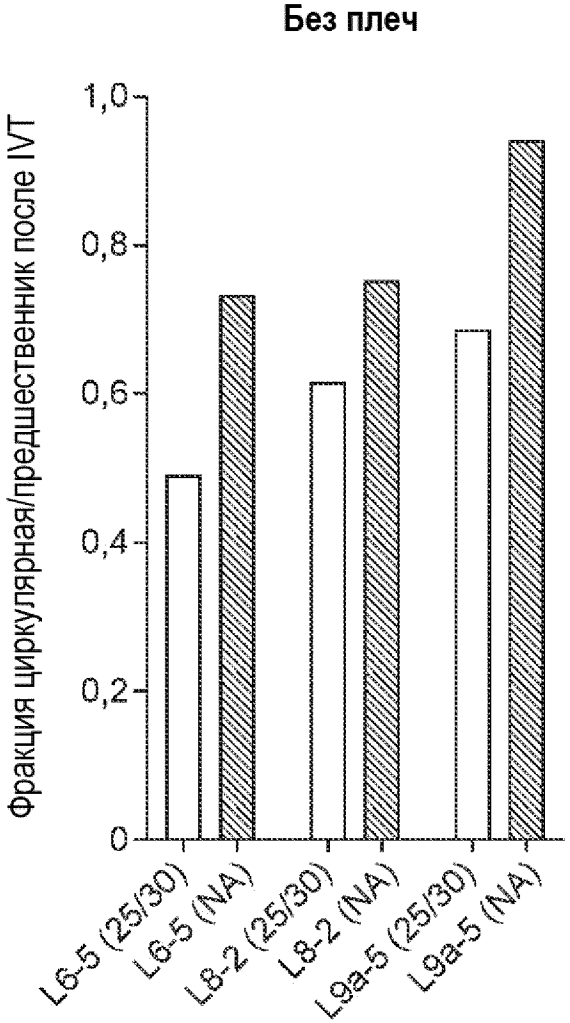
Фиг. 12A



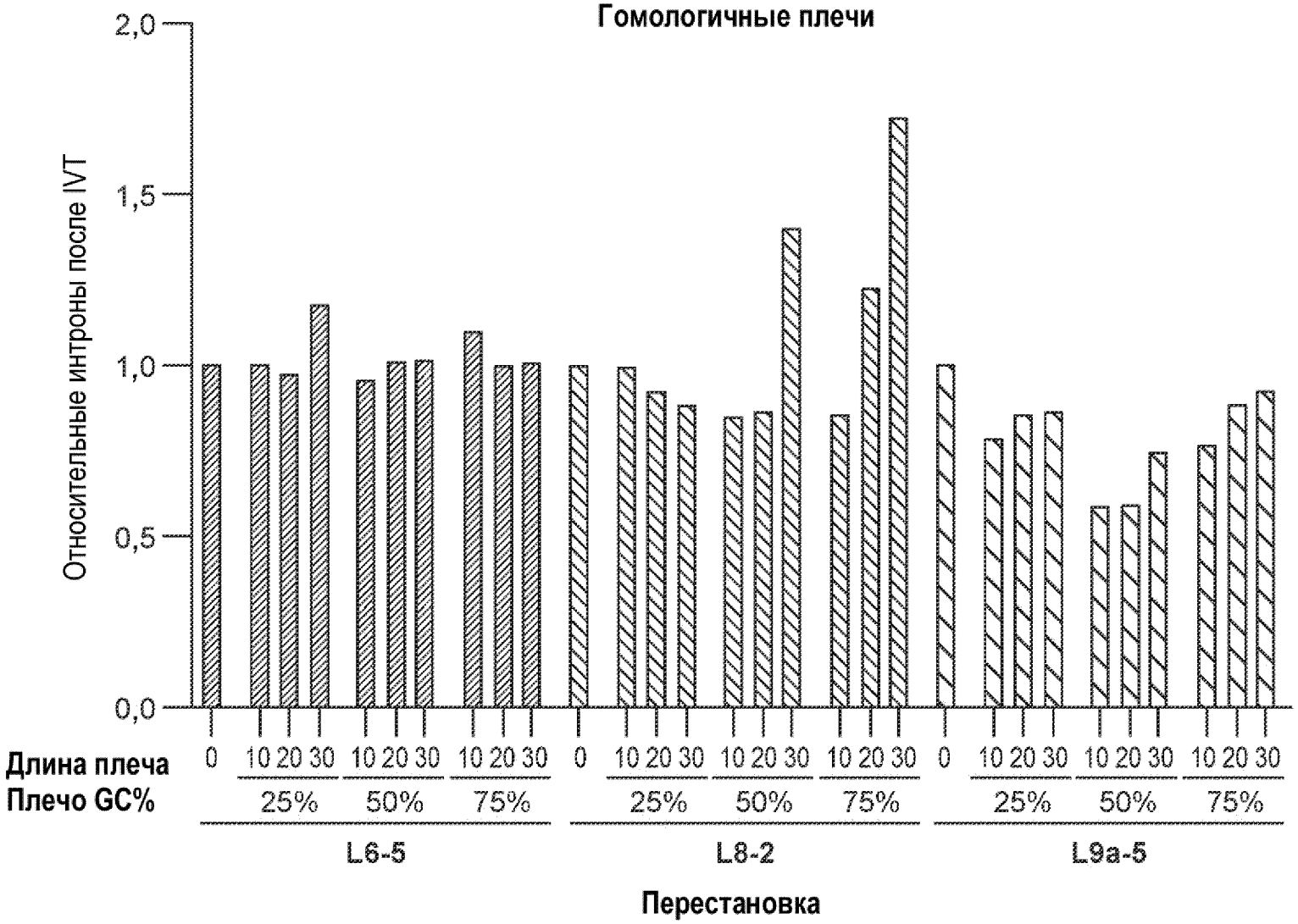
Фиг. 12B


мAE
L6-5 (NA)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
Мин
мAE
L8-2 (NA)
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
Мин
мAE
L9a-5 (NA)
140
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
Мин

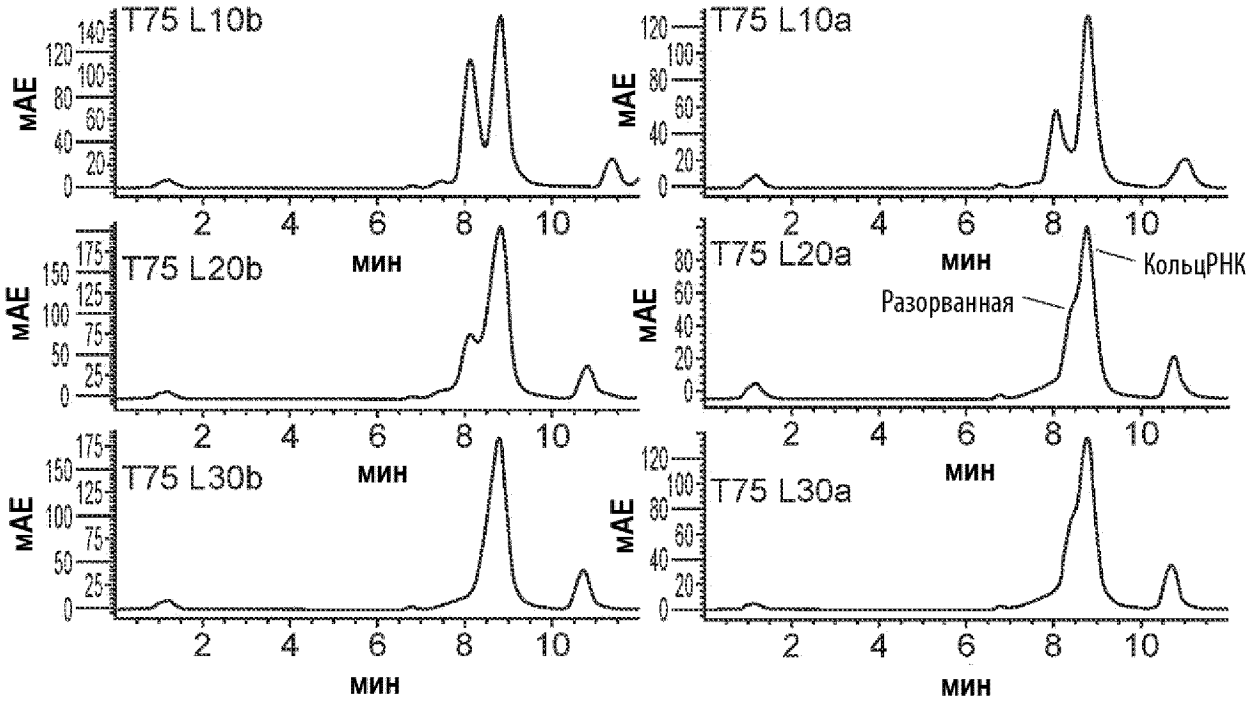
Фиг. 13A


Без плеч
Фракция циркулярная/предшественник после IVT
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
L6-5 (25/30)
L6-5 (NA)
L8-2 (25/30)
L8-2 (NA)
L9a-5 (25/30)
L9a-5 (NA)

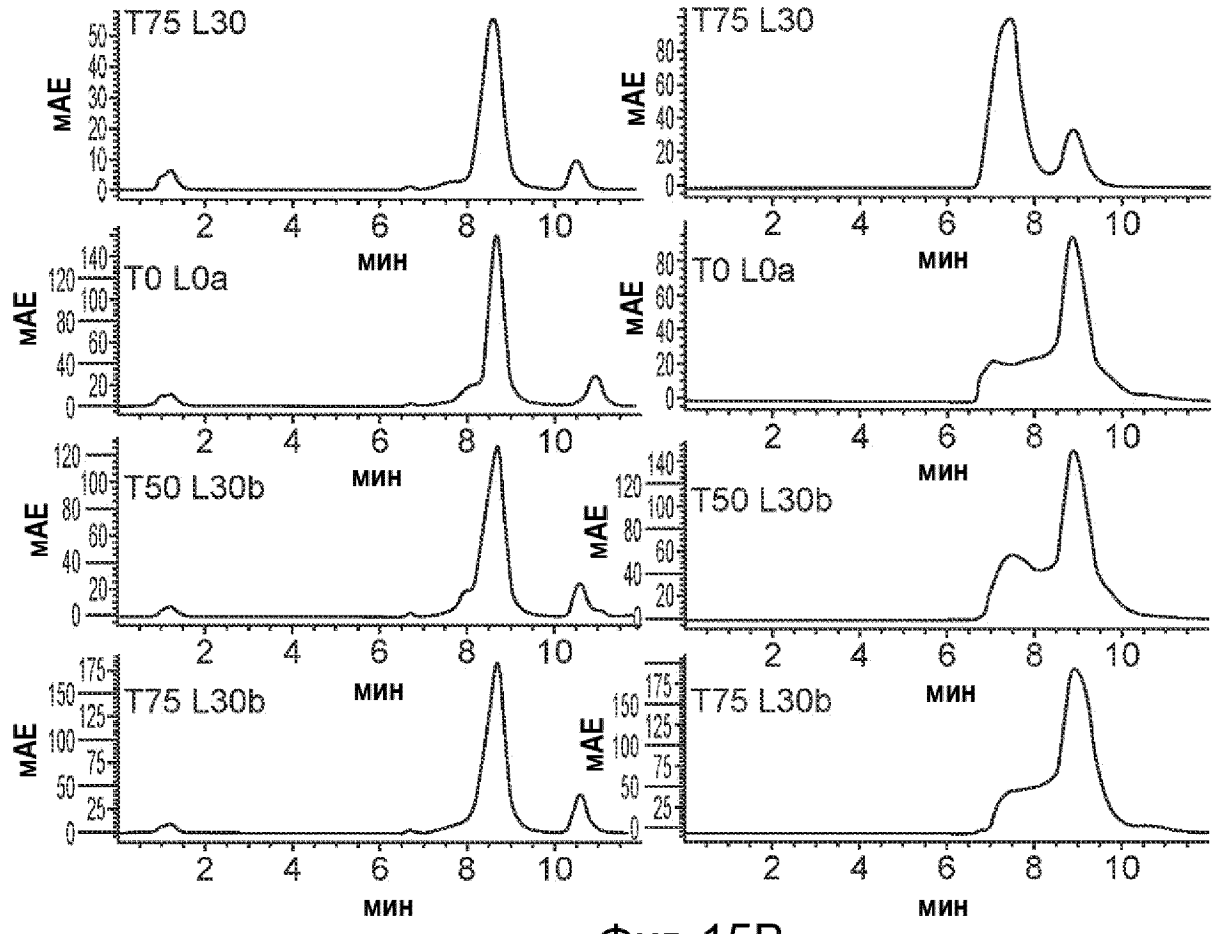
Фиг. 13B


Гомологичные плечи
Относительные интроны после IVT
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Длина плеча
Плечо GC%
0 10 20 30 10 20 30 10 20 30 0 10 20 30 10 20 30 10 20 30 0 10 20 30 10 20 30 10 20 30
25% 50% 75% 25% 50% 75% 25% 50% 75%
L6-5 L8-2 L9a-5
Перестановка

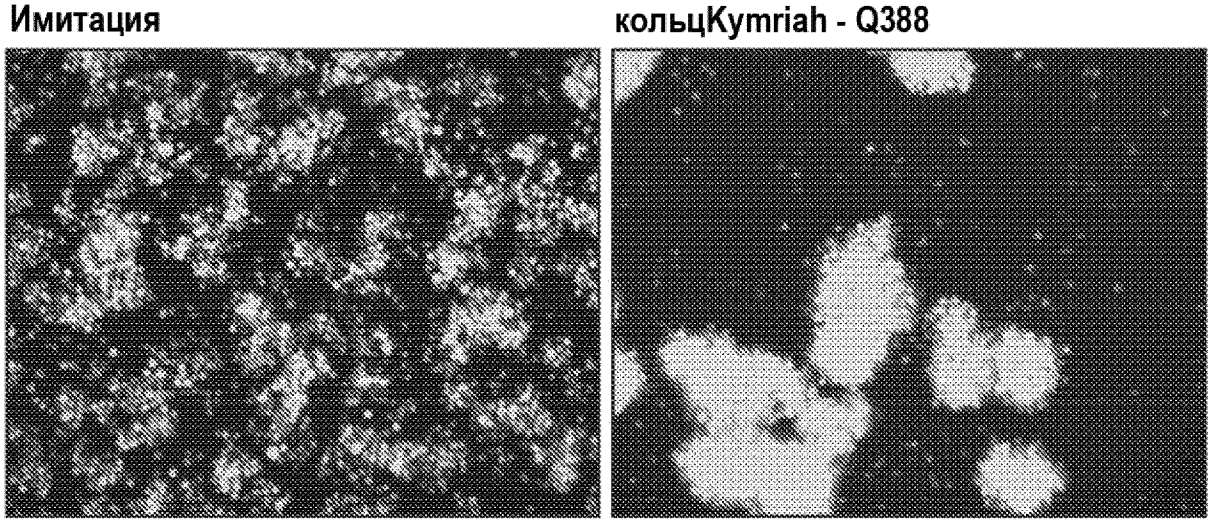
Фиг. 14



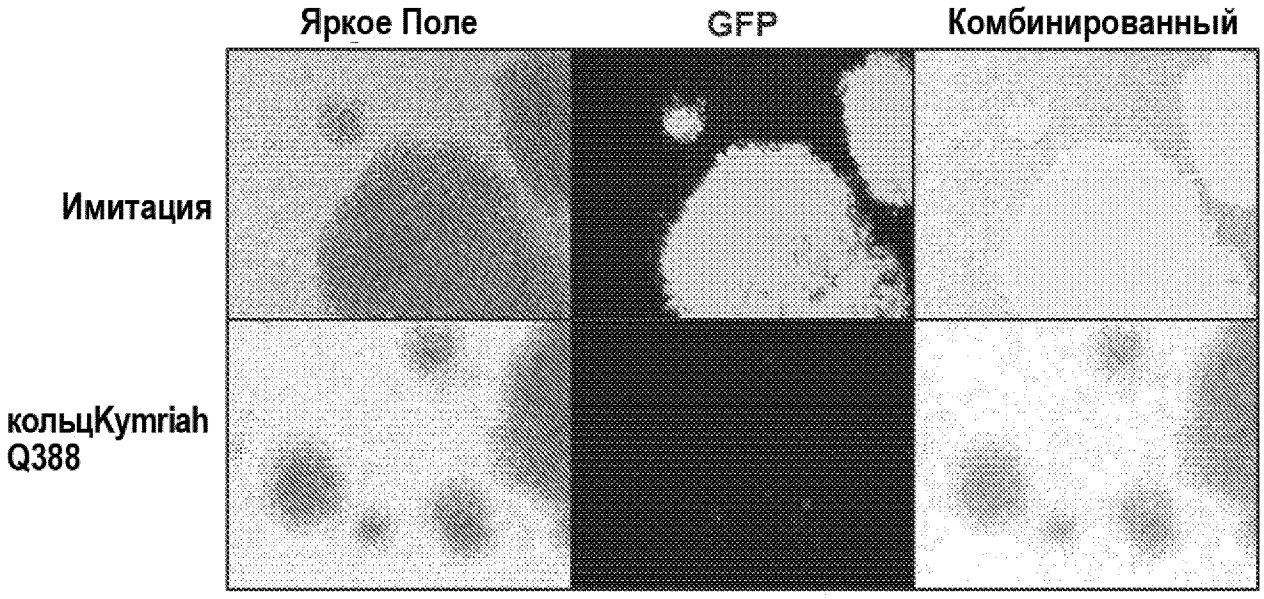
Фиг. 15A



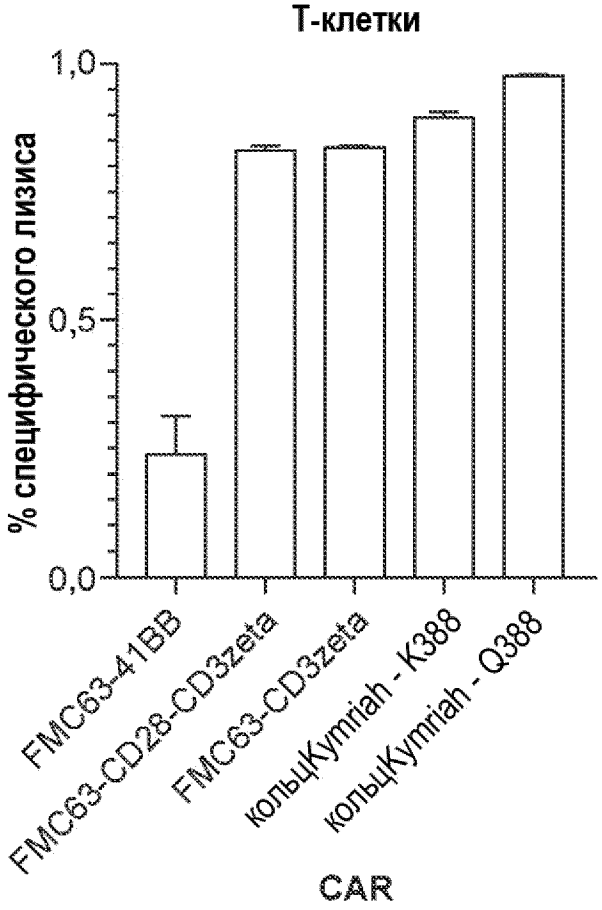
Фиг. 15B



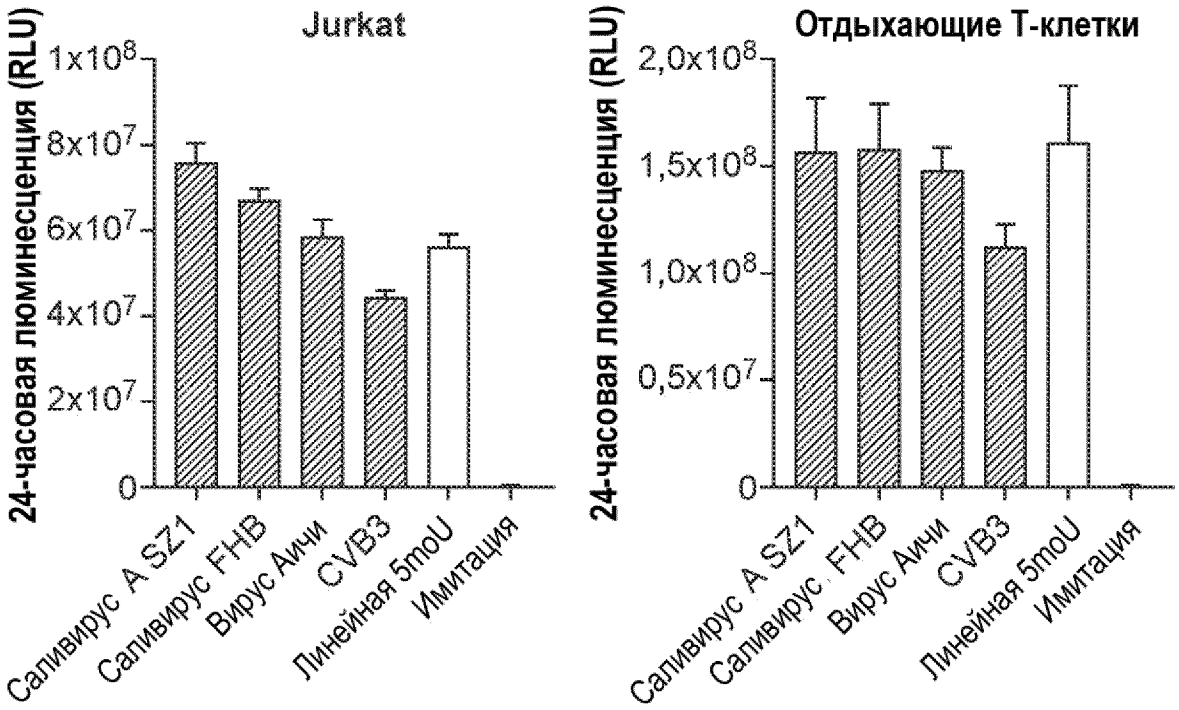
Фиг. 16


Яркое Поле
GFP
Комбинированный
Имитация
кольцKymriah
Q388

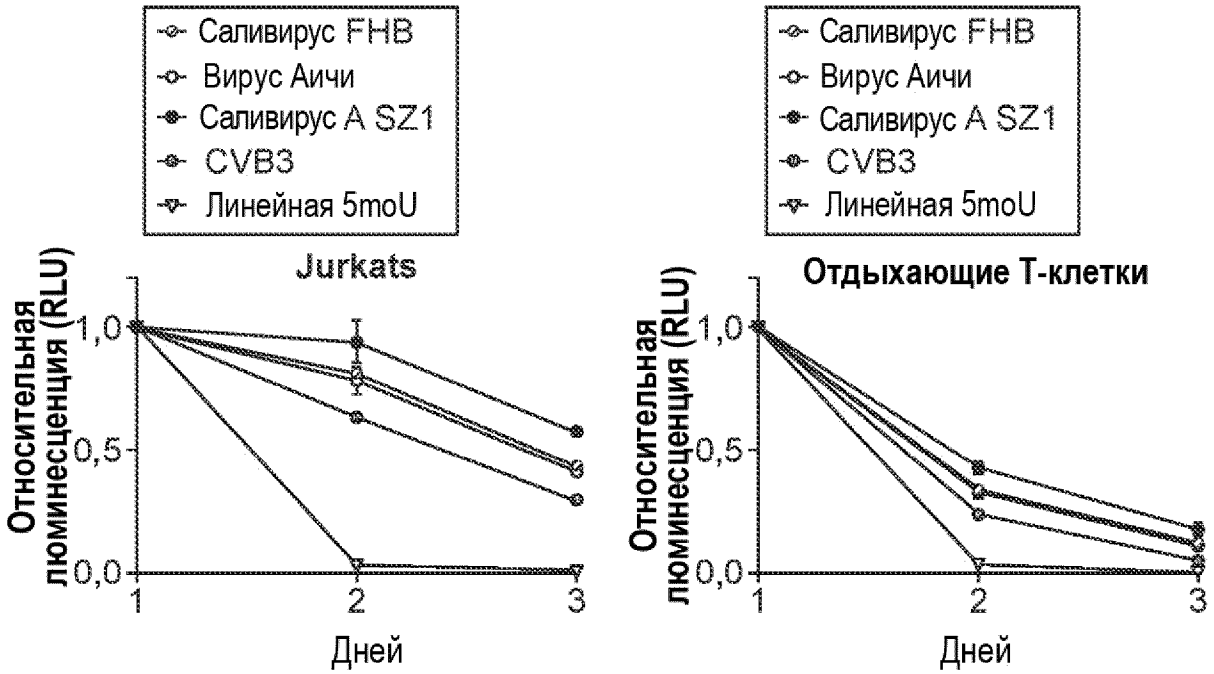
Фиг. 17


Т-клетки
% специфического лизиса
1,0
0,5
0,0
FMC63-41BB
FMC63-CD28-CD3zeta
FMC63-CD3zeta
кольцKymriah - K388
кольцKymriah - Q388
CAR

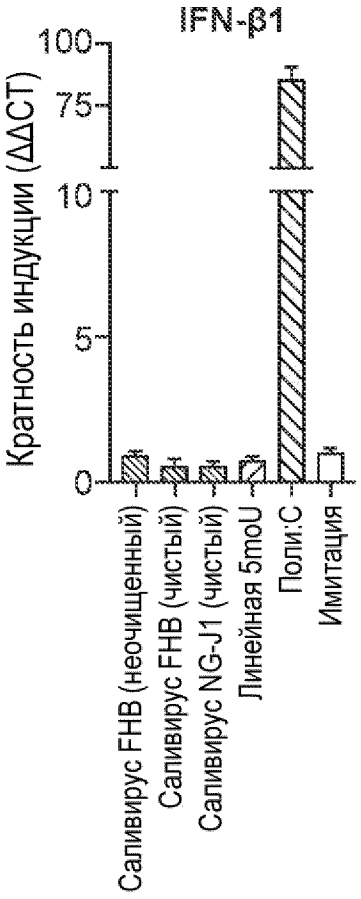
Фиг. 18



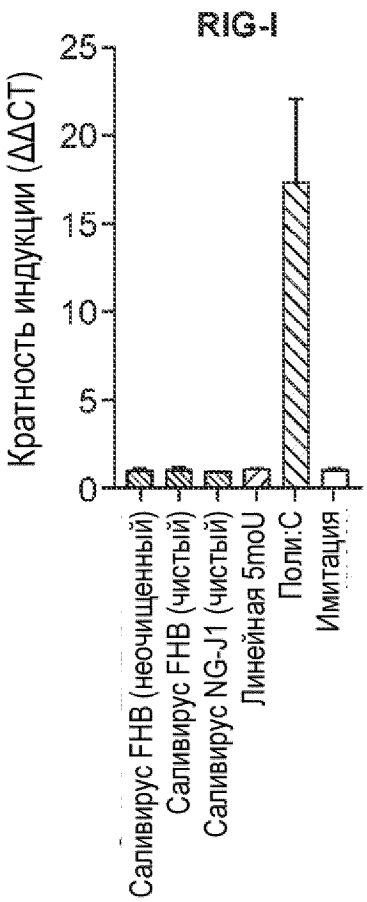
Фиг. 19A



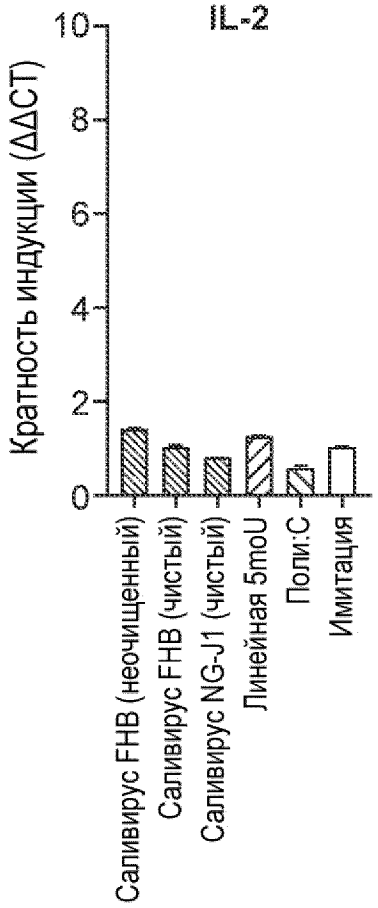
Фиг. 19B



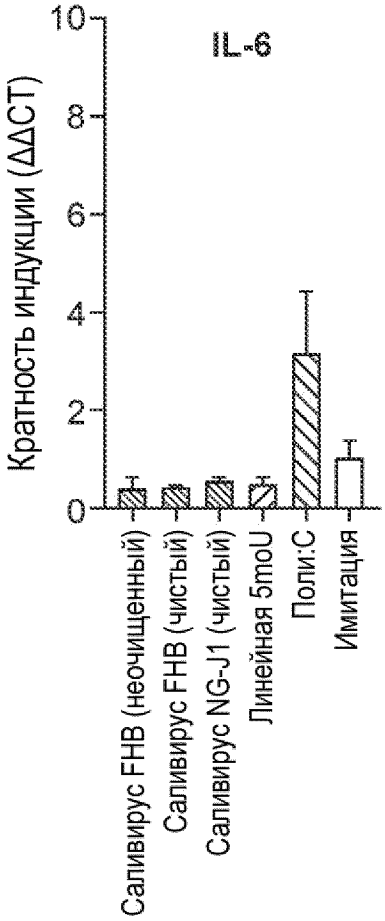
Фиг. 20A



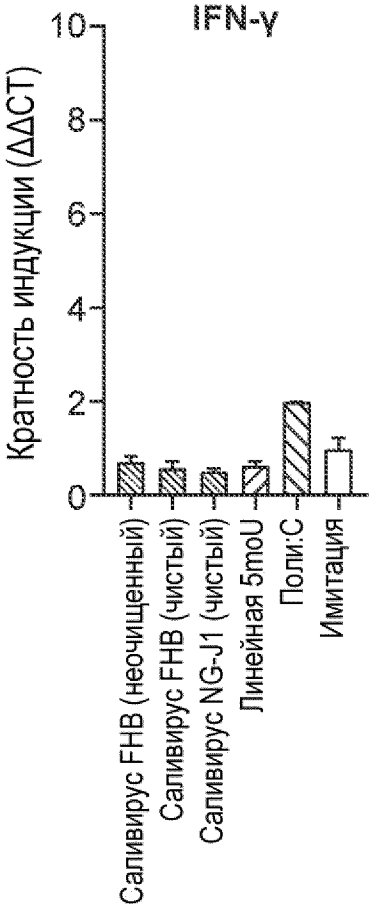
Фиг. 20B



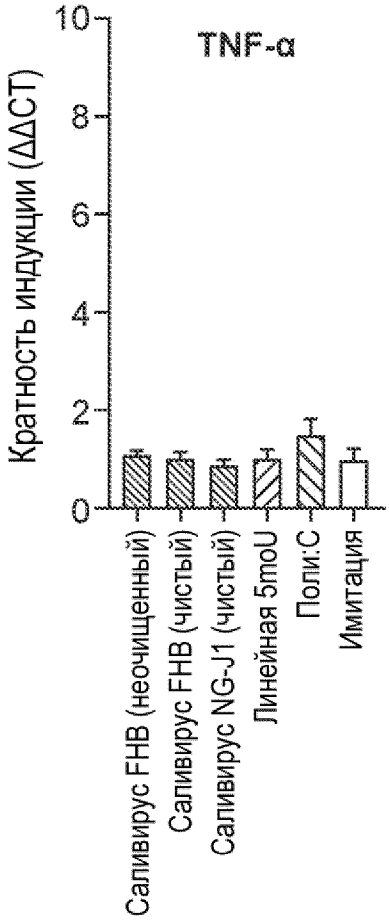
Фиг. 20C



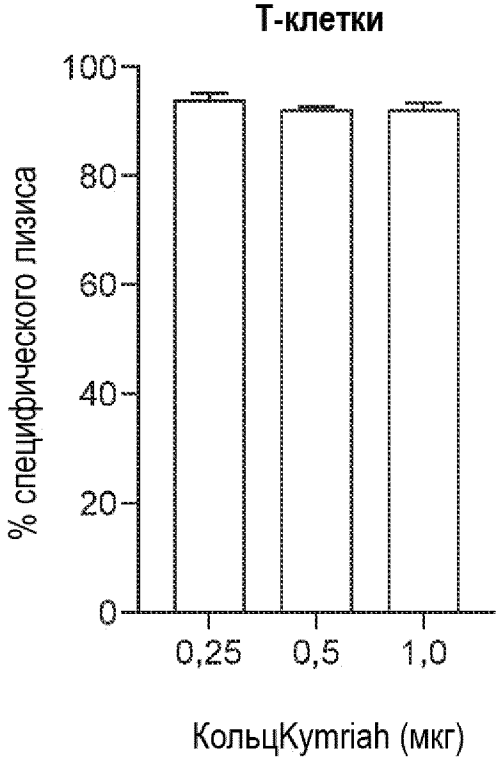
Фиг. 20D



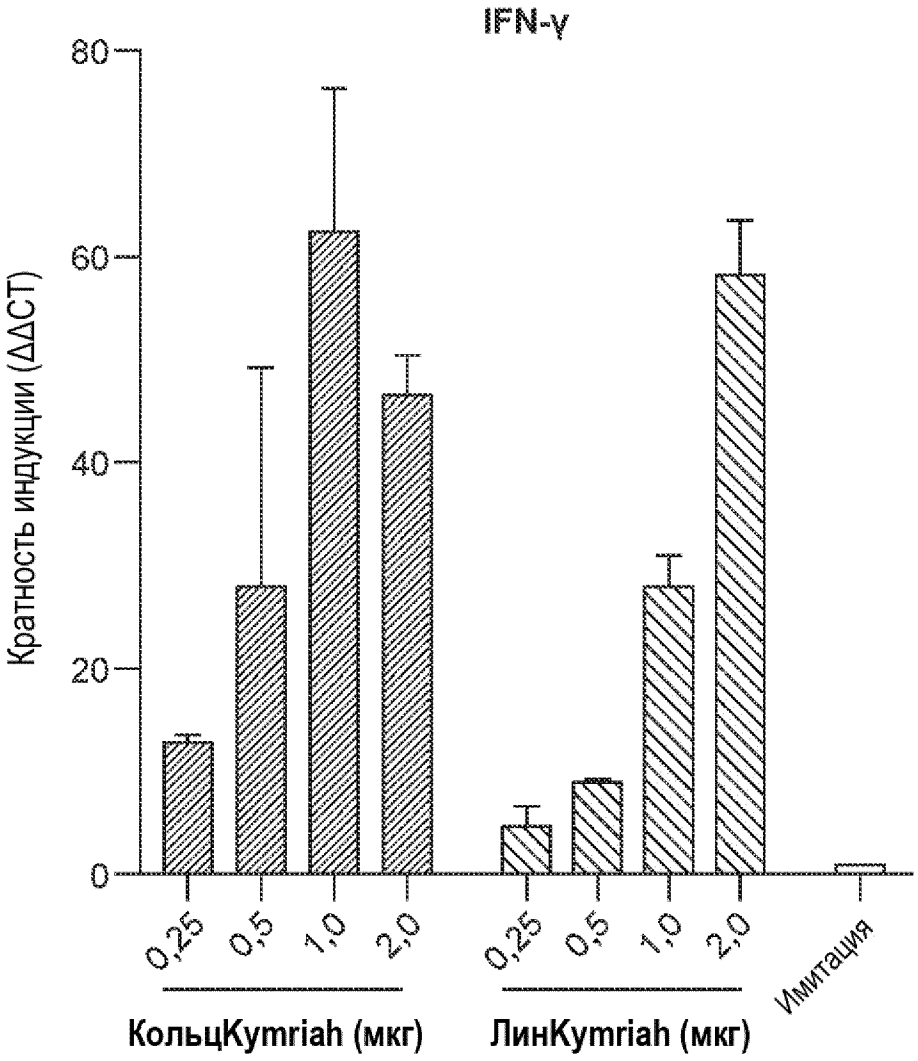
Фиг. 20E



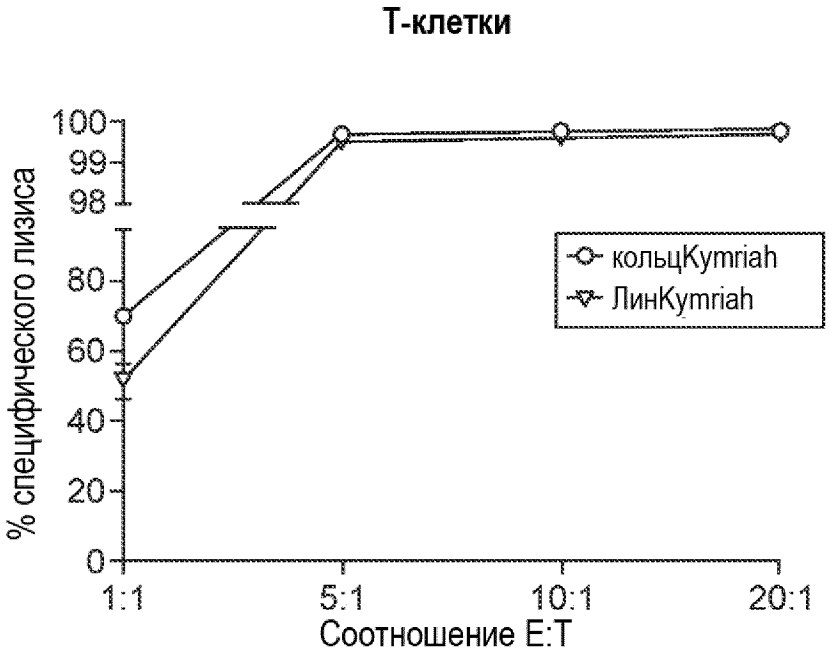
Фиг. 20F


Т-клетки
% специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
0,25
0,5
1,0
КольцKymriah (мкг)

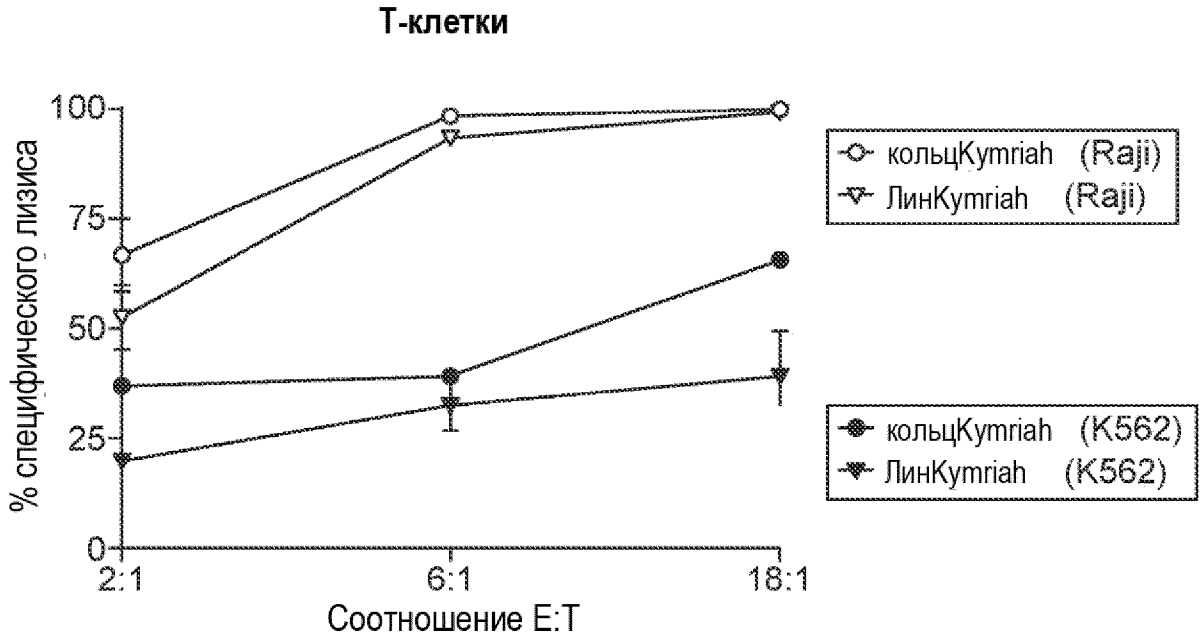
Фиг. 21A


IFN-γ
Кратность индукции (ΔΔCT)
80
60
40
20
0
0,25
0,5
1,0
2,0
0,25
0,5
1,0
2,0
Имитация
КольцКymriah (мкг)
ЛинКymriah (мкг)

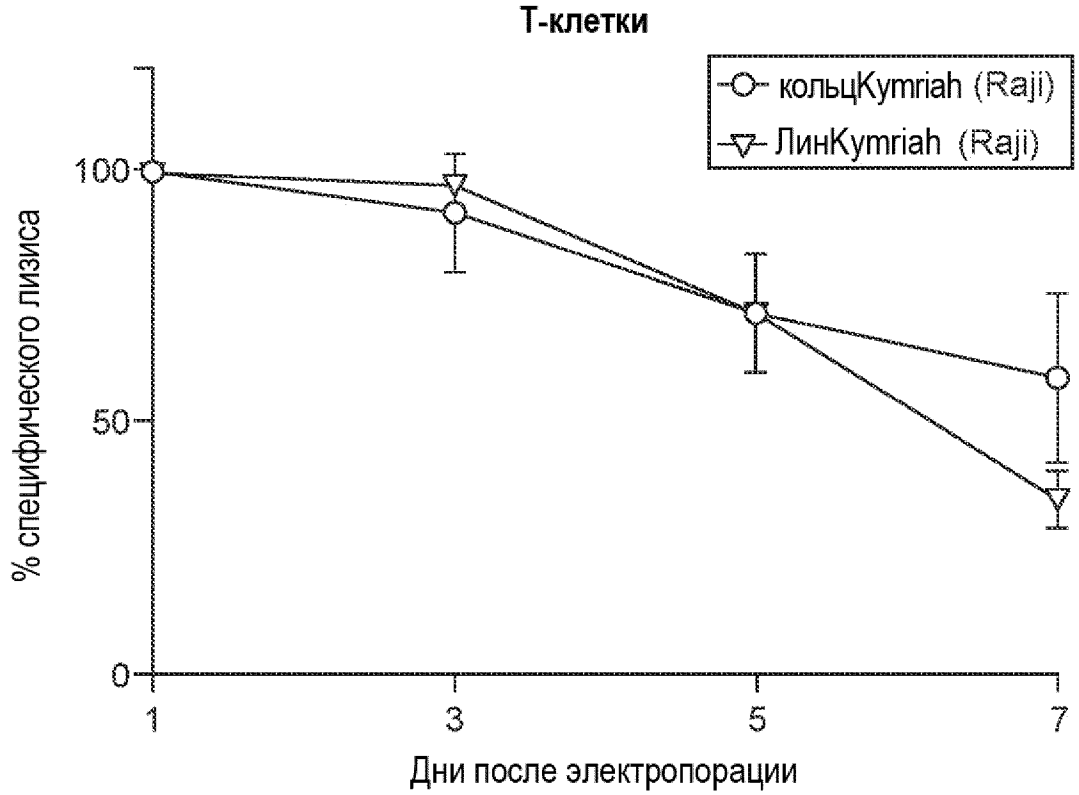
Фиг. 21B



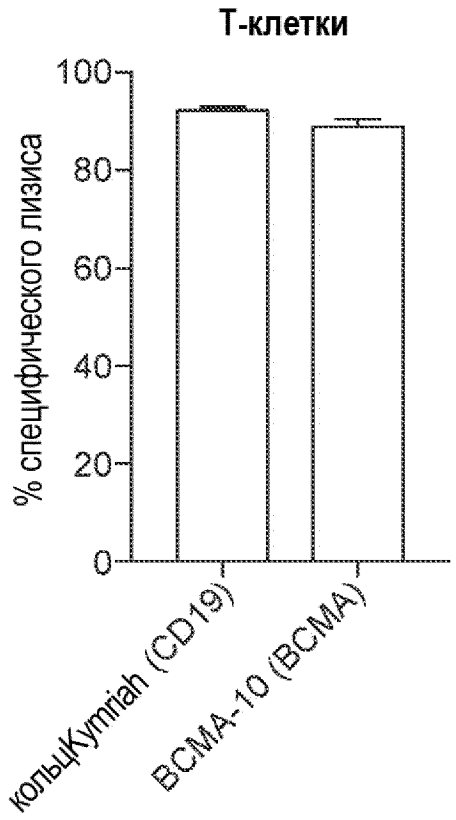
Фиг. 22A



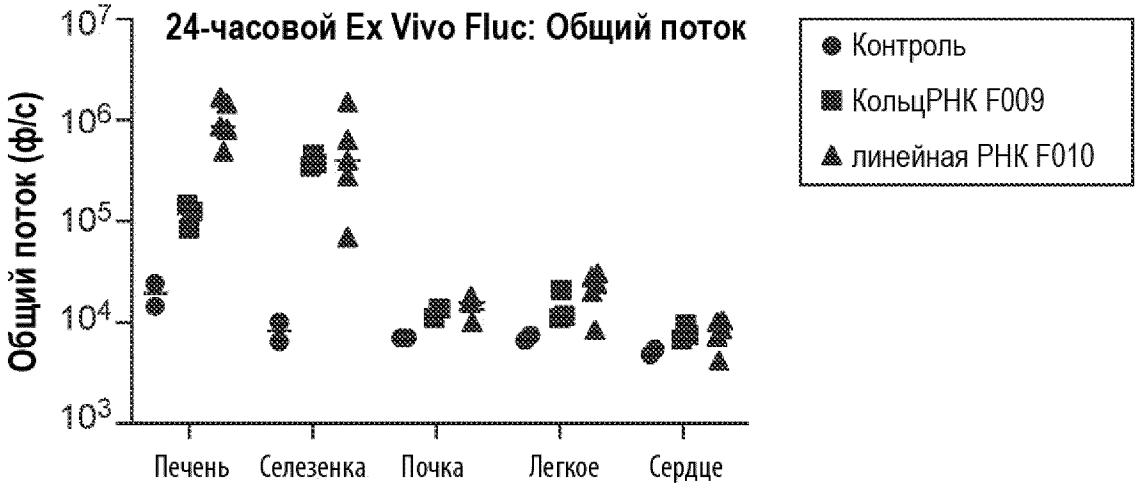
Фиг. 22B


Т-клетки
кольцKymriah (Raji)
ЛинKymriah (Raji)
% специфического лизиса
100
50
0
1
3
5
7
Дни после электропорации

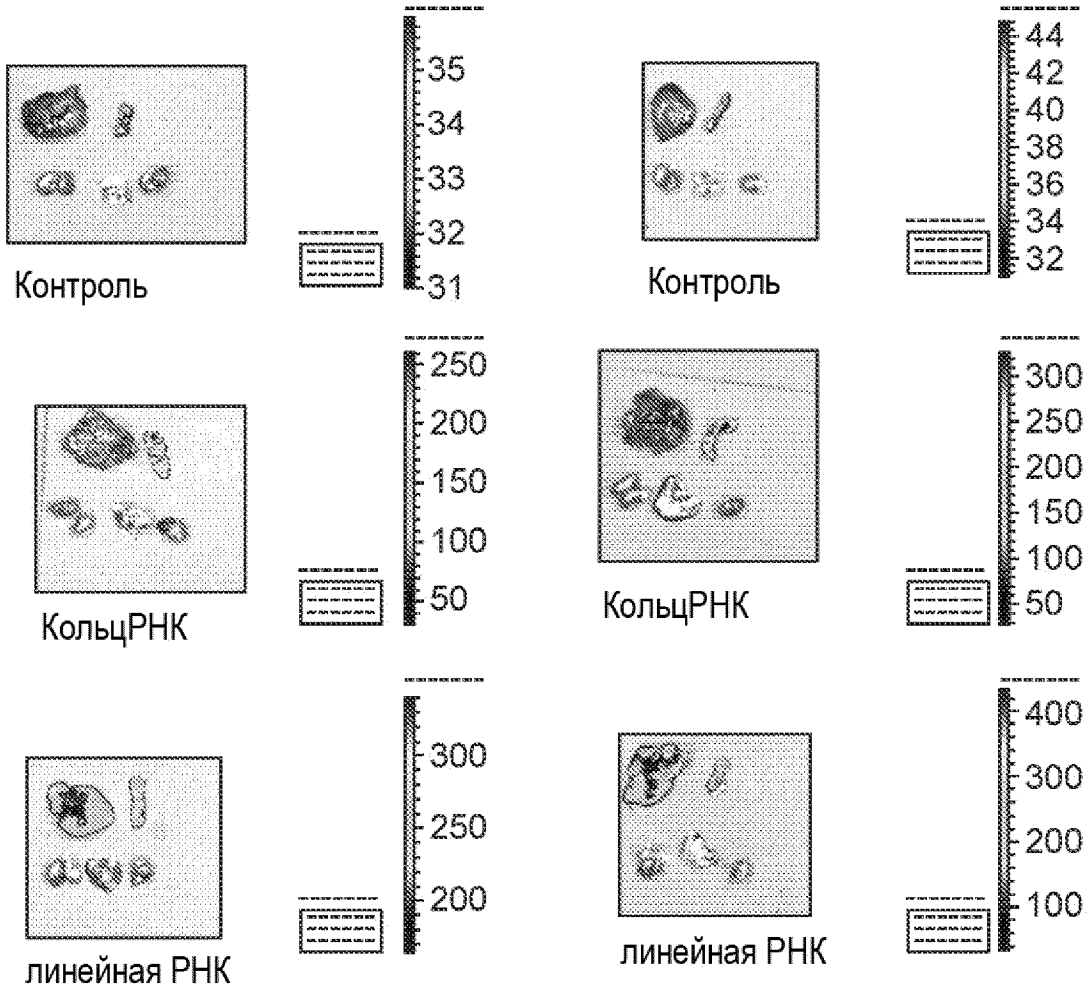
Фиг. 23


Т-клетки
% специфического лизиса
100
80
60
40
20
0
кольцКуmriah (CD19)
BCMA-10 (BCMA)

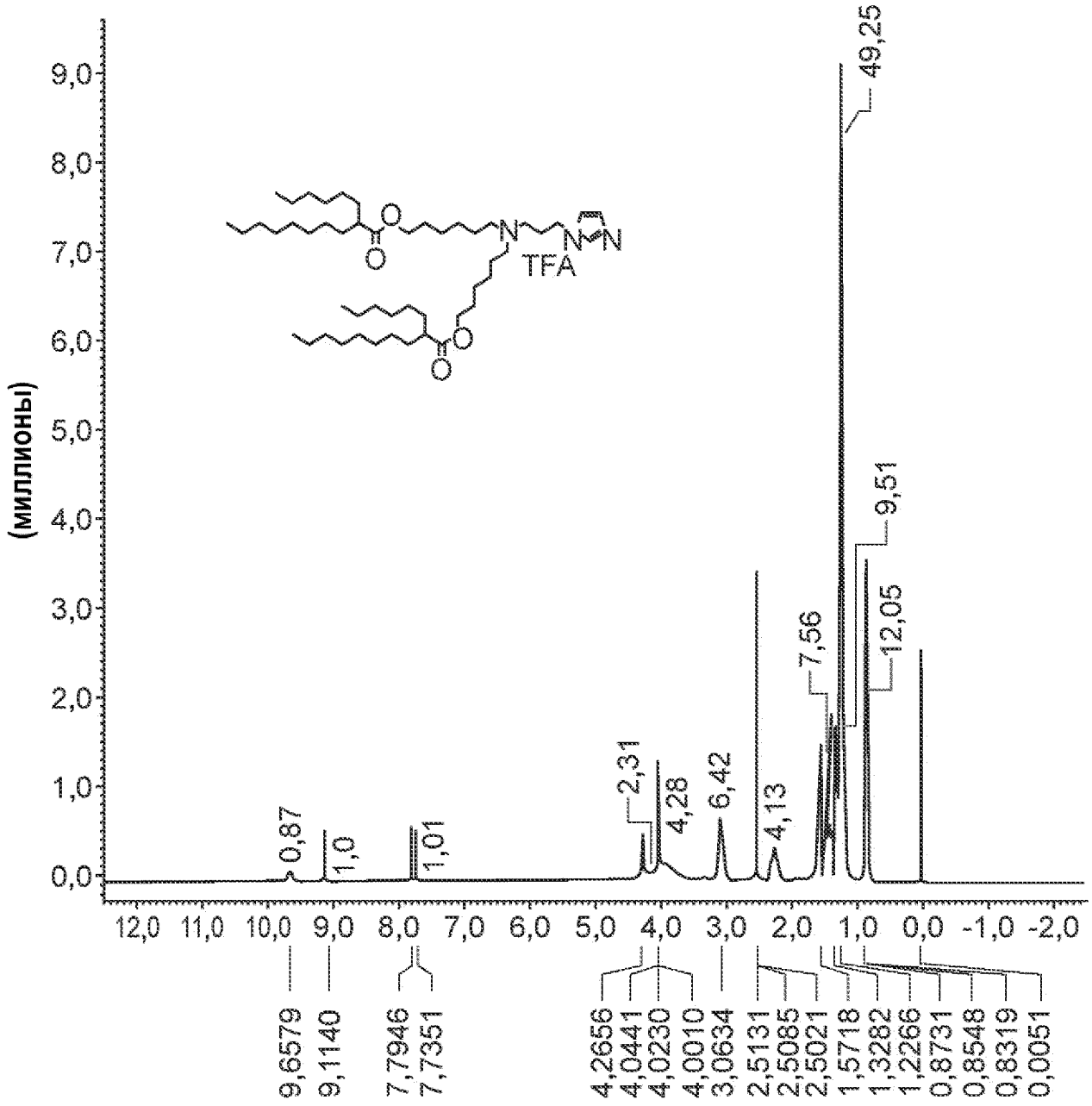
Фиг. 24


24-часовой Ex Vivo Fluc: Общий поток
Общий поток (ф/с)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
Печень
Селезенка
Почка
Легкое
Сердце
Контроль
КольцРНК F009
линейная РНК F010

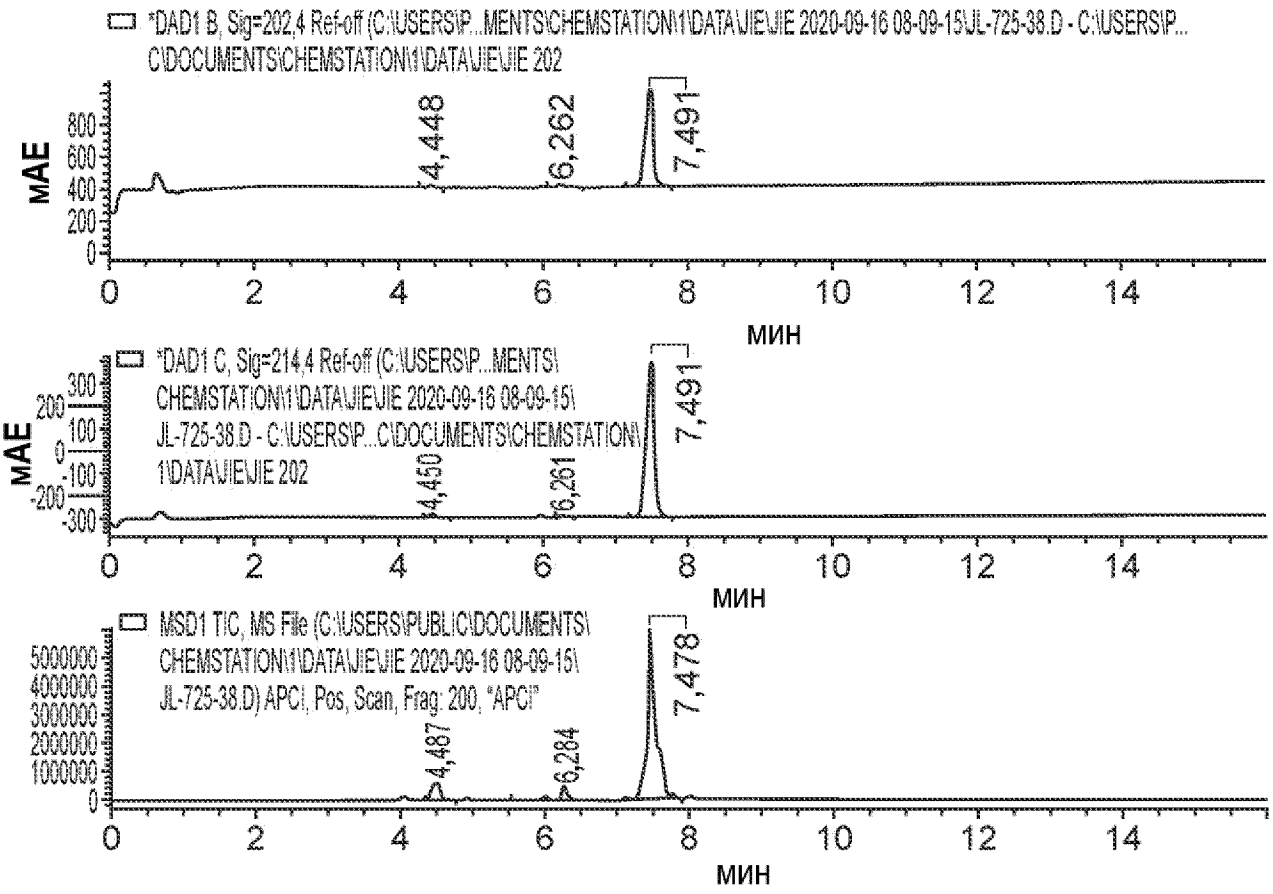
Фиг. 25


Контроль
35
34
33
32
31
Контроль
44
42
40
38
36
34
32
КольцРНК
250
200
150
100
50
КольцРНК
300
250
200
150
100
50
линейная РНК
300
250
200
линейная РНК
400
300
200
100

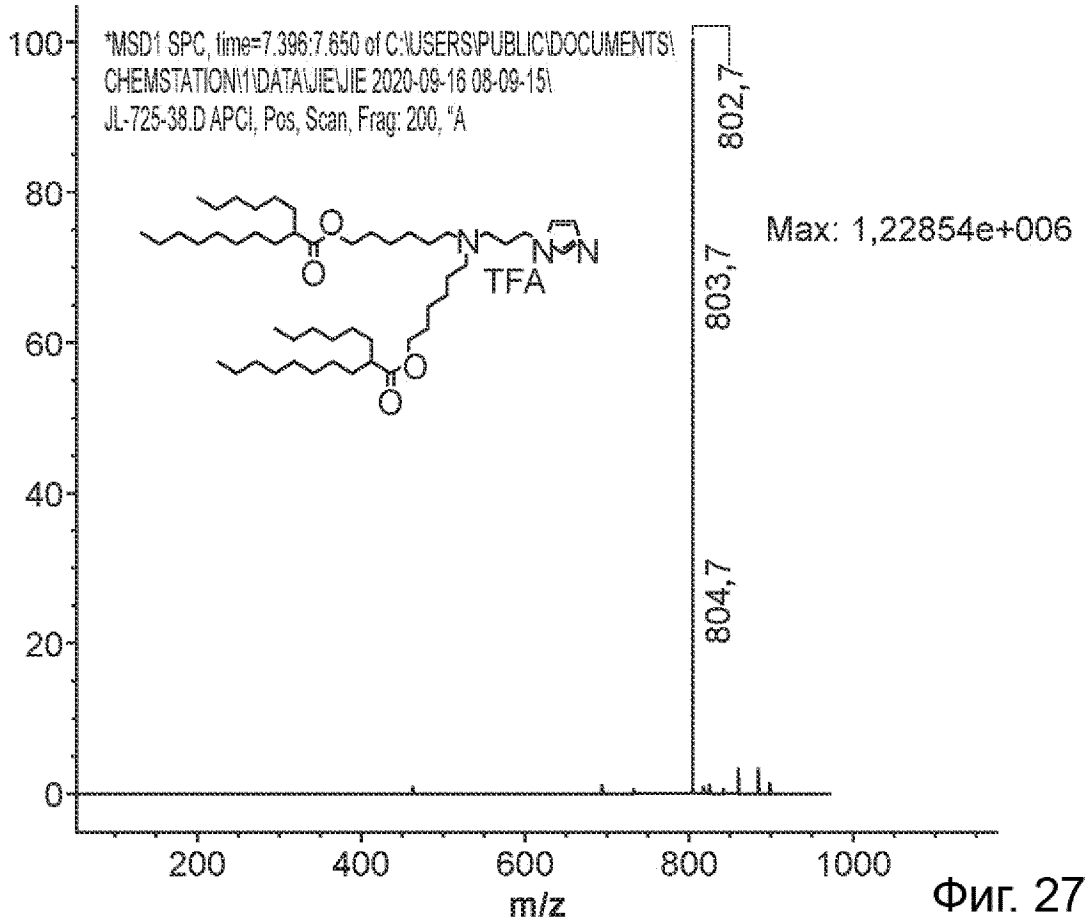
Фиг. 26


(миллионы)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
TFA
49,25
9,51
12,05
7,56
2,31
4,28
6,42
4,13
0,87
1,0
1,01
12,0 11,0 10,0 9,0 8,0 7,0 6,0 5,0 4,0 3,0 2,0 1,0 0,0 -1,0 -2,0
9,6579
9,1140
7,7946
7,7351
4,2656
4,0441
4,0230
4,0010
3,0634
2,5131
2,5085
2,5021
1,5718
1,3282
1,2266
0,8731
0,8548
0,8319
0,0051

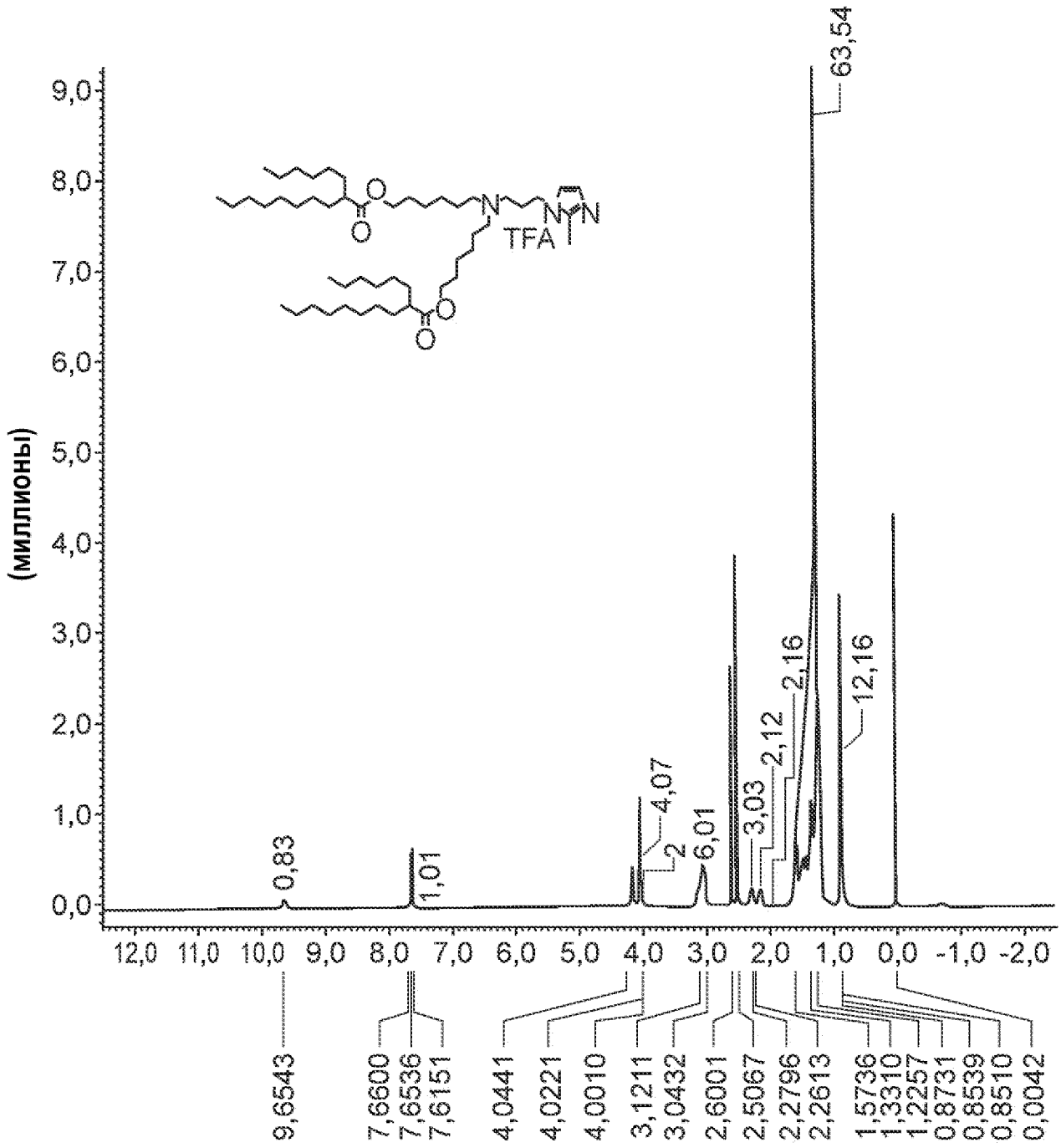
Фиг. 27A



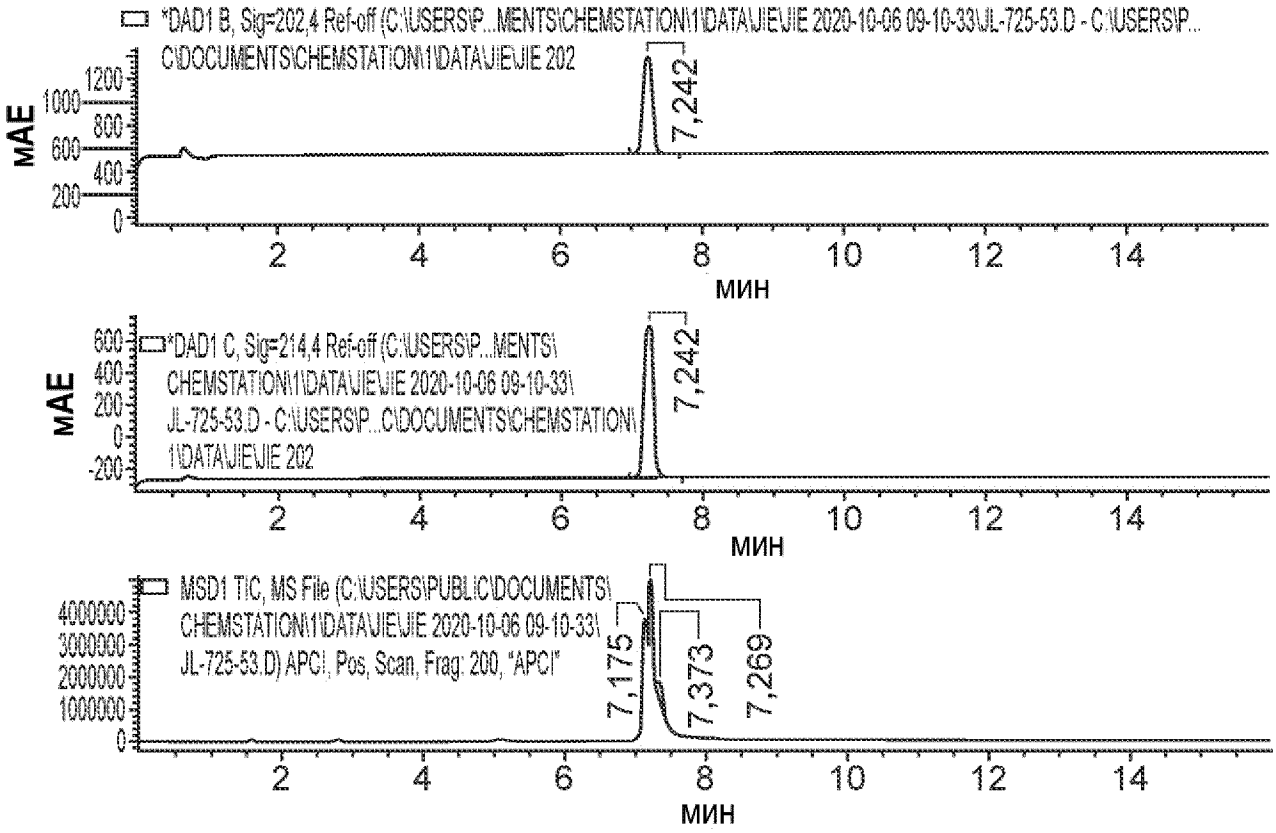
Фиг. 27B



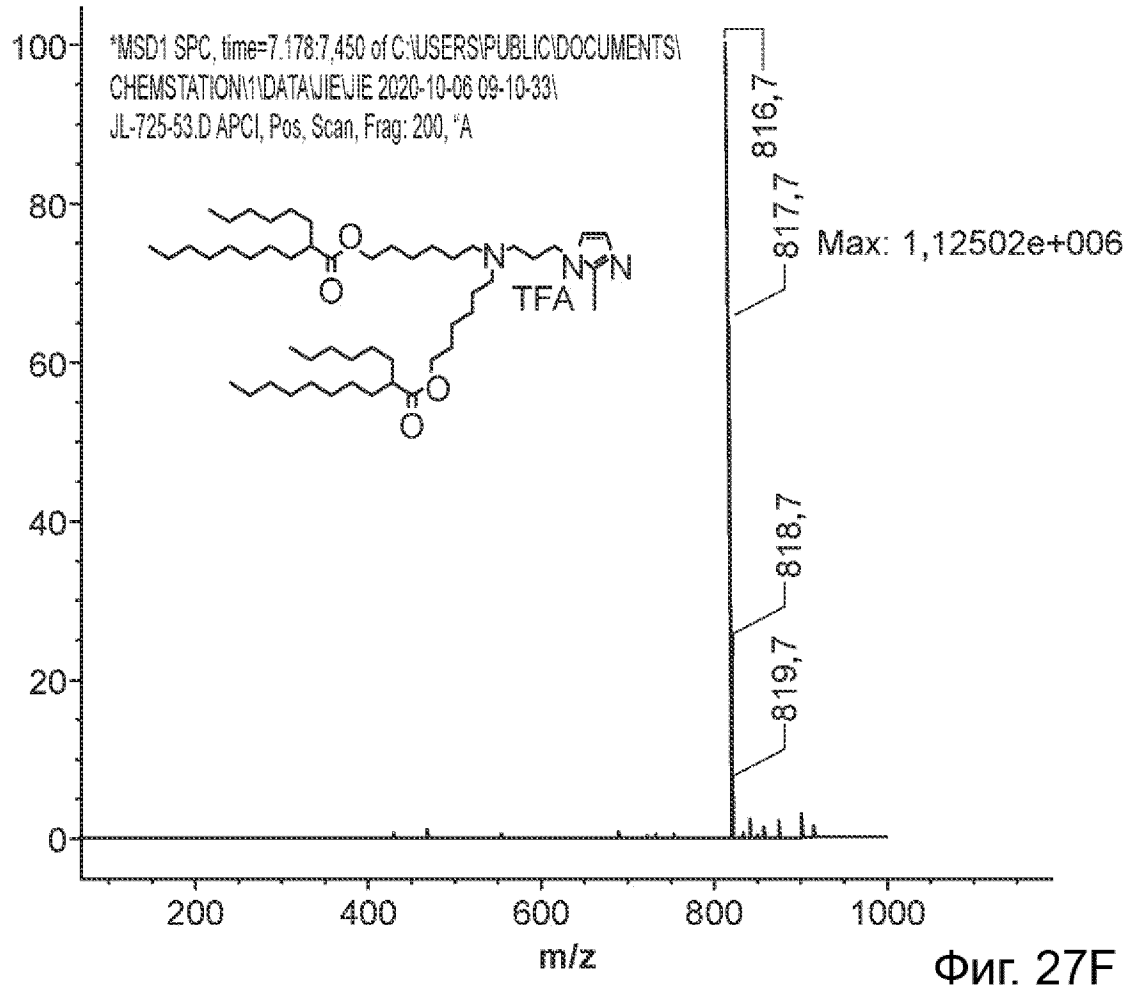
Фиг. 27C


(миллионы)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
TFA
63,54
12,16
2,16
2,12
4,07
3,03
6,01
1,01
0,83
12,0 11,0 10,0 9,0 8,0 7,0 6,0 5,0 4,0 3,0 2,0 1,0 0,0 -1,0 -2,0
9,6543
7,6600
7,6536
7,6151
4,0441
4,0221
4,0010
3,1211
3,0432
2,6001
2,5067
2,2796
2,2613
1,5736
1,3310
1,2257
0,8731
0,8539
0,8510
0,0042

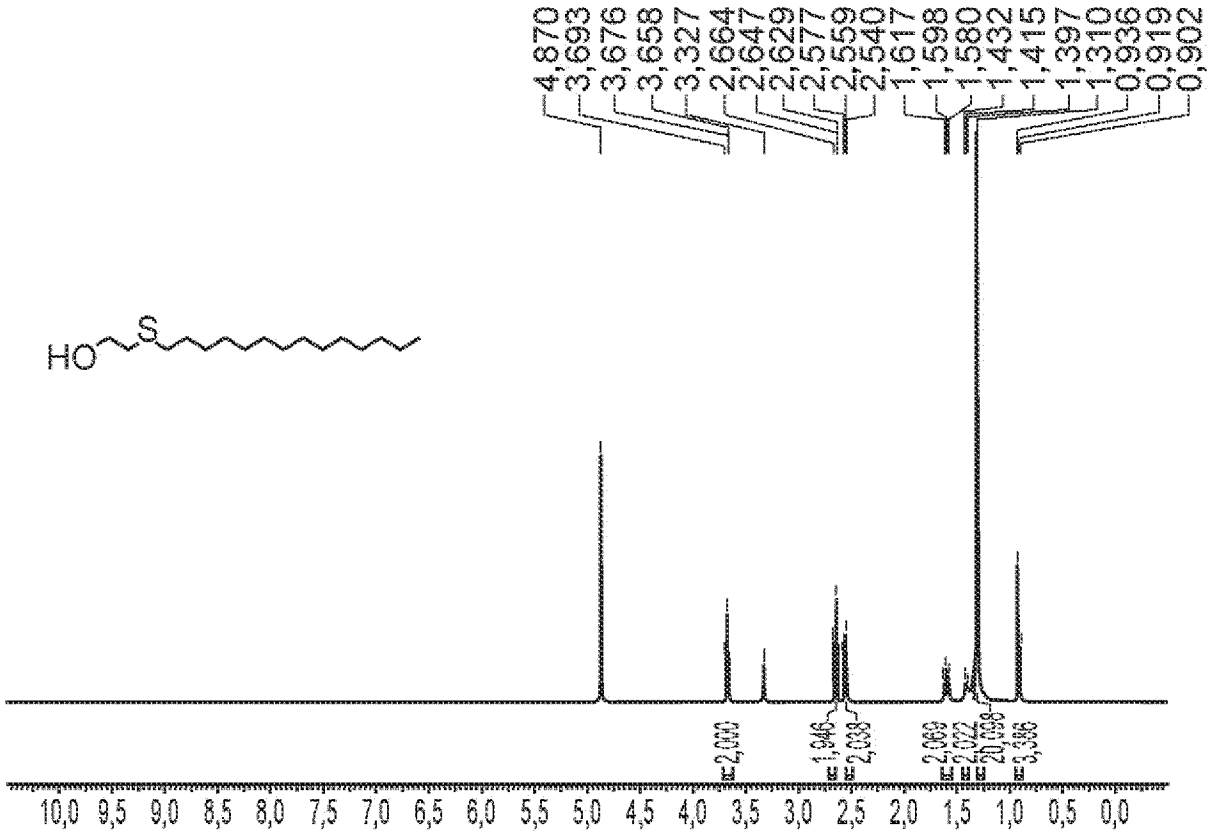
Фиг. 27D



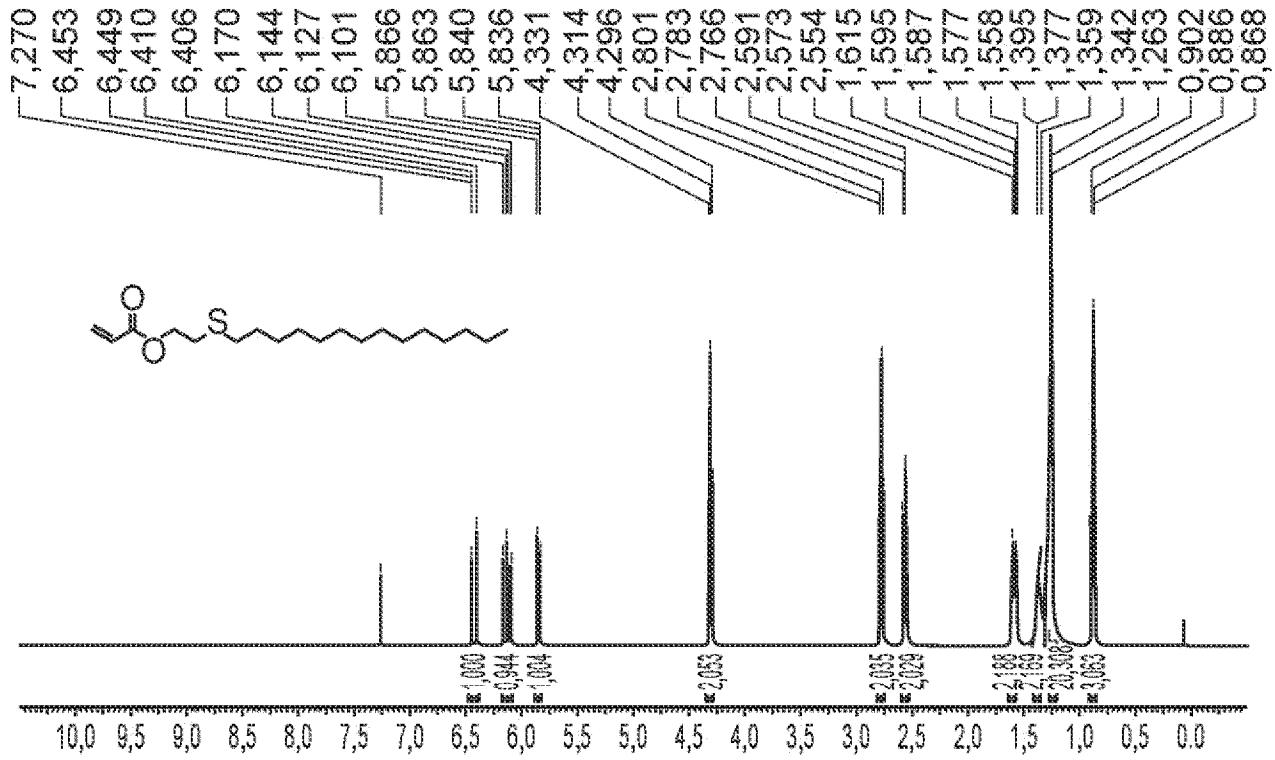
Фиг. 27E



Фиг. 27F



Фиг. 28A



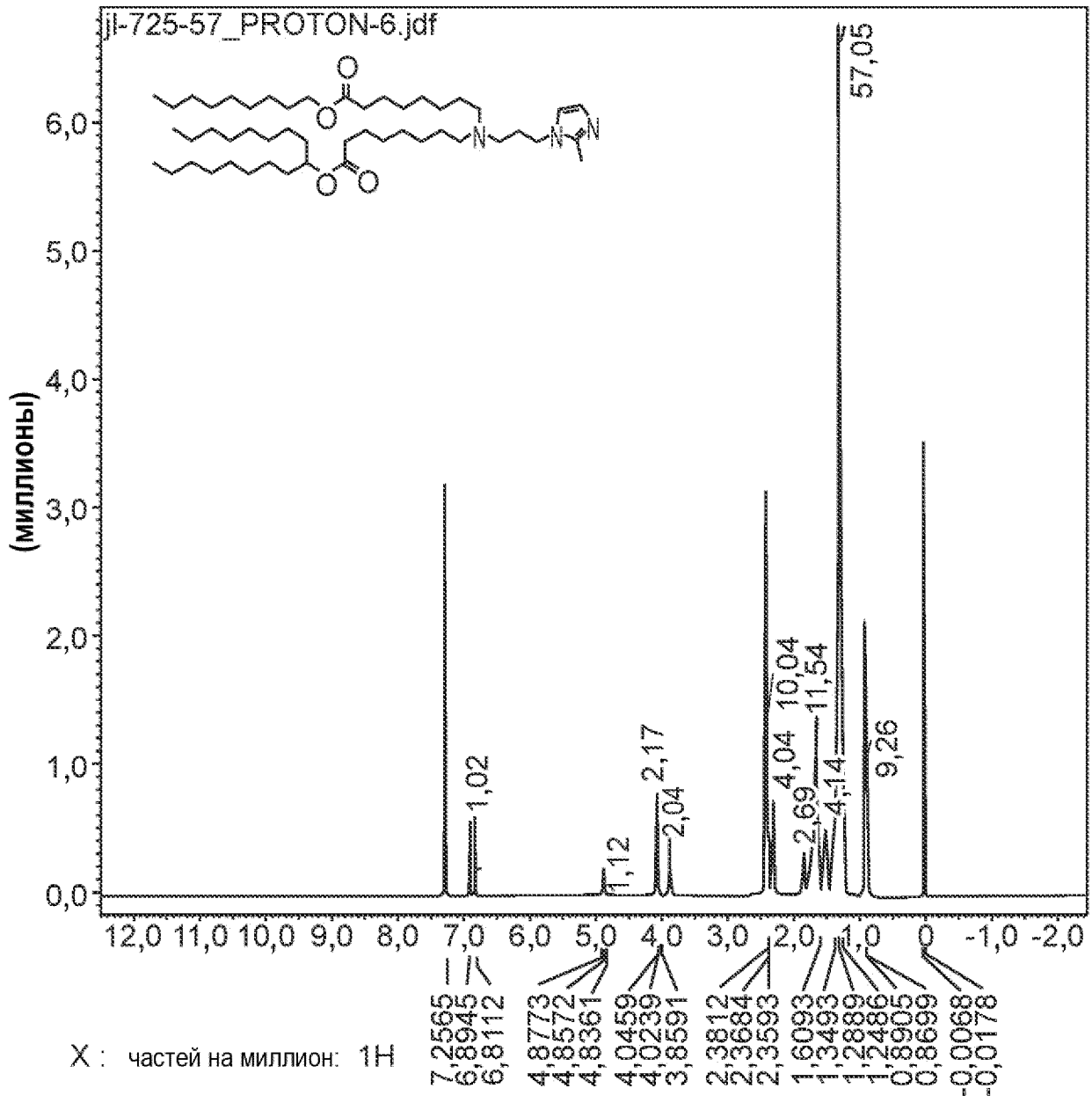
Фиг. 28B

7,270
6,903
6,887
6,867
4,239
4,221
4,203
3,870
3,853
3,834
2,772
2,752
2,735
2,717
2,563
2,545
2,526
2,444
2,426
2,378
1,868
1,600
1,580
1,562
1,388
1,370
1,352
1,262
0,902
0,886
0,868
0,943
1,020
4,161
2,011
8,165
4,121
6,099
3,052
2,301
4,234
4,165
40,285
6,000
10,0 9,5 9,0 8,5 8,0 7,5 7,0 6,5 6,0 5,5 5,0 4,5 4,0 3,5 3,0 2,5 2,0 1,5 1,0 0,5 0

Фиг. 28C

7,513
7,270
7,057
6,954
4,241
4,224
4,206
3,984
3,967
3,950
2,754
2,737
2,719
2,563
2,545
2,528
2,448
2,431
2,414
2,382
2,317
1,598
1,579
1,560
1,386
1,368
1,351
1,260
0,900
0,884
0,866
1,008
1,020
0,970
3,981
1,914
7,942
3,980
5,851
1,949
4,093
4,169
40,141
6,000
10,0 9,5 9,0 8,5 8,0 7,5 7,0 6,5 6,0 5,5 5,0 4,5 4,0 3,5 3,0 2,5 2,0 1,5 1,0 0,5 0

Фиг. 29


jl-725-57_PROTON-6.jdf
(миллионы)
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
57,05
1,02
1,12
2,17
2,04
4,04
10,04
11,54
2,69
4,14
9,26
12,0 11,0 10,0 9,0 8,0 7,0 6,0 5,0 4,0 3,0 2,0 1,0 0 -1,0 -2,0
X : частей на миллион: 1H
7,2565
6,8945
6,8112
4,8773
4,8572
4,8361
4,0459
4,0239
3,8591
2,3812
2,3684
2,3593
1,6093
1,3493
1,2889
1,2486
0,8905
0,8699
-0,0068
-0,0178

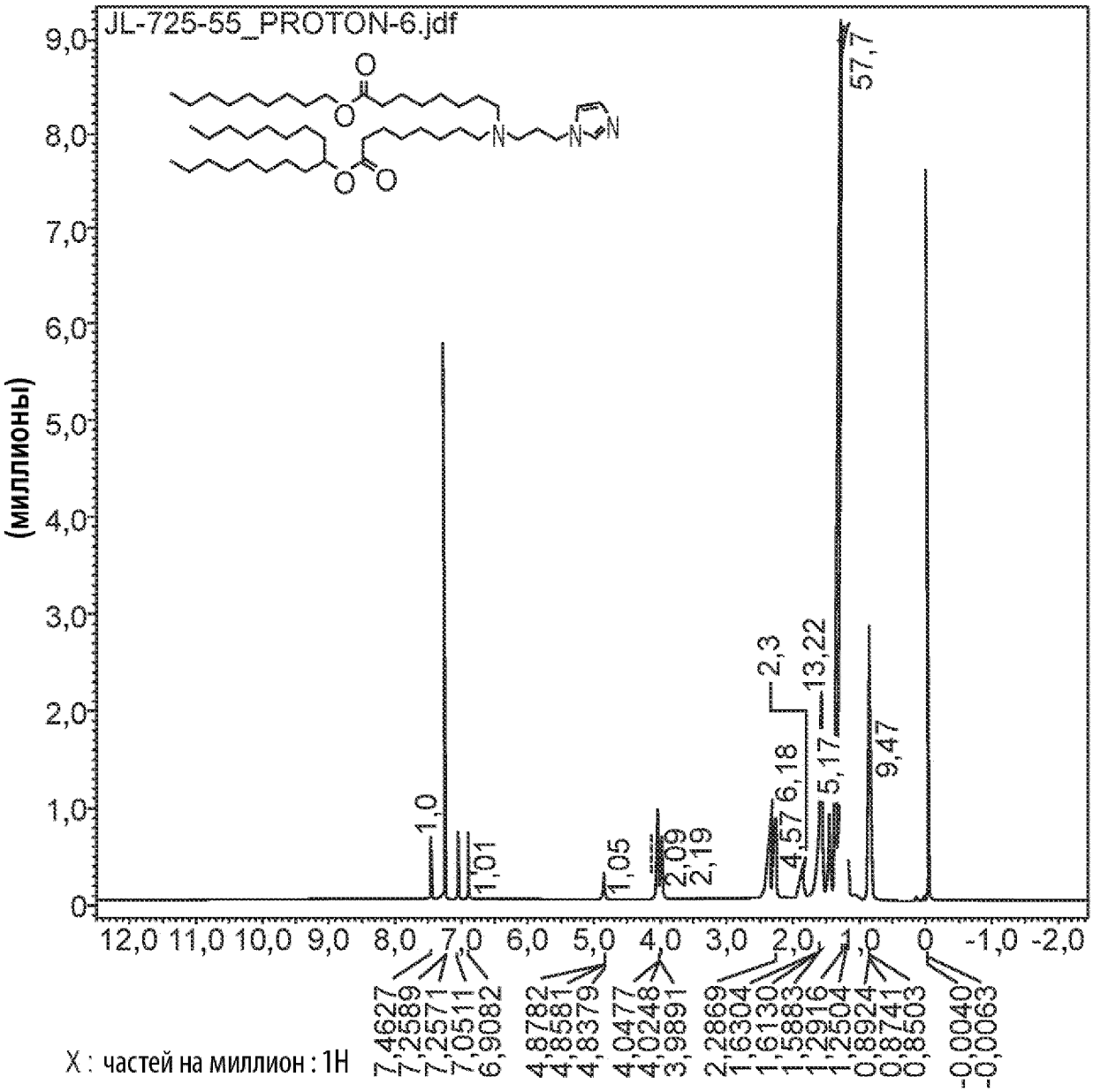
Фиг. 30A

*DAD1 B, Sig=202,4 Ref=off(C:\USERS\P...MENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-57.D - C:\USERS\P...DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-
6,802
мАЕ
200
0
-200
-400
-600
2
4
6
8
10
12
14
мин
*DAD1 C , Sig=214,4 Ref=off(C:\USERS\P...MENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-57.D - C:\USERS\P...DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-
6,802
мАЕ
400
300
200
100
0
2
4
6
8
10
12
14
мин
MSD1 TIC. MS File (C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 06-29-11\JL-725-57.D) APCI, POS, Scan, Frag: 200, "APCI"
6,779
мАЕ
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
2
4
6
8
10
12
14
мин
G6135B LCMS 10/1/2020 1:06:23 PM SYSTEM
Страница 1 из 3

Фиг. 30B

*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
Max: 28871
789,7
788,7
790,8
791,8
100
80
60
40
20
0
400
500
600
700
800
m\z

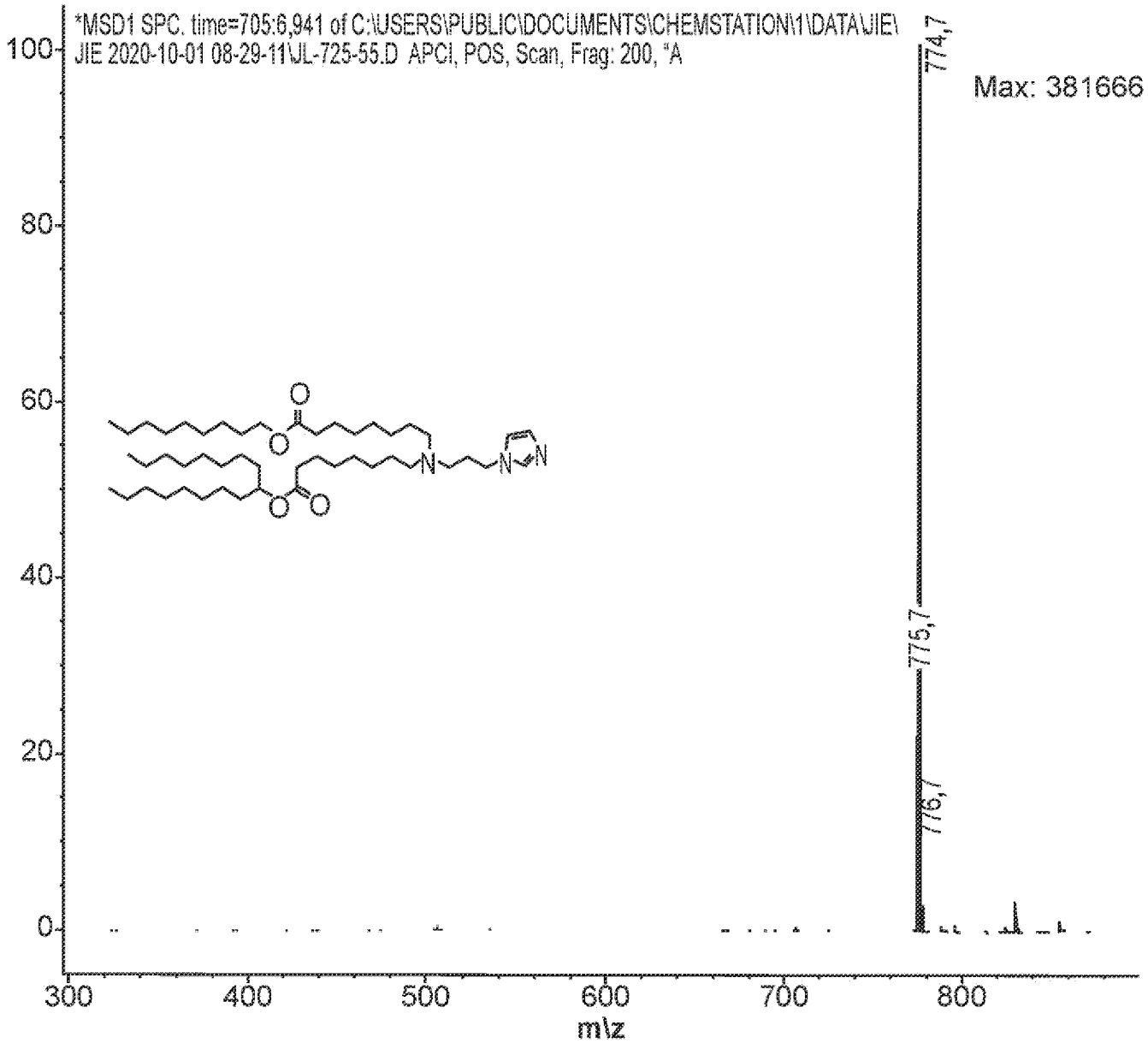
Фиг. 30C


JL-725-55_PROTON-6.jdf
(миллионы)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0
12,0 11,0 10,0 9,0 8,0 7,0 6,0 5,0 4,0 3,0 2,0 1,0 0 -1,0 -2,0
1,0
1,01
1,05
2,09
2,19
4,57
6,18
5,17
2,3
13,22
57,7
9,47
7,46277
7,25891
7,25711
7,05113
6,90827
4,87827
4,85811
4,83791
4,04774
4,02481
3,98911
2,28697
1,63041
1,61307
1,58833
1,29167
1,25504
0,89247
0,87417
0,85037
-0,00407
-0,00637
X : частей на миллион : 1H

Фиг. 31A

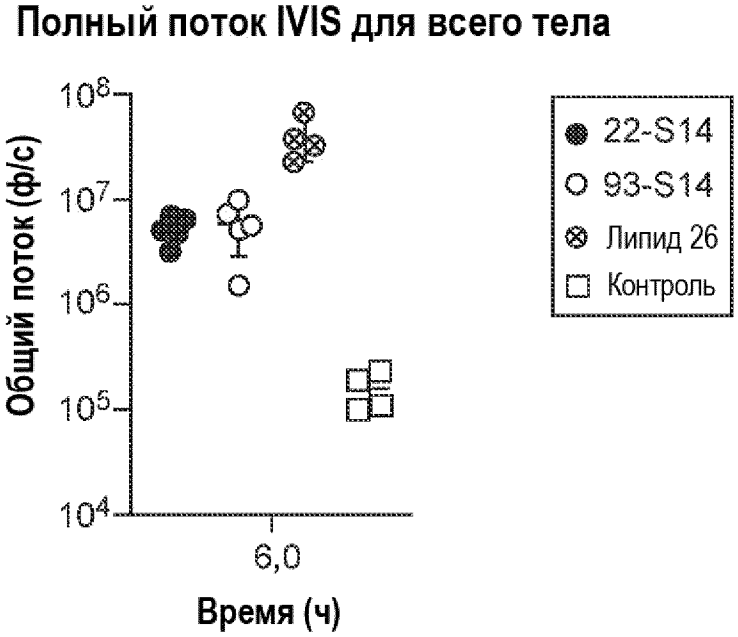
*DAD1 B, Sig=202,4 Ref=off (C:\USERS\P...MENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-55.D - C:\USERS\P...DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-
6,731
7,508
мАЕ
200
0
-200
-400
-600
-800
2
4
6
8
10
12
14
мин
*DAD1 C, Sig=212,4 Ref=off (C:\USERS\P...MENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-55.D - C:\USERS\P...DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-
6,761
7,506
мАЕ
300
200
100
0
-100
-200
-300
2
4
6
8
10
12
14
мин
MSD1 TIC. MS File (C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\JIEJIE 2020-10-01 08-29-11\JL-725-55.D) APCI, Pos, Scan, Frag: 200, "APCI"
6,745
6,918
7,084
7,204
7,576
800000
600000
400000
200000
0
2
4
6
8
10
12
14
мин
G6135B LCMS 10/1/2020 1:08:40 PM SYSTEM
Страница 1 из 3

Фиг. 31B



Фиг. 31C

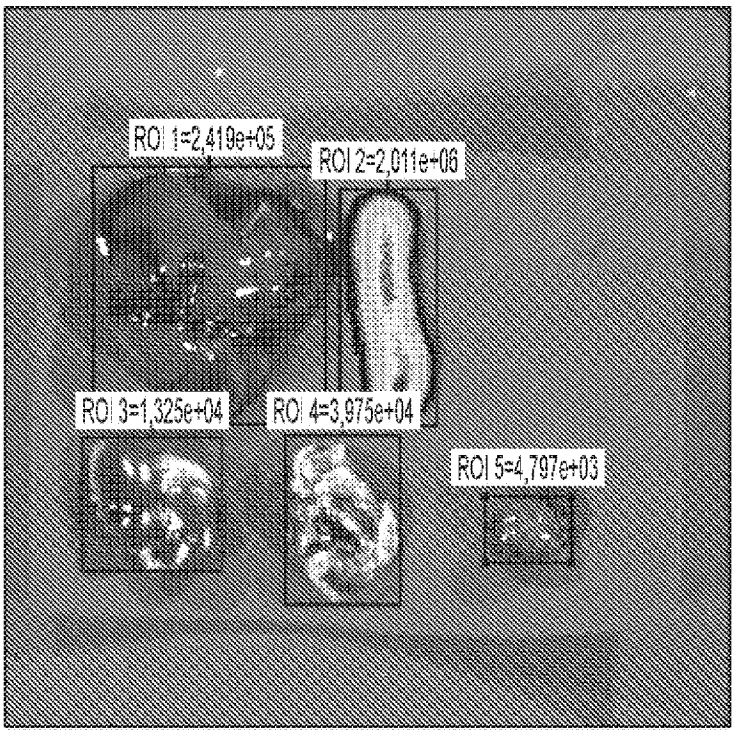
ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА



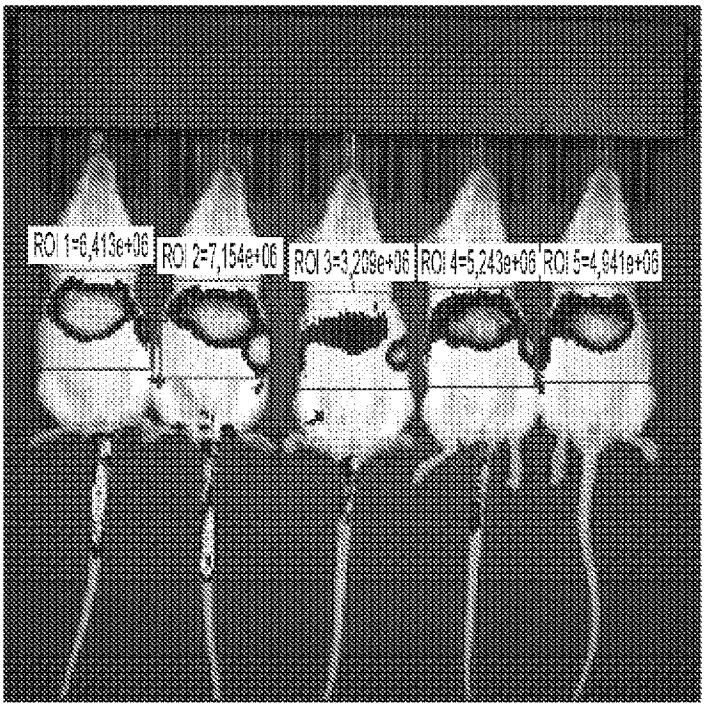
Фиг. 32A



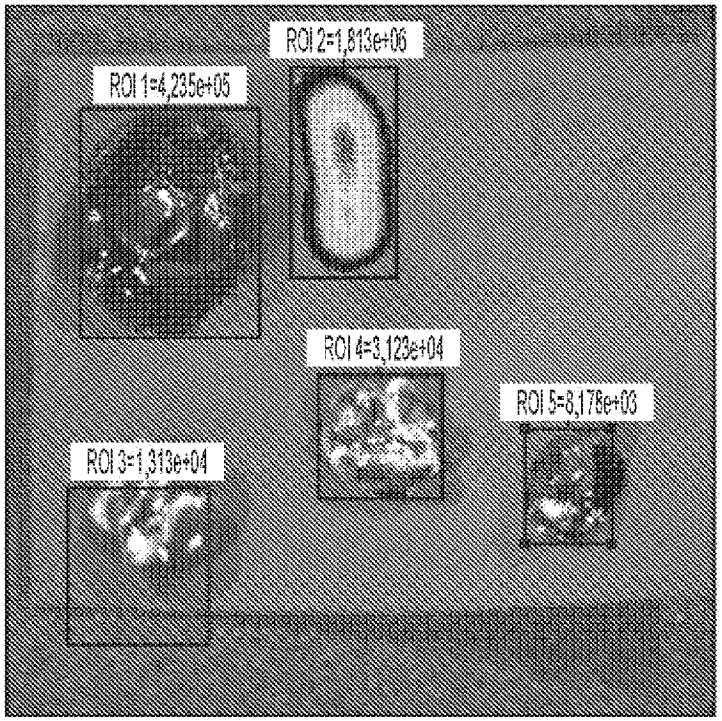
Фиг. 32B



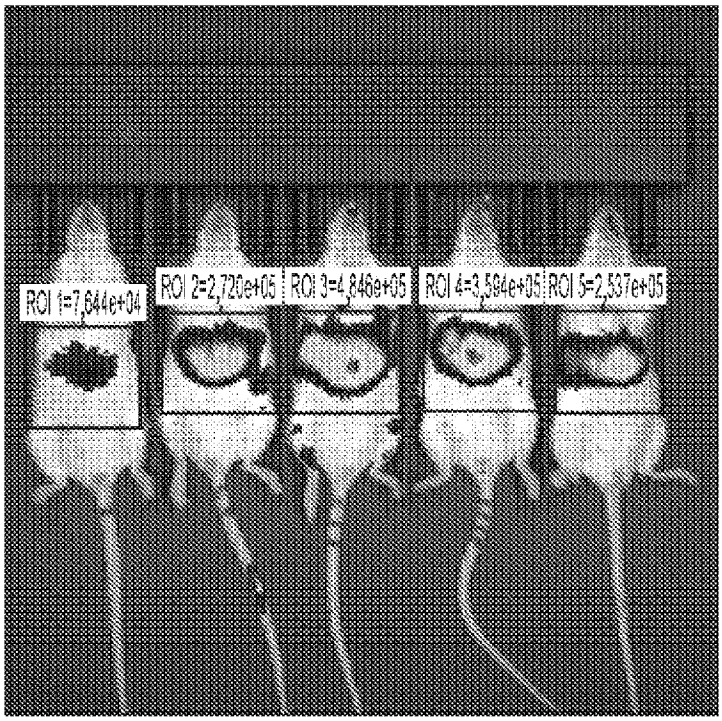
Фиг. 33A



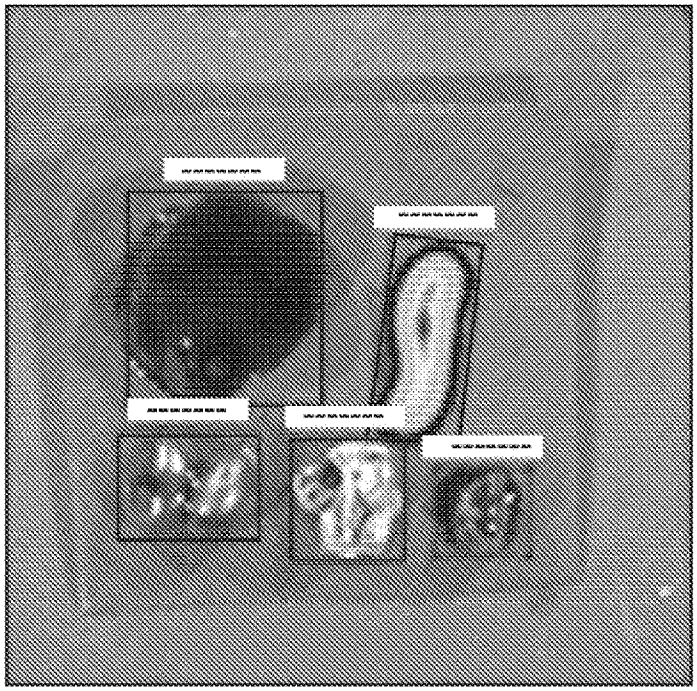
Фиг. 33B



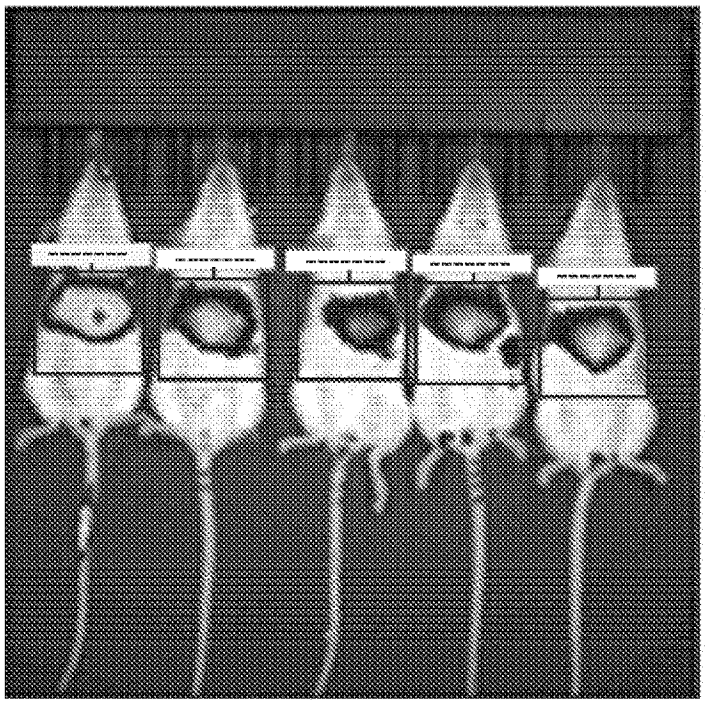
Фиг. 34A



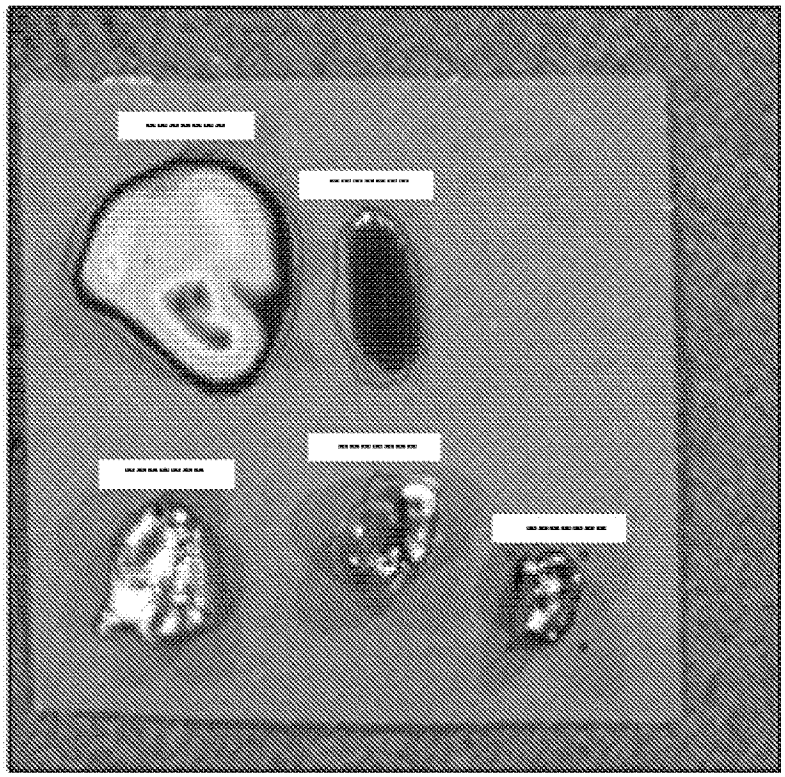
Фиг. 34B



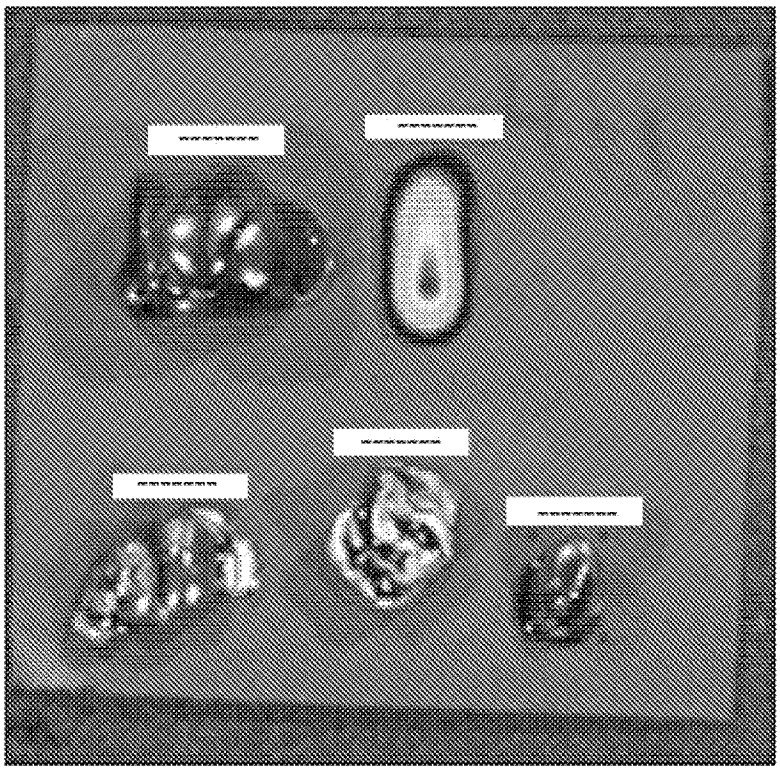
Фиг. 35A



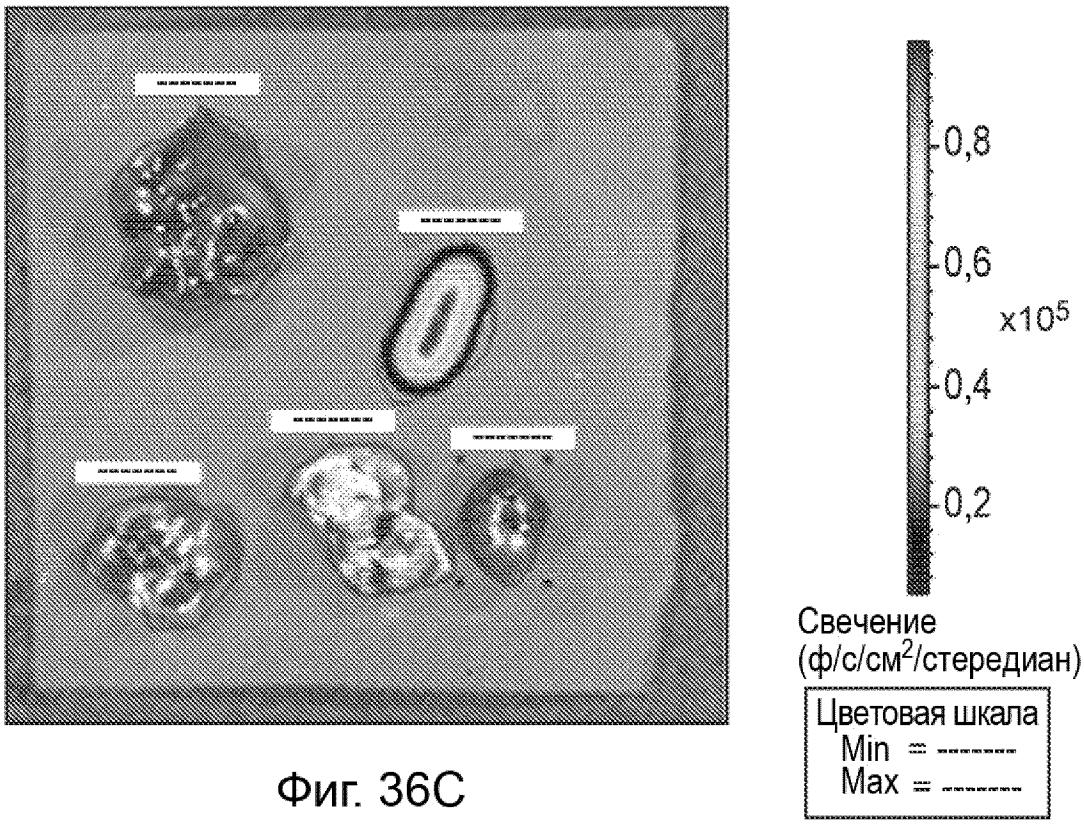
Фиг. 35B



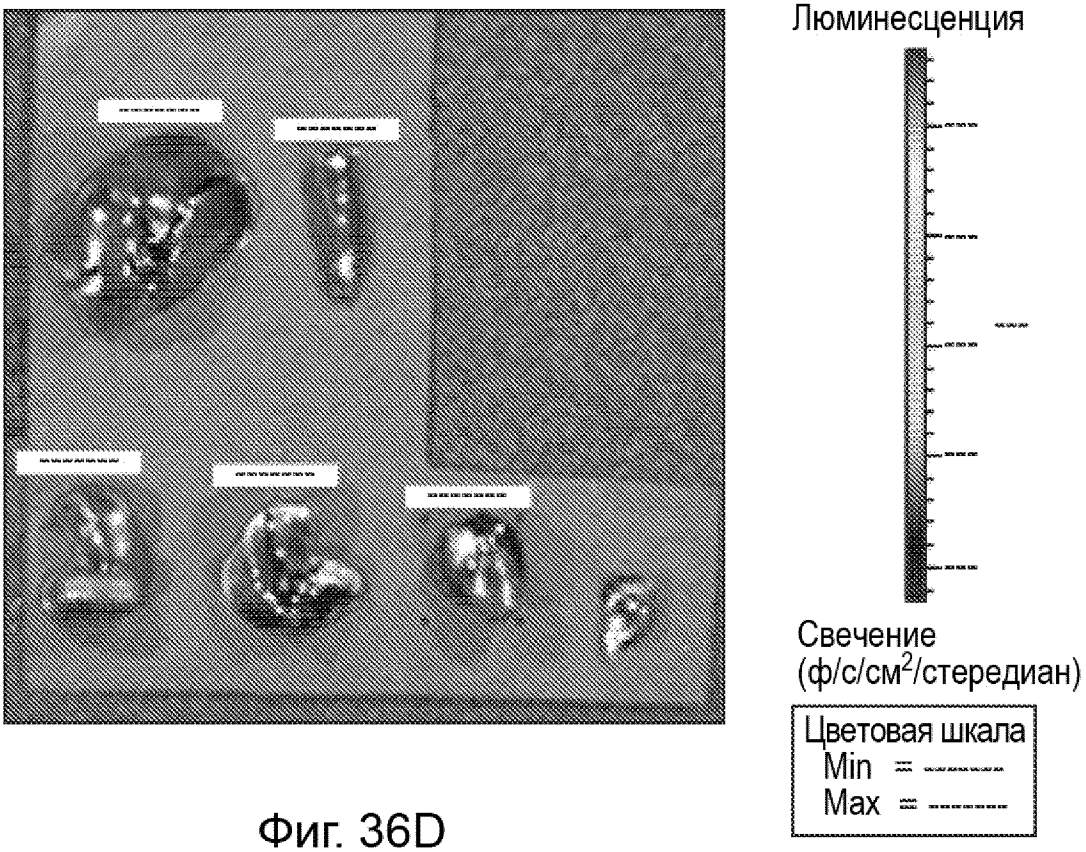
Фиг. 36A



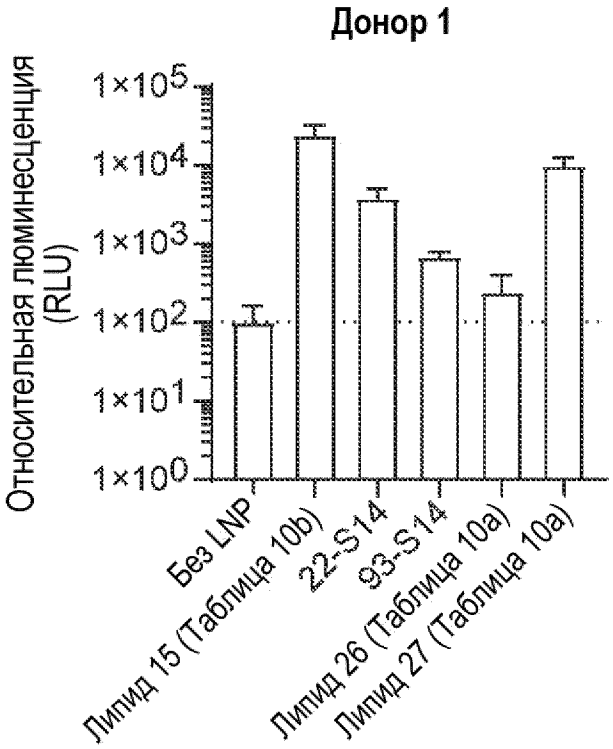
Фиг. 36B



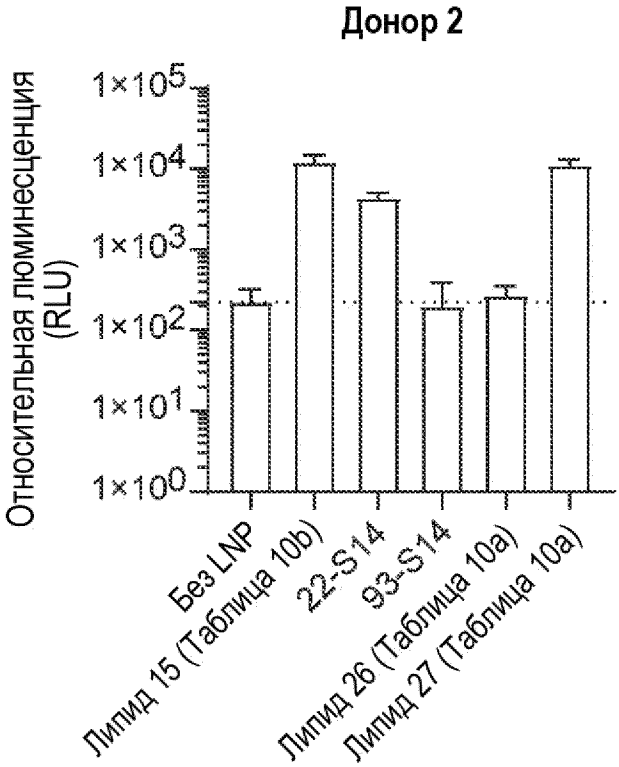
Фиг. 36C



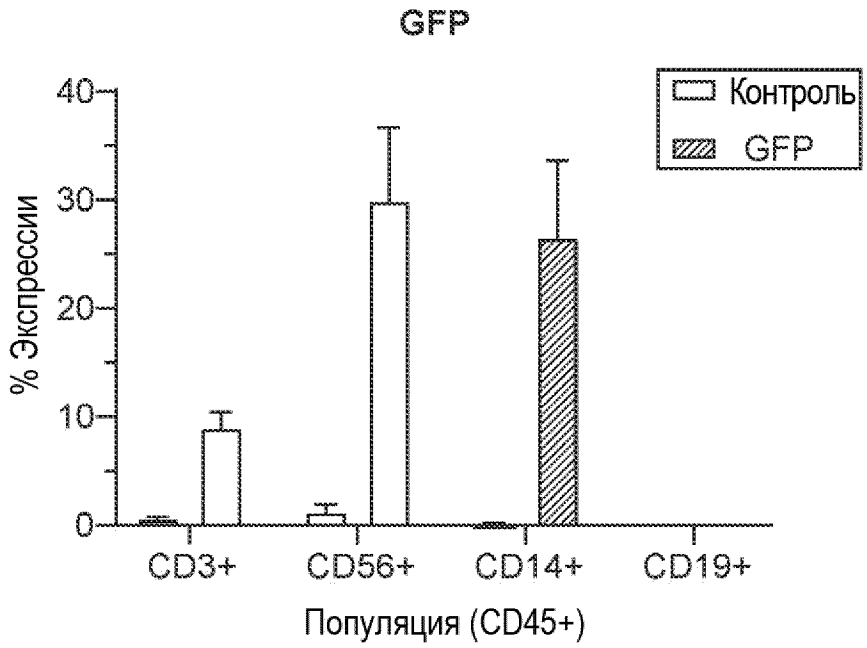
Фиг. 36D



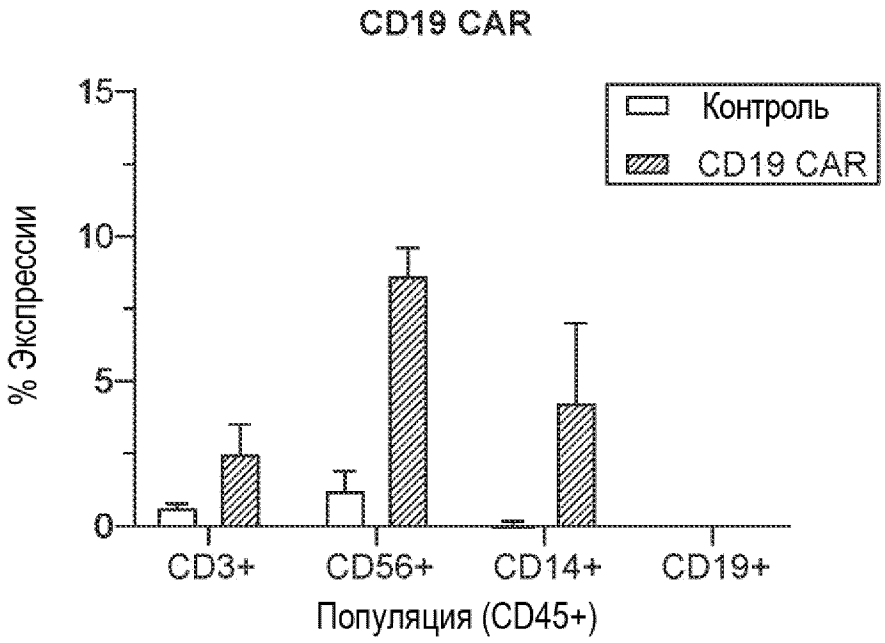
Фиг. 37A



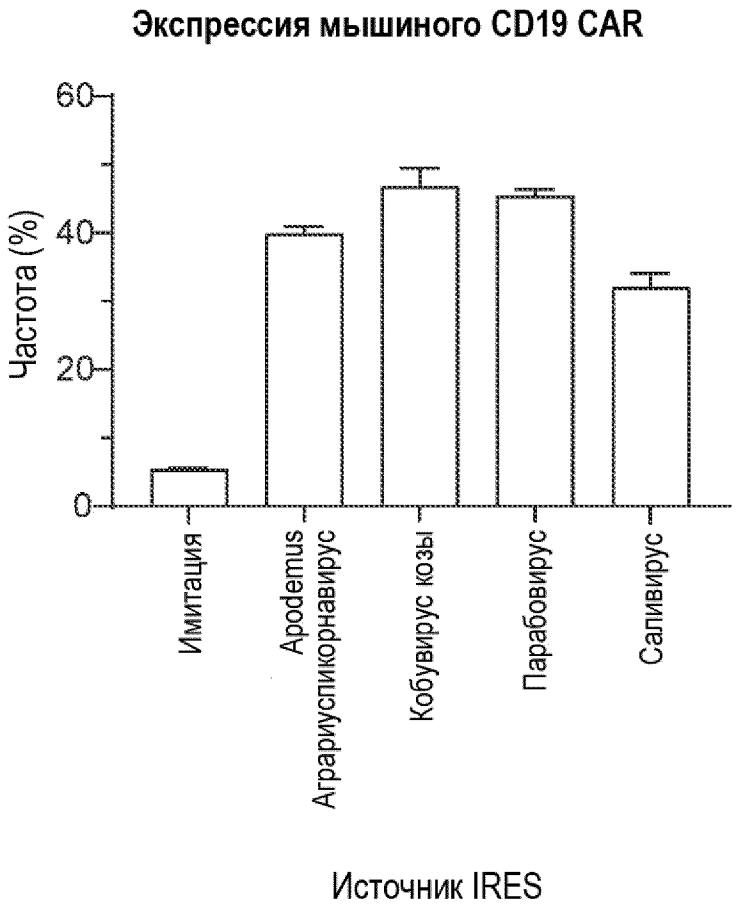
Фиг. 37B



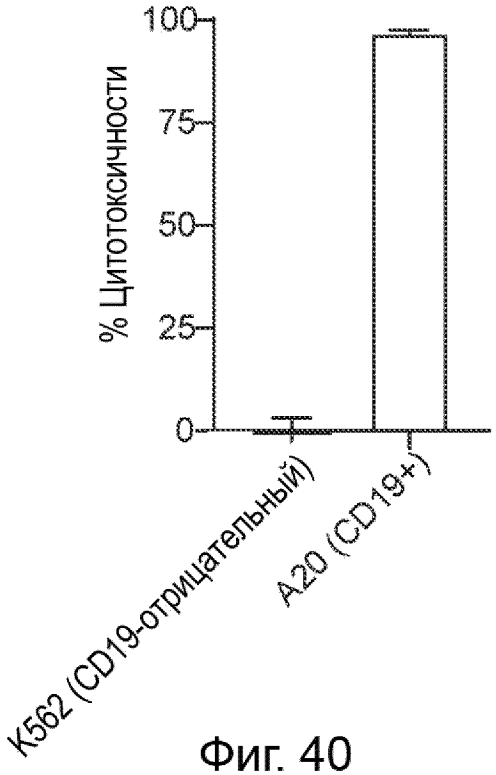
Фиг. 38A



Фиг. 38B

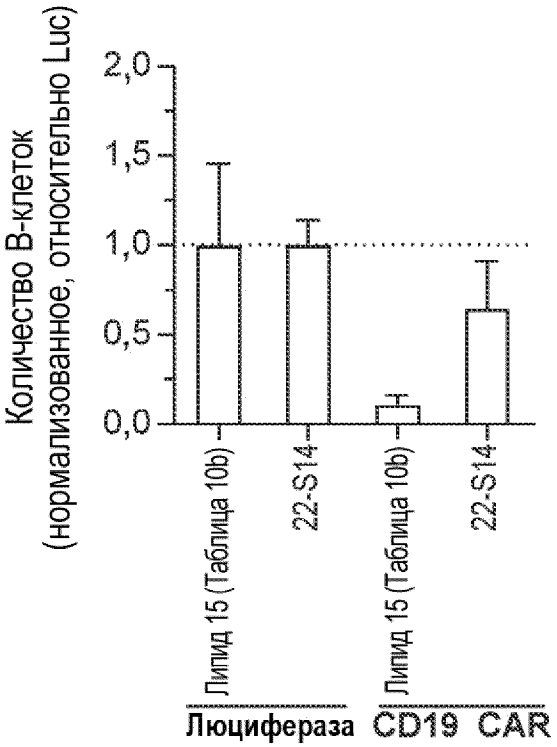

Экспрессия мышиного CD19 CAR
Частота (%)
60
40
20
0
Имитация
Apodemus Аграриусспикорнавирус
Кобувирус козы
Парабовирус
Саливирус
Источник IRES

Фиг. 39


% Цитотоксичности
100
75
50
25
0
K562 (CD19-отрицательный)
A20 (CD19+)

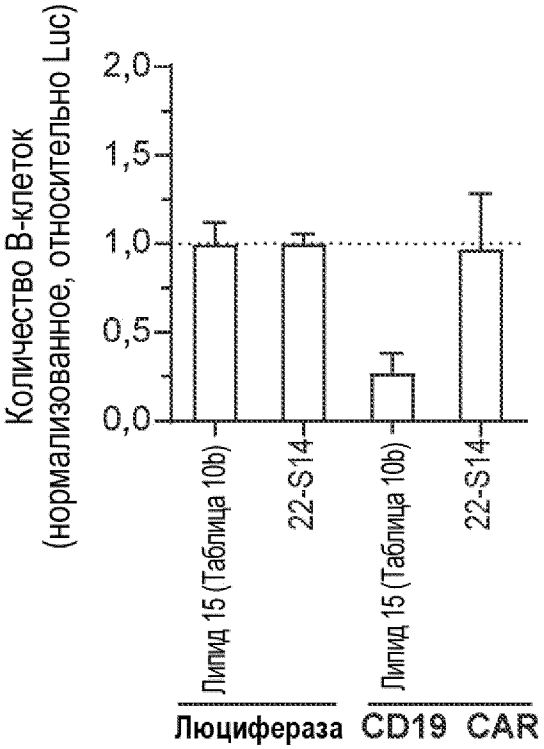
Фиг. 40

День 8 Количество B-клеток в периферической крови

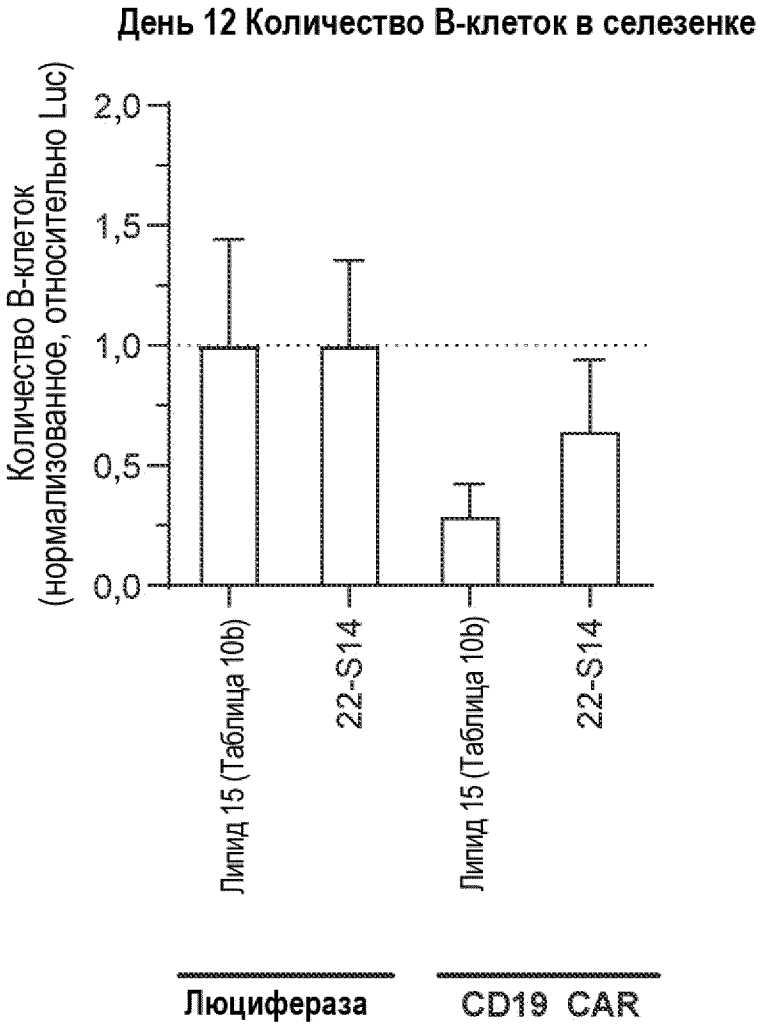


Фиг. 41A

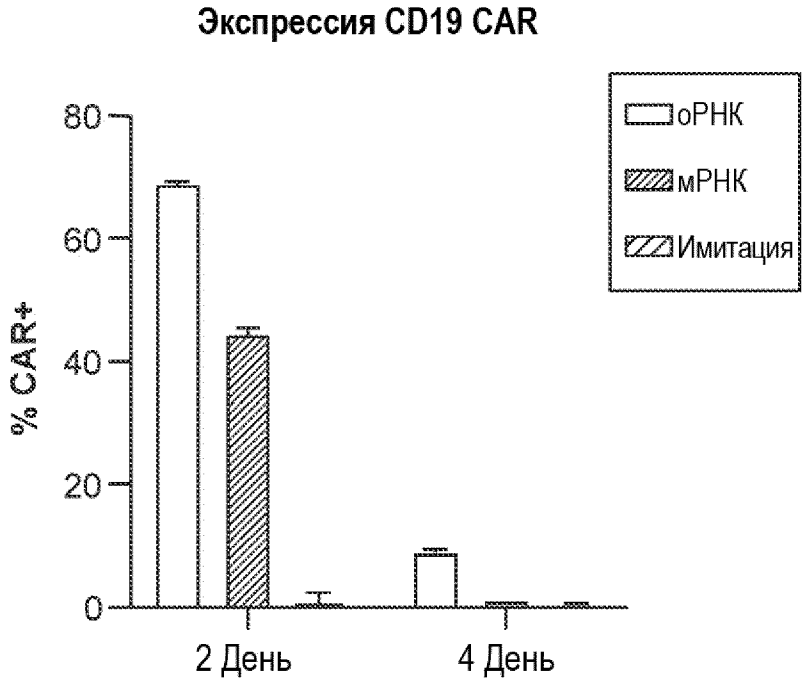
День 12 Количество B-клеток в периферической крови



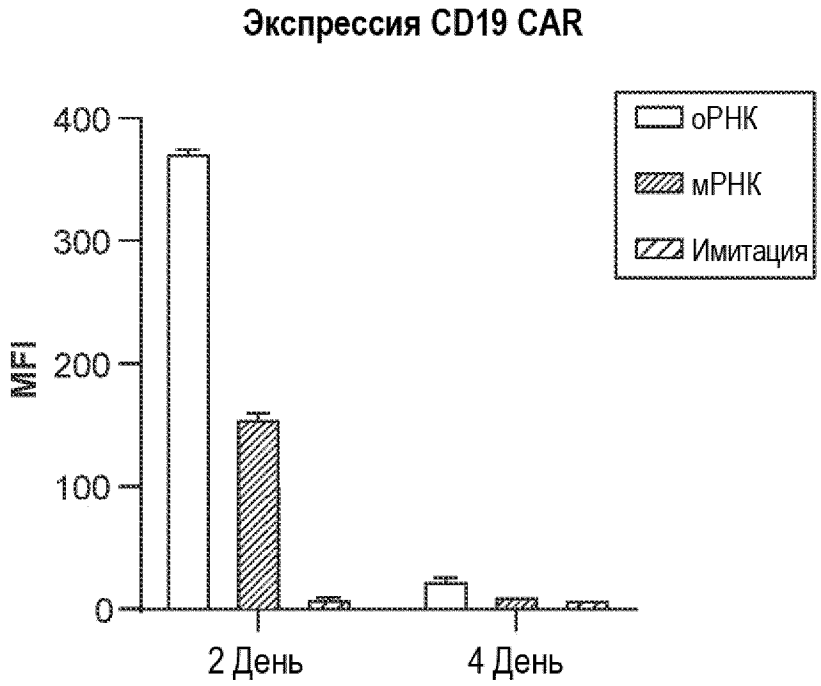
Фиг. 41B


День 12 Количество B-клеток в селезенке
Количество B-клеток
(нормализованное, относительно Luc)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Липид 15 (Таблица 10b)
22-S14
Липид 15 (Таблица 10b)
22-S14
Люцифераза
CD19 CAR

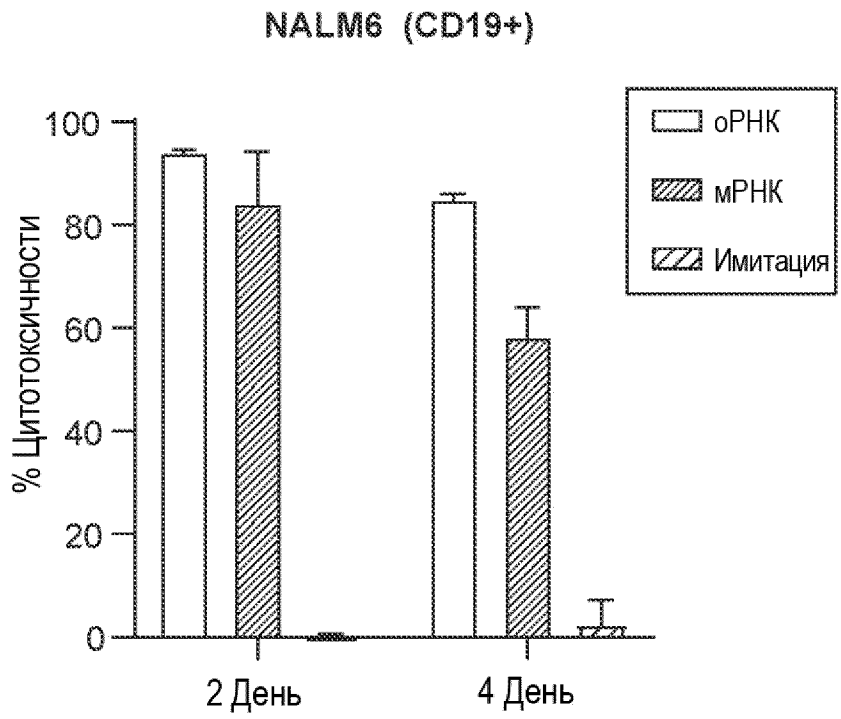
Фиг. 41C



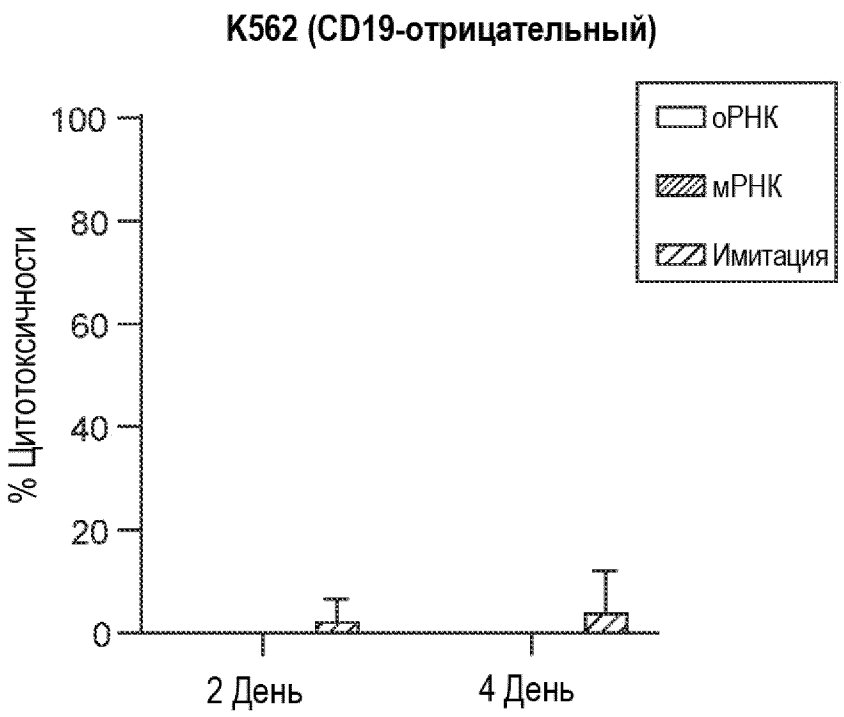
Фиг. 42A



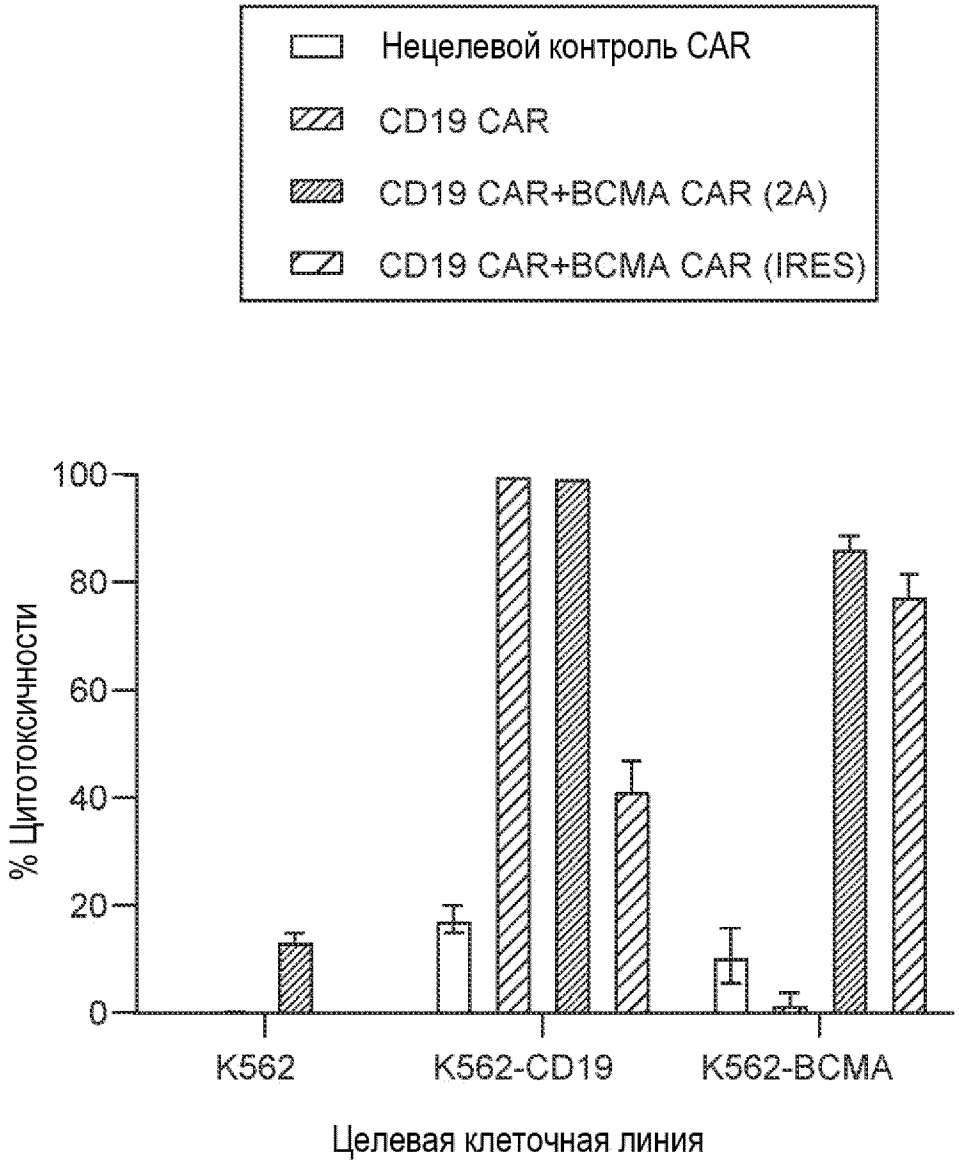
Фиг. 42B



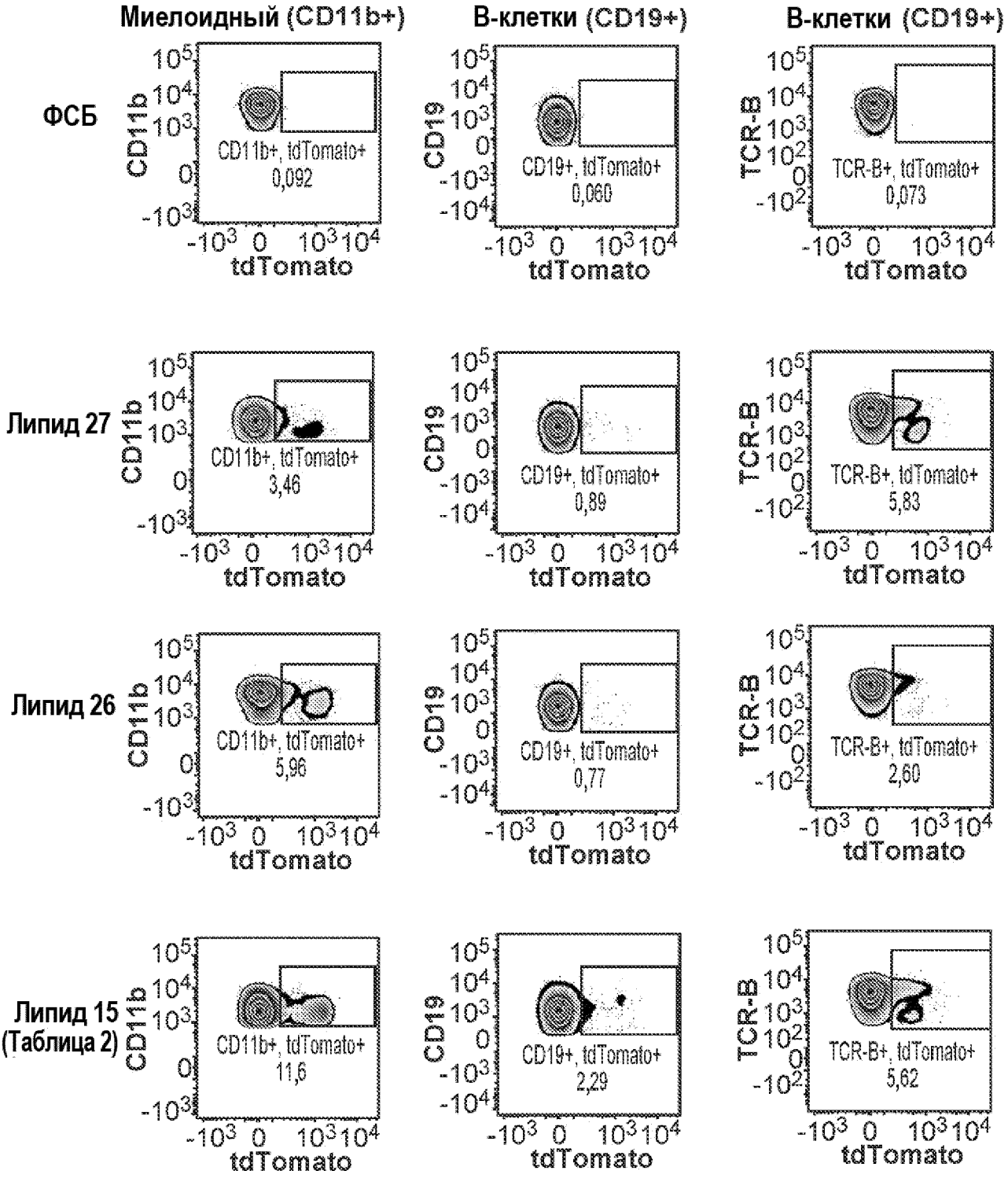
Фиг. 43A



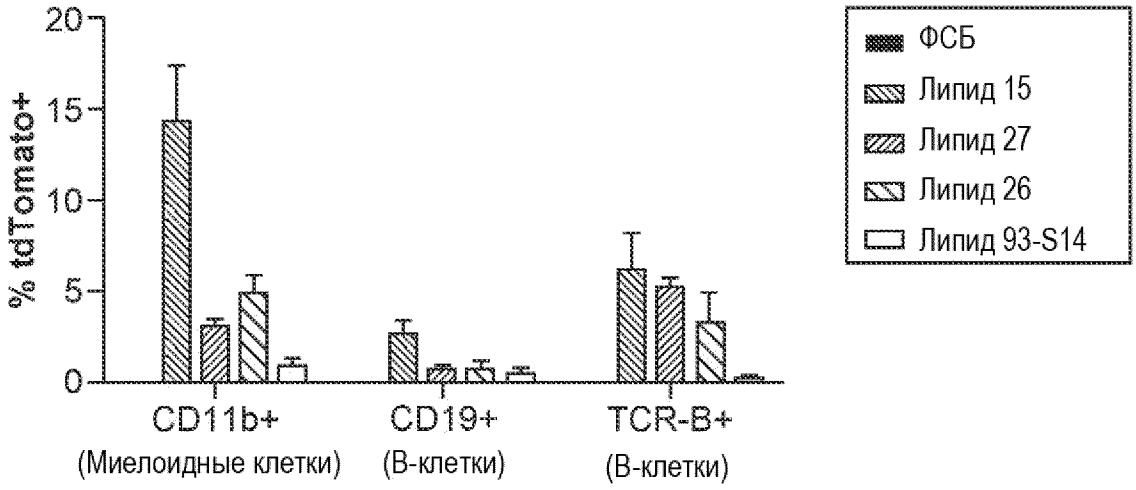
Фиг. 43B


Нецелевой контроль CAR
CD19 CAR
CD19 CAR+BCMA CAR (2A)
CD19 CAR+BCMA CAR (IRES)
% Цитотоксичности
100
80
60
40
20
0
K562
K562-CD19
K562-BCMA
Целевая клеточная линия

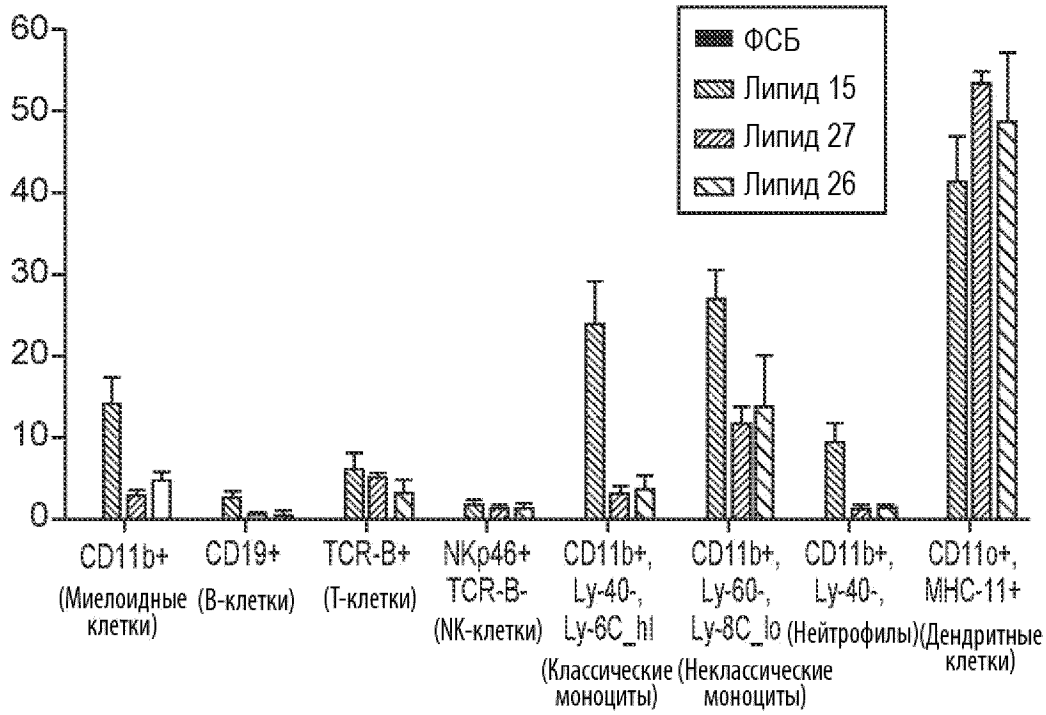
Фиг. 44


Миелоидный (CD11b+)
B-клетки (CD19+)
B-клетки (CD19+)
ФСБ
Липид 27
Липид 26
Липид 15 (Таблица 2)
CD11b
CD19
TCR-B
tdTomato
CD11b+, tdTomato+ 0,092
CD19+, tdTomato+ 0,060
TCR-B+, tdTomato+ 0,073
CD11b+, tdTomato+ 3,46
CD19+, tdTomato+ 0,89
TCR-B+, tdTomato+ 5,83
CD11b+, tdTomato+ 5,96
CD19+, tdTomato+ 0,77
TCR-B+, tdTomato+ 2,60
CD11b+, tdTomato+ 11,6
CD19+, tdTomato+ 2,29
TCR-B+, tdTomato+ 5,62

Фиг. 45A



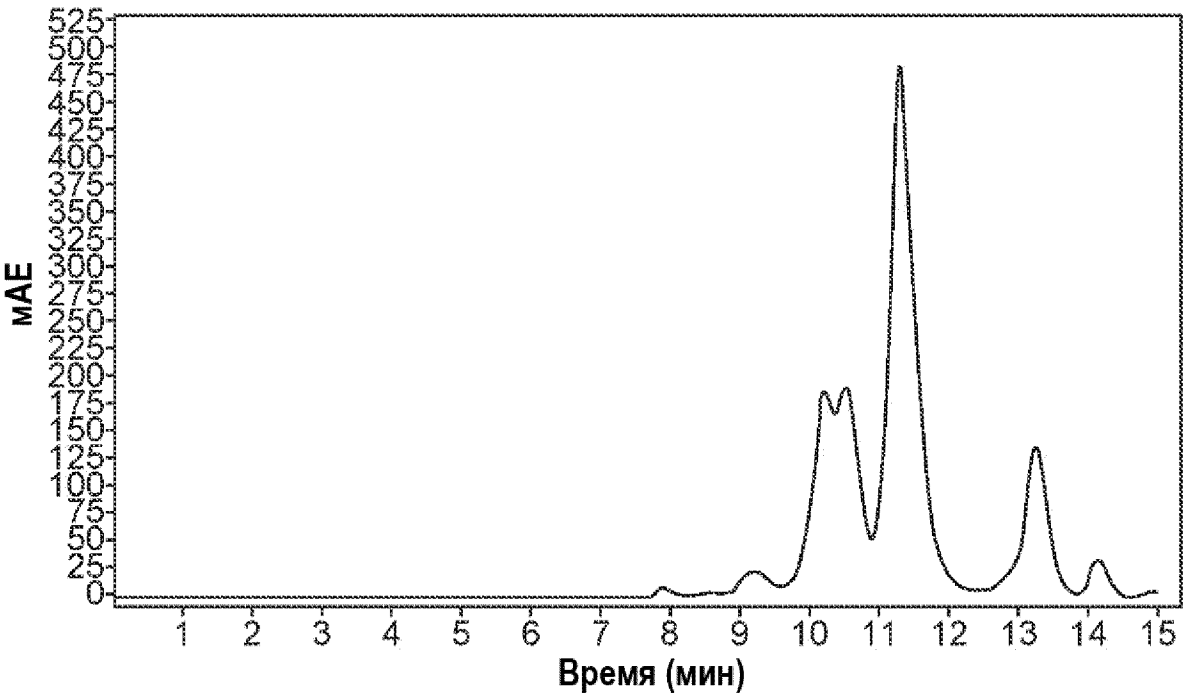
Фиг. 45B



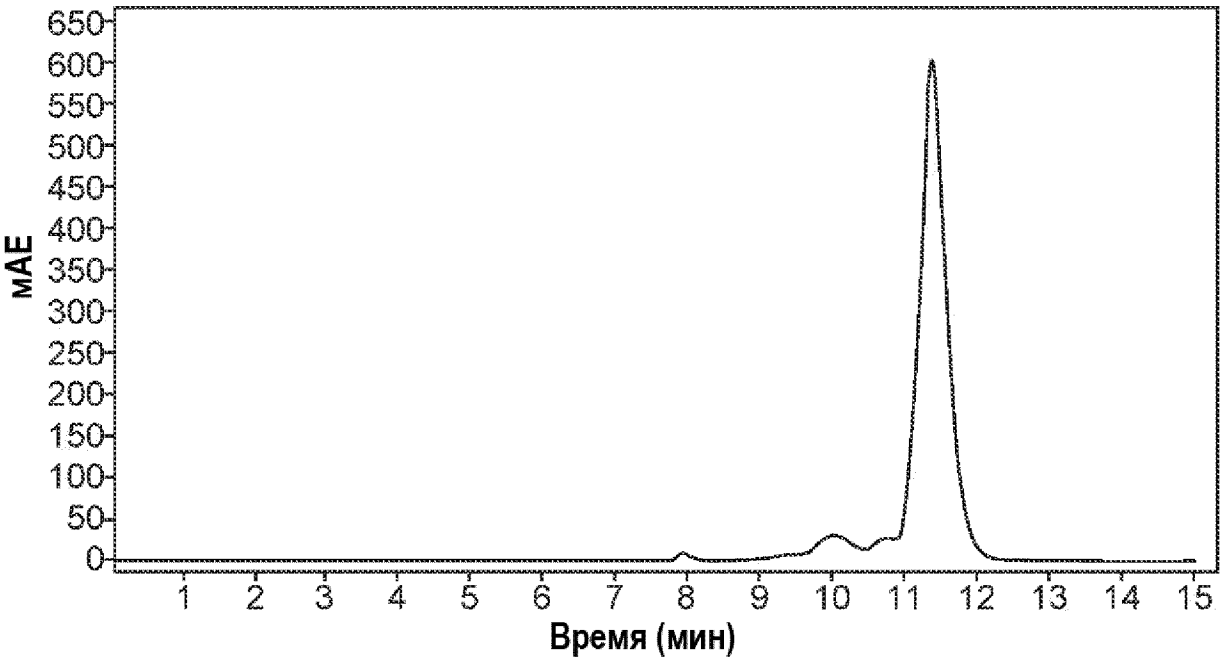
Фиг. 45C



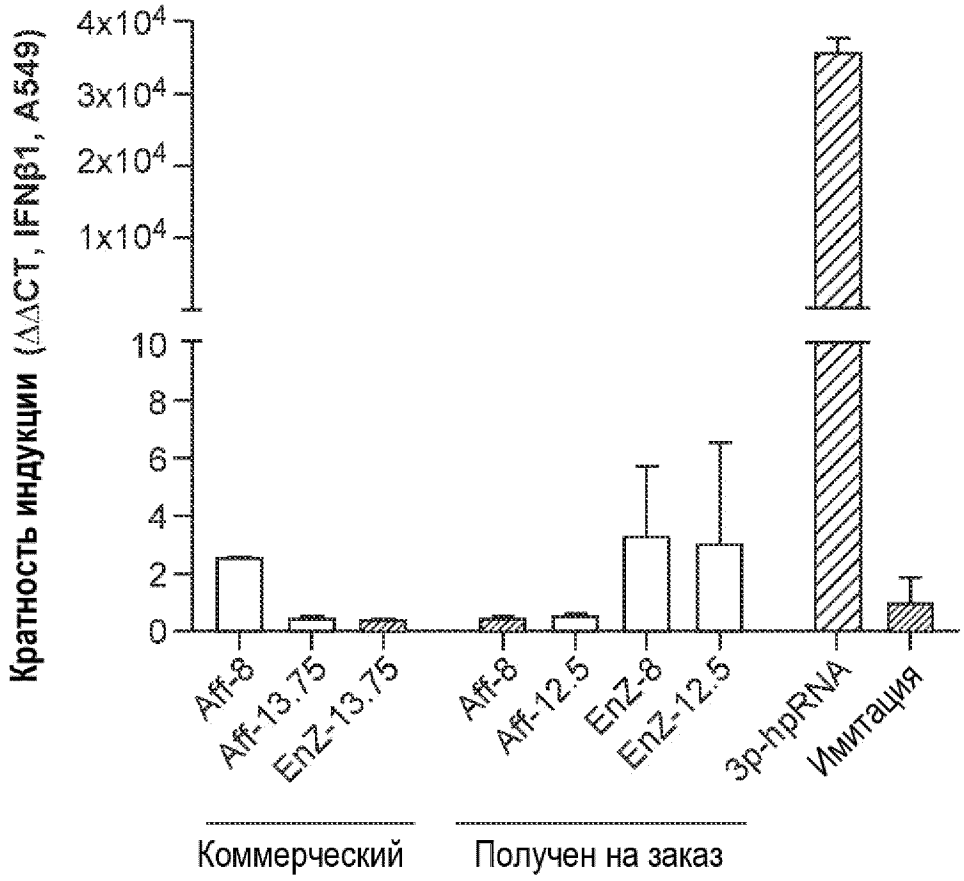
Фиг. 46A



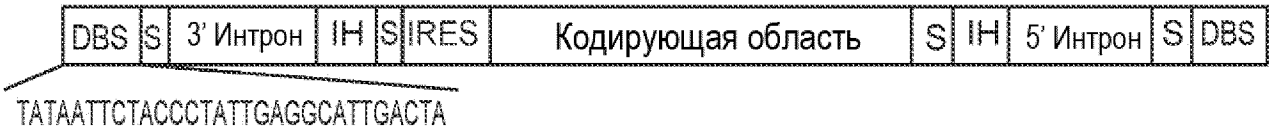
Фиг. 46B



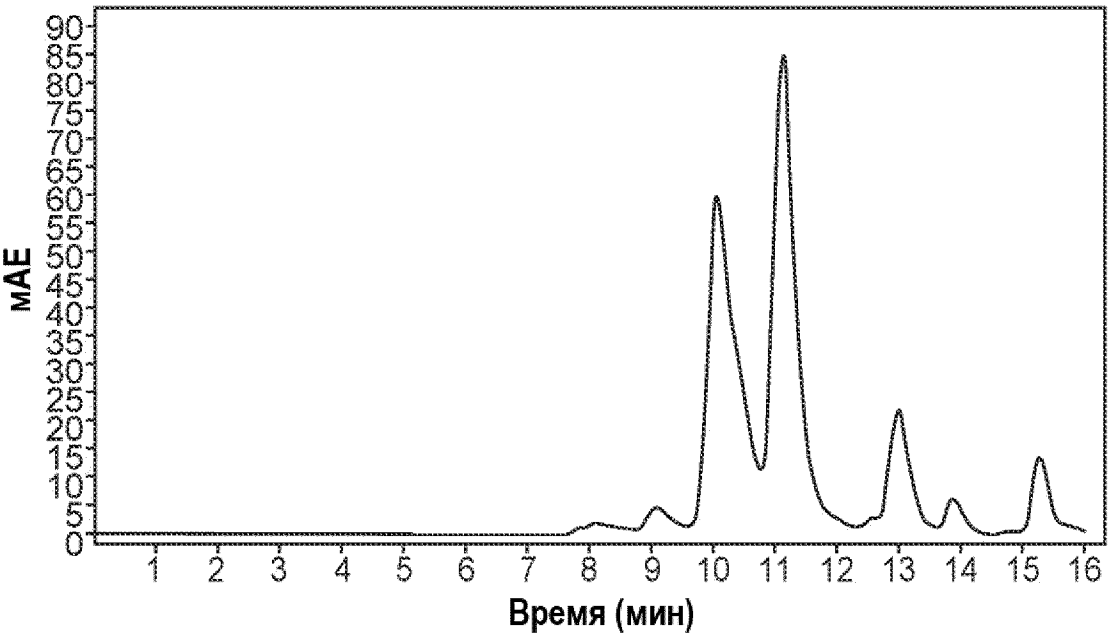
Фиг. 46C


Кратность индукции (ΔΔCT, IFNβ1, A549)
4x10^4
3x10^4
2x10^4
1x10^4
10
8
6
4
2
0
Aff-8
Aff-13.75
EnZ-13.75
Aff-8
Aff-12.5
EnZ-8
EnZ-12.5
3p-hpRNA
Имитация
Коммерческий
Получен на заказ

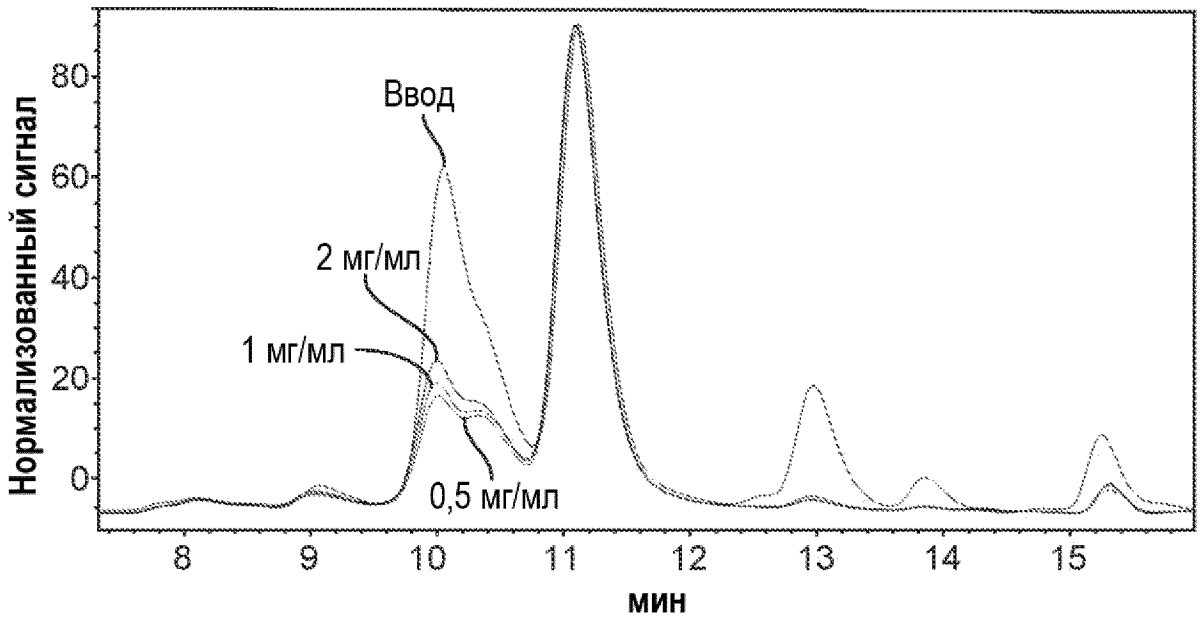
Фиг. 46D



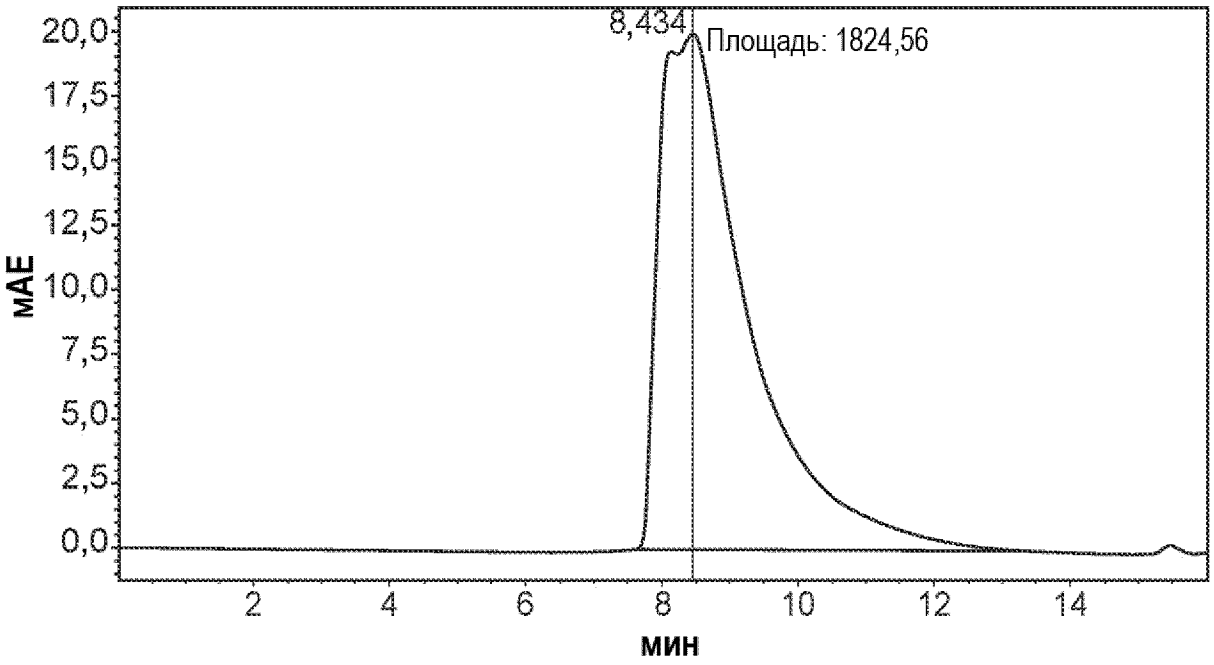
Фиг. 47A



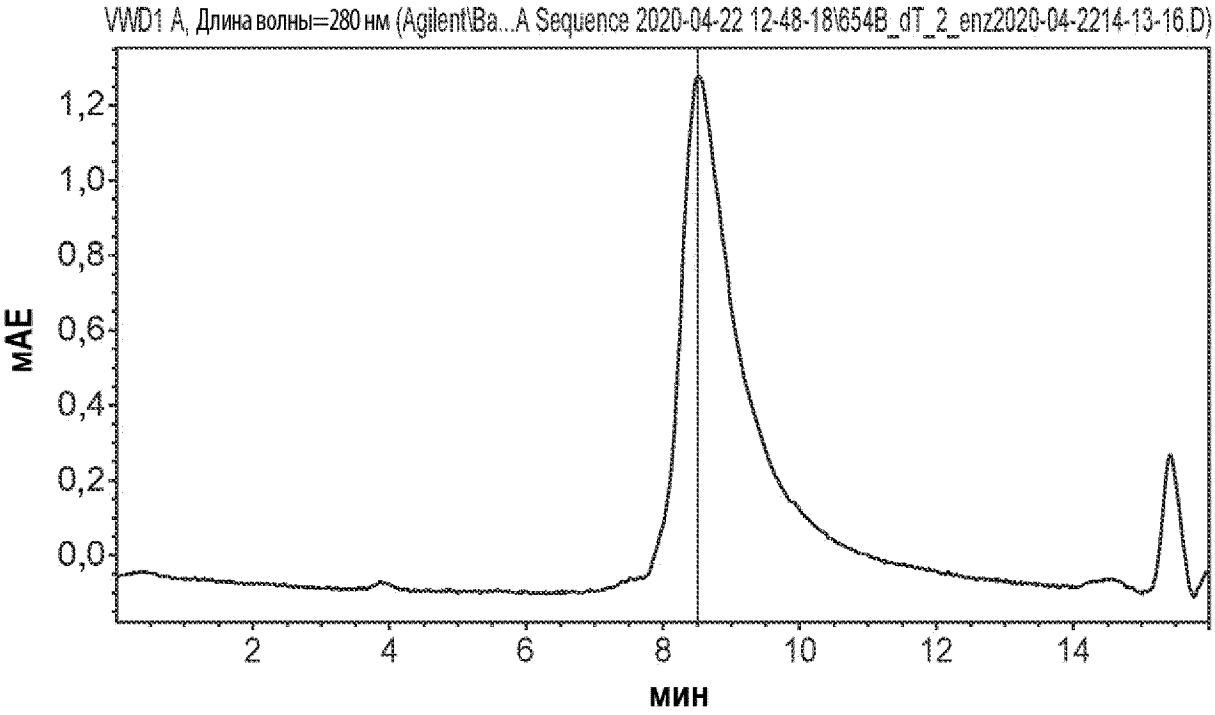
Фиг. 47B



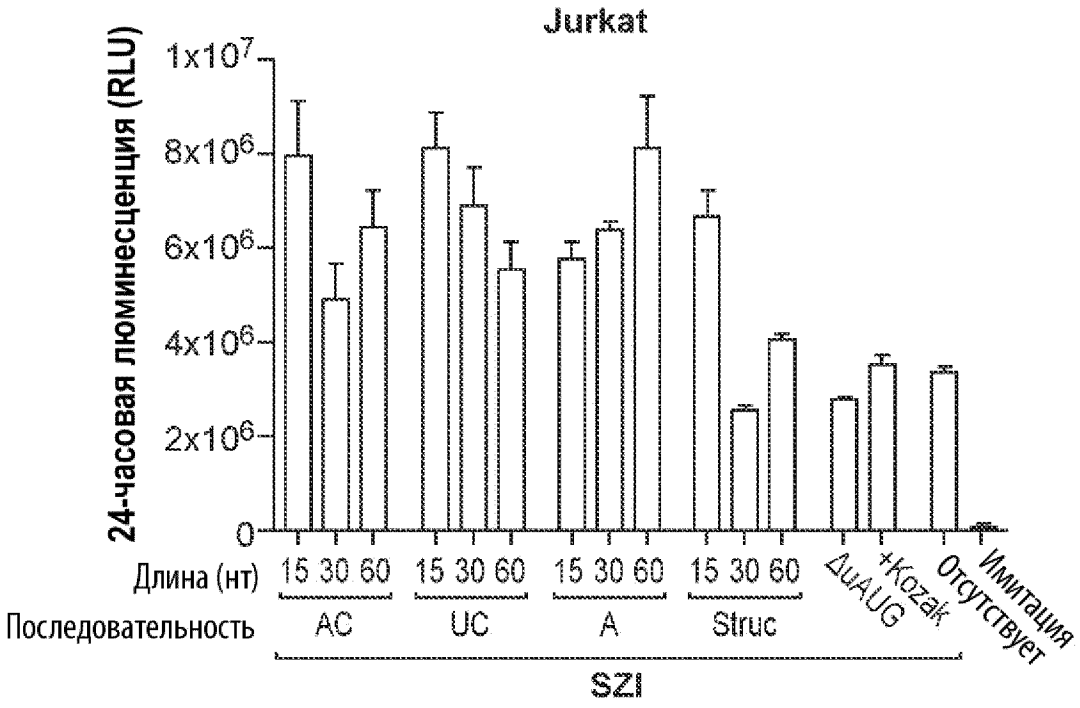
Фиг. 47C



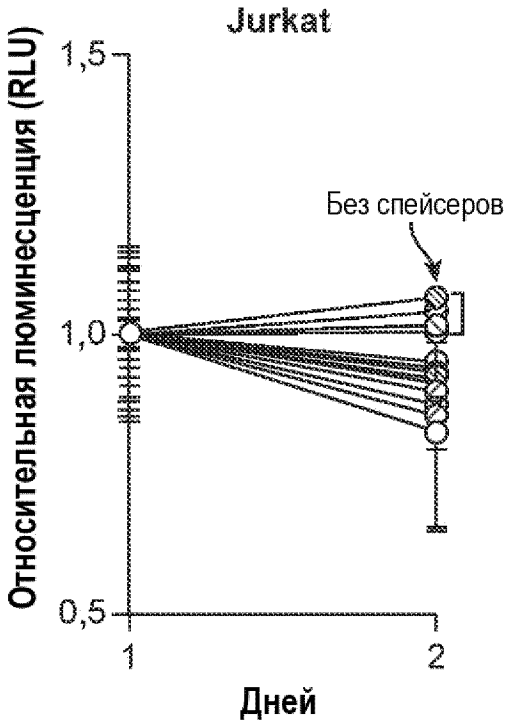
Фиг. 48A



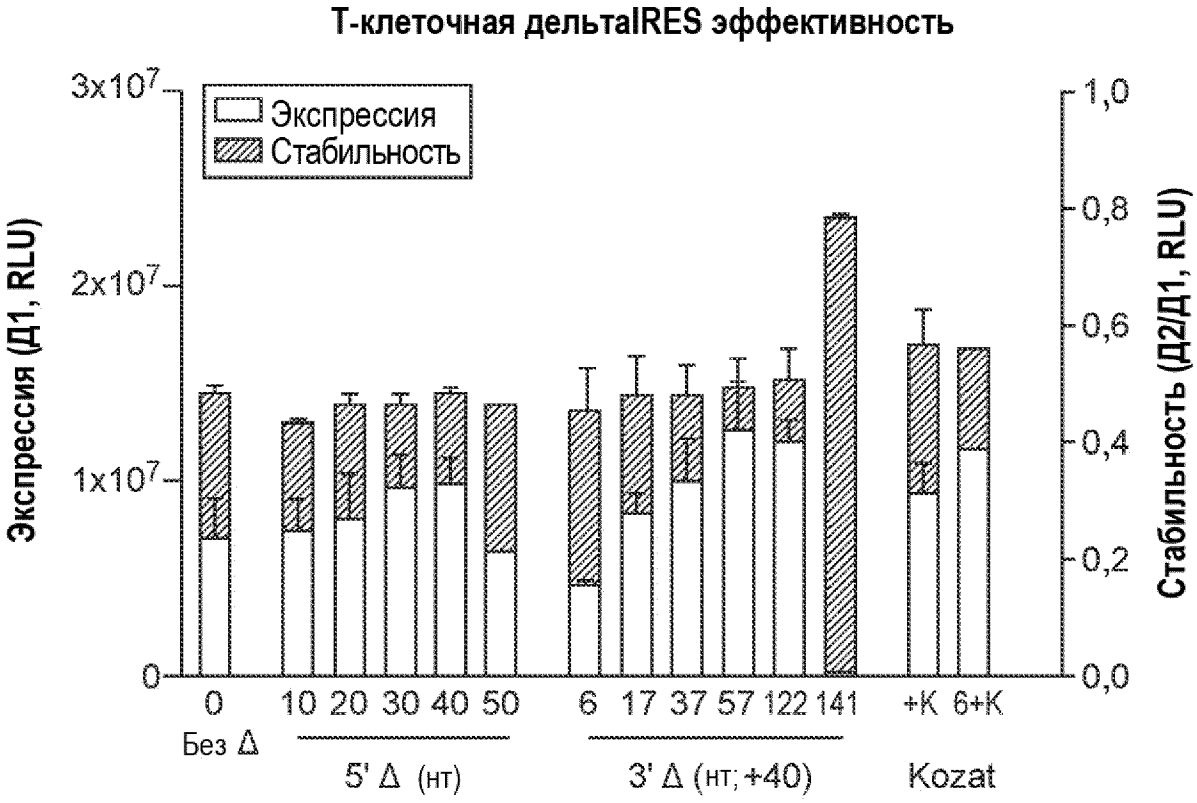
Фиг. 48B



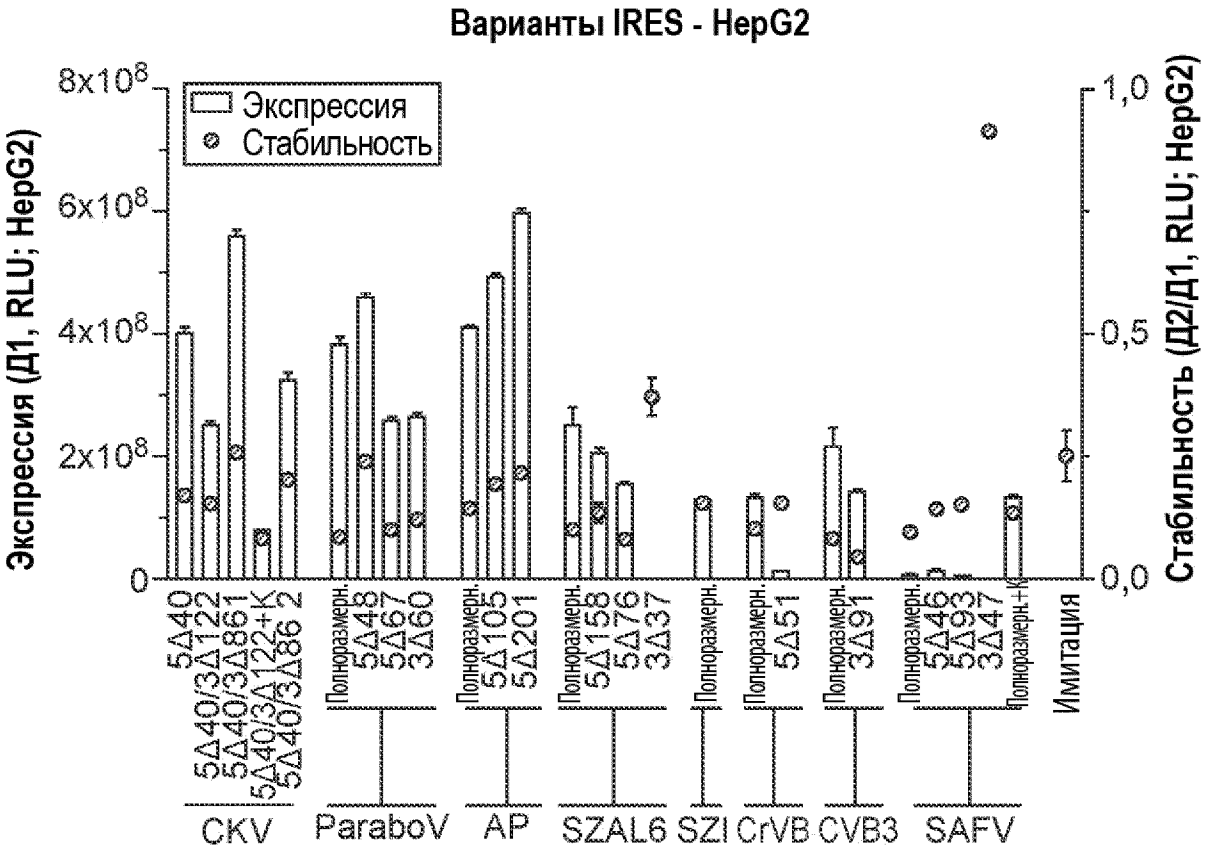
Фиг. 49A



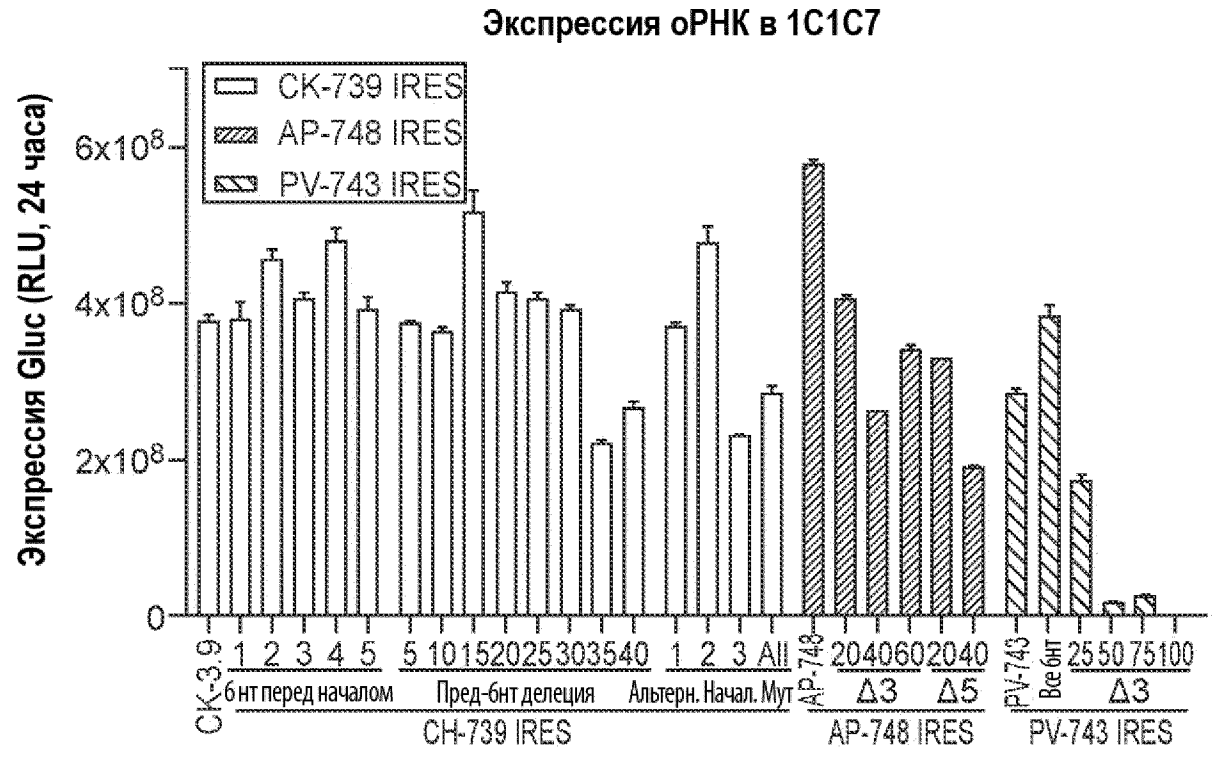
Фиг. 49B


Т-клеточная дельтаIRES эффективность
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU)
Стабильность (Д2/Д1, RLU)
3x10^7
2x10^7
1x10^7
0
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
10 20 30 40 50
6 17 37 57 122 141
+K 6+K
Без Δ
5' Δ (нт)
3' Δ (нт; +40)
Kozat

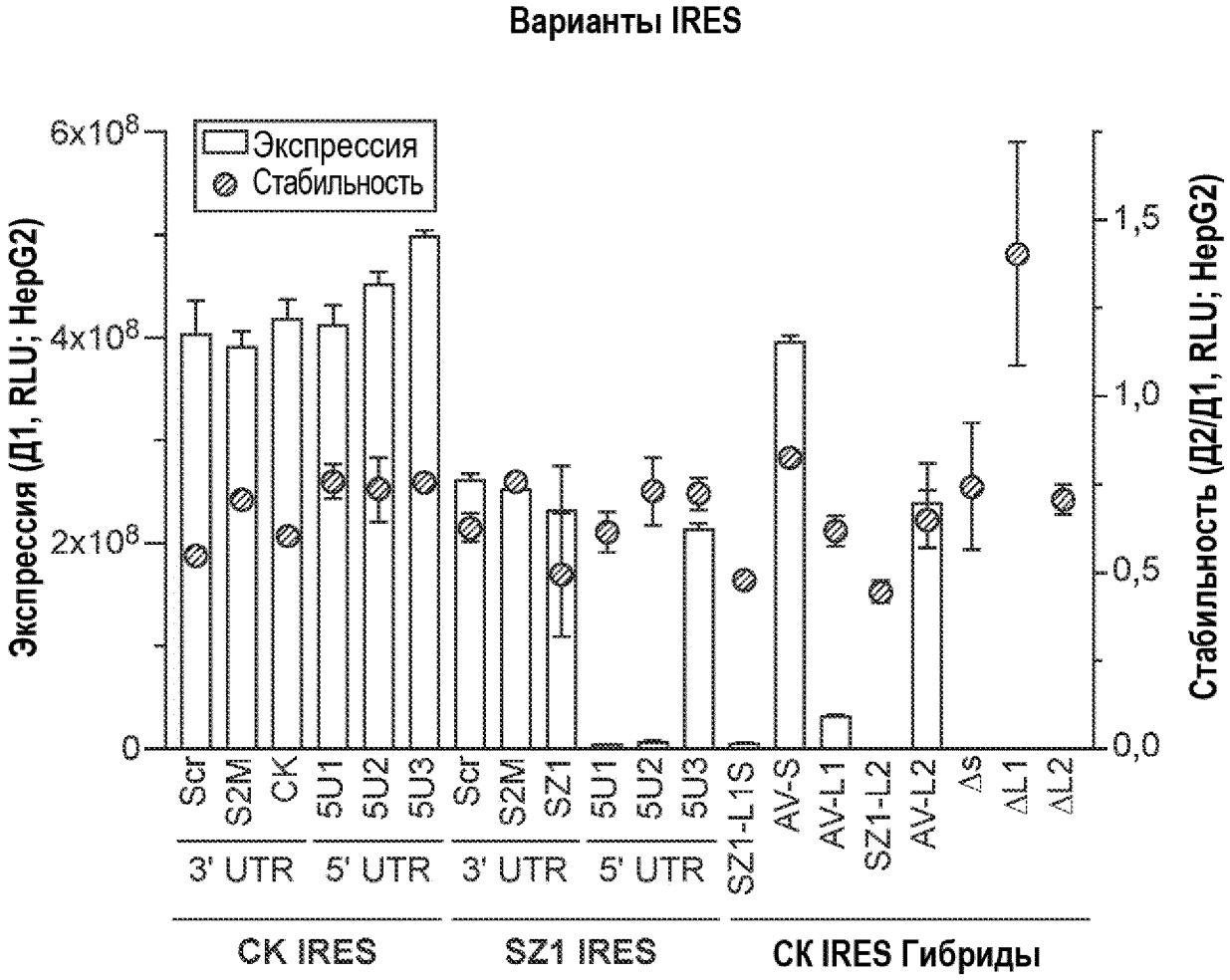
Фиг. 50


Варианты IRES - HepG2
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU; HepG2)
Стабильность (Д2/Д1, RLU; HepG2)
8x10^8
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
1,0
0,5
0,0
5Δ40
5Δ40/3Δ122
5Δ40/3Δ861
5Δ40/3Δ122+K
5Δ40/3Δ86 2
Полноразмерн.
5Δ48
5Δ67
3Δ60
Полноразмерн.
5Δ105
5Δ201
Полноразмерн.
5Δ158
5Δ76
3Δ37
Полноразмерн.
Полноразмерн.
5Δ51
Полноразмерн.
3Δ91
Полноразмерн.
5Δ46
5Δ93
3Δ47
Полноразмерн.+K
Имитация
CKV
ParaboV
AP
SZAL6
SZI
CrVB
CVB3
SAFV

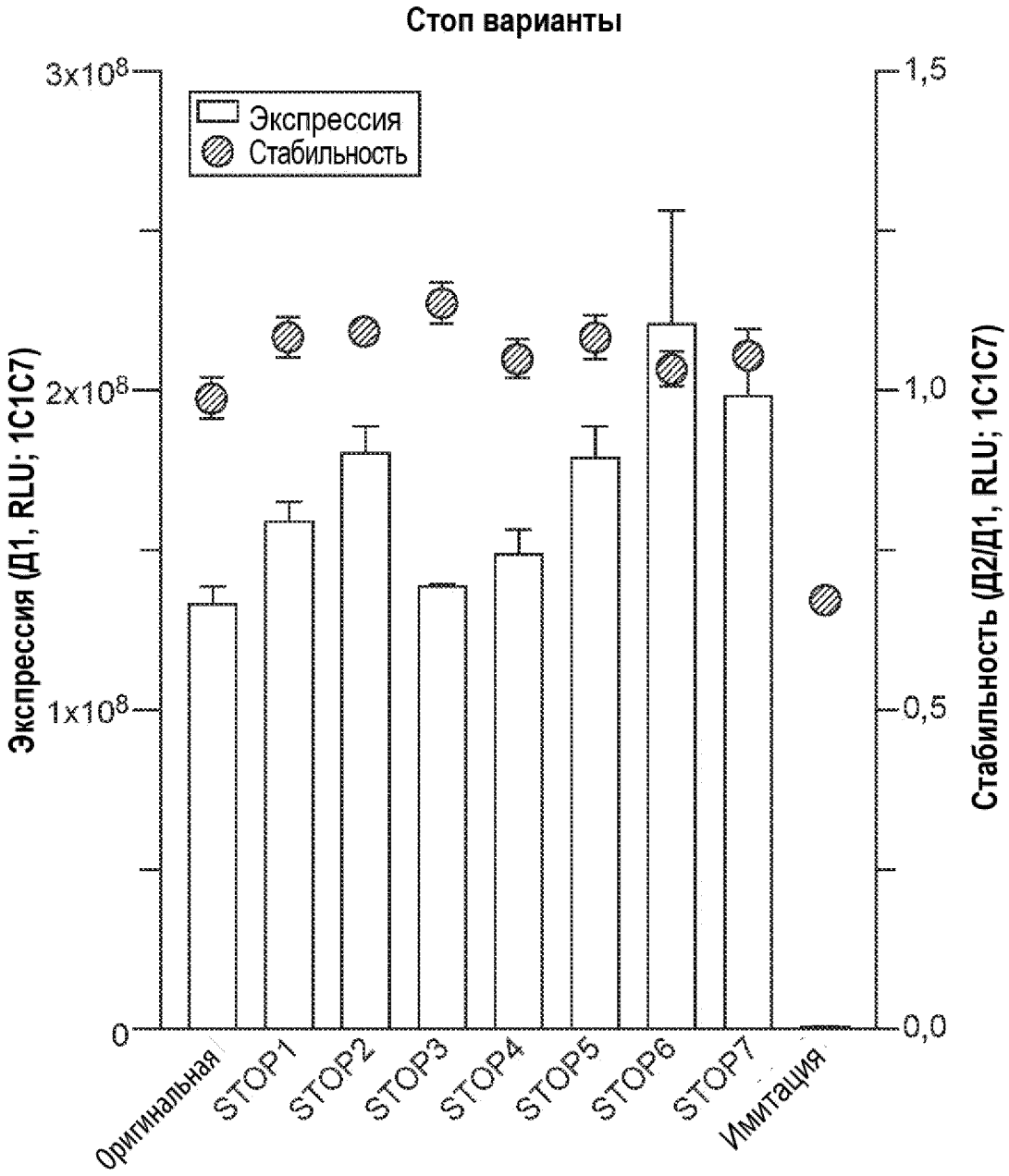
Фиг. 51


Экспрессия oРНК в 1C1C7
CK-739 IRES
AP-748 IRES
PV-743 IRES
Экспрессия Gluc (RLU, 24 часа)
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
CK-3.9
1 2 3 4 5
5 10 15 20 25 30 35 40
1 2 3 All
AP-748
20 40 60
20 40
PV-743
Все 6нт
25 50 75 100
6 нт перед началом
Пред-6нт делеция
Альтерн. Начал. Мут
Δ3
Δ5
Δ3
CH-739 IRES
AP-748 IRES
PV-743 IRES

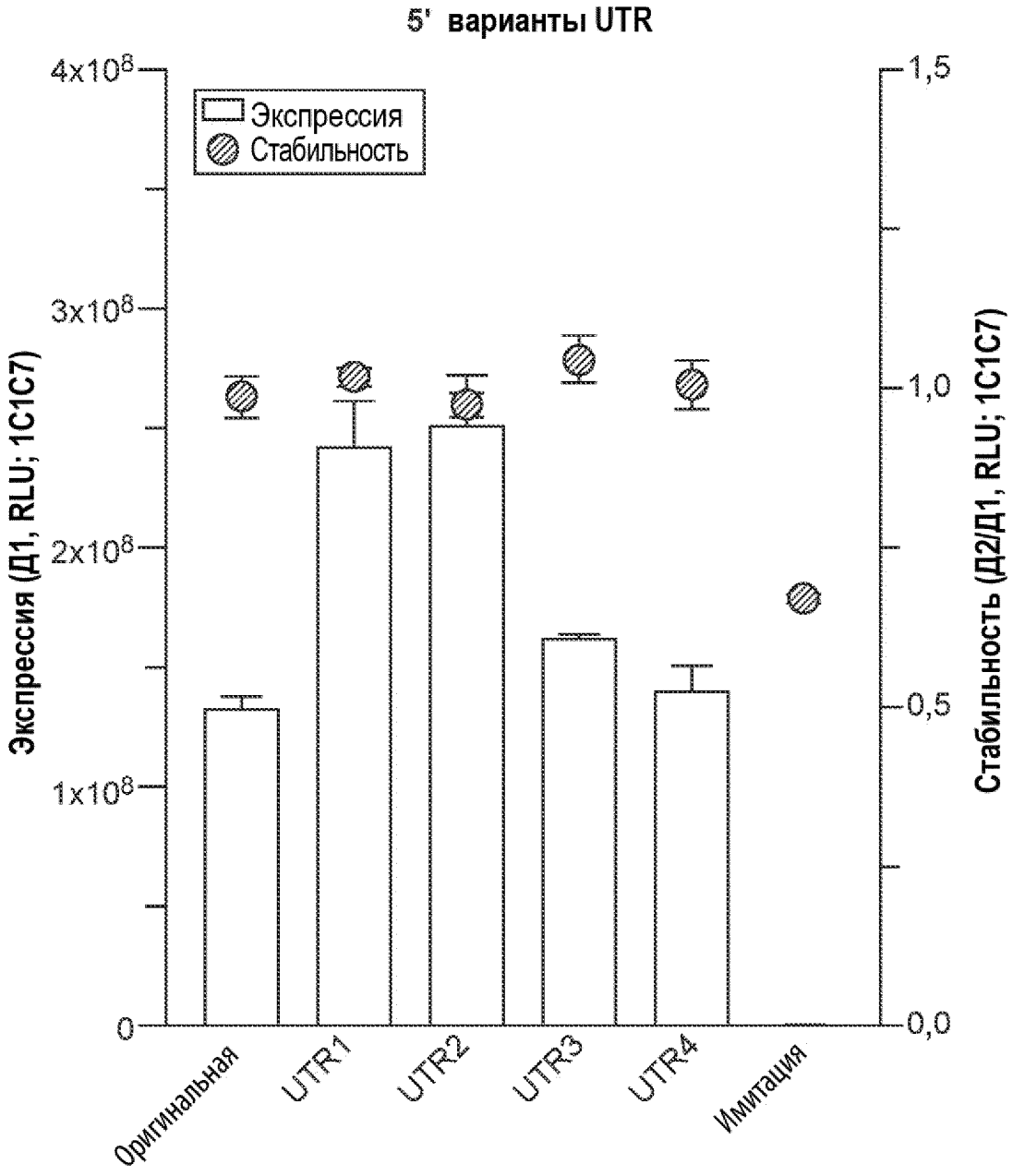
Фиг. 52


Варианты IRES
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU; HepG2)
Стабильность (Д2/Д1, RLU; HepG2)
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
1,5
1,0
0,5
0,0
Scr
S2M
CK
5U1
5U2
5U3
Scr
S2M
SZ1
5U1
5U2
5U3
SZ1-L1S
AV-S
AV-L1
SZ1-L2
AV-L2
Δs
ΔL1
ΔL2
3' UTR
5' UTR
3' UTR
5' UTR
CK IRES
SZ1 IRES
CK IRES Гибриды

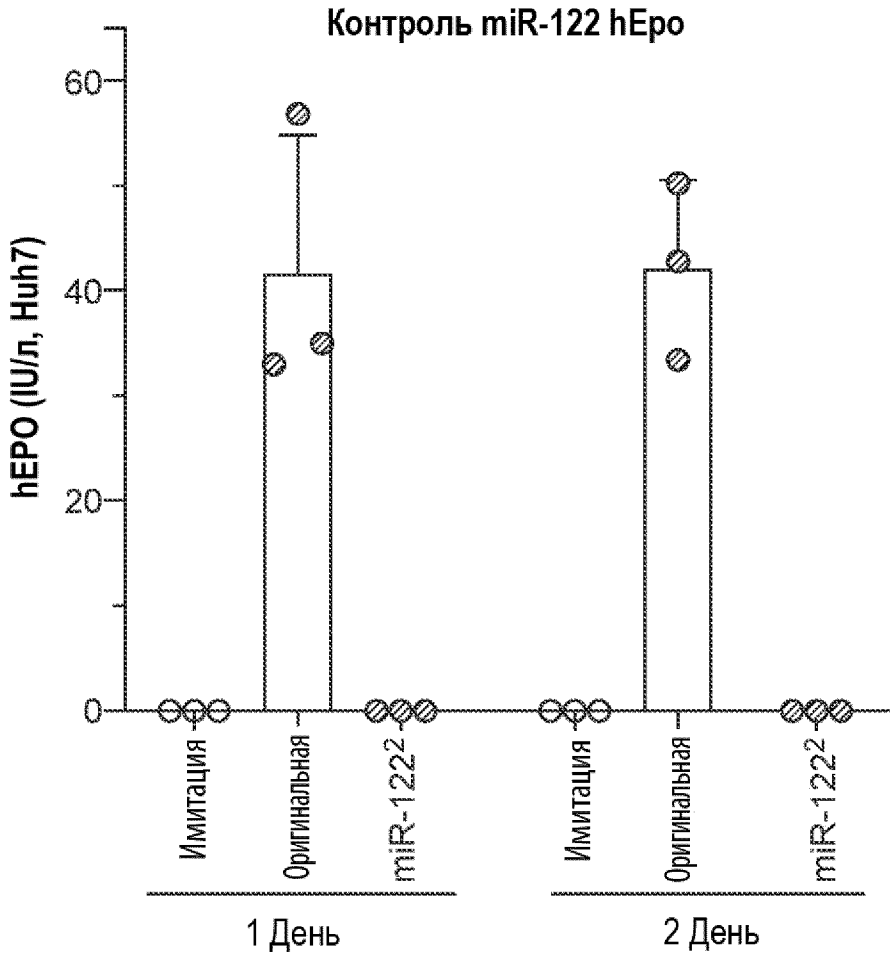
Фиг. 53


Стоп варианты
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU; 1C1C7)
Стабильность (Д2/Д1, RLU; 1C1C7)
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
1,5
1,0
0,5
0,0
Оригинальная
STOP1
STOP2
STOP3
STOP4
STOP5
STOP6
STOP7
Имитация

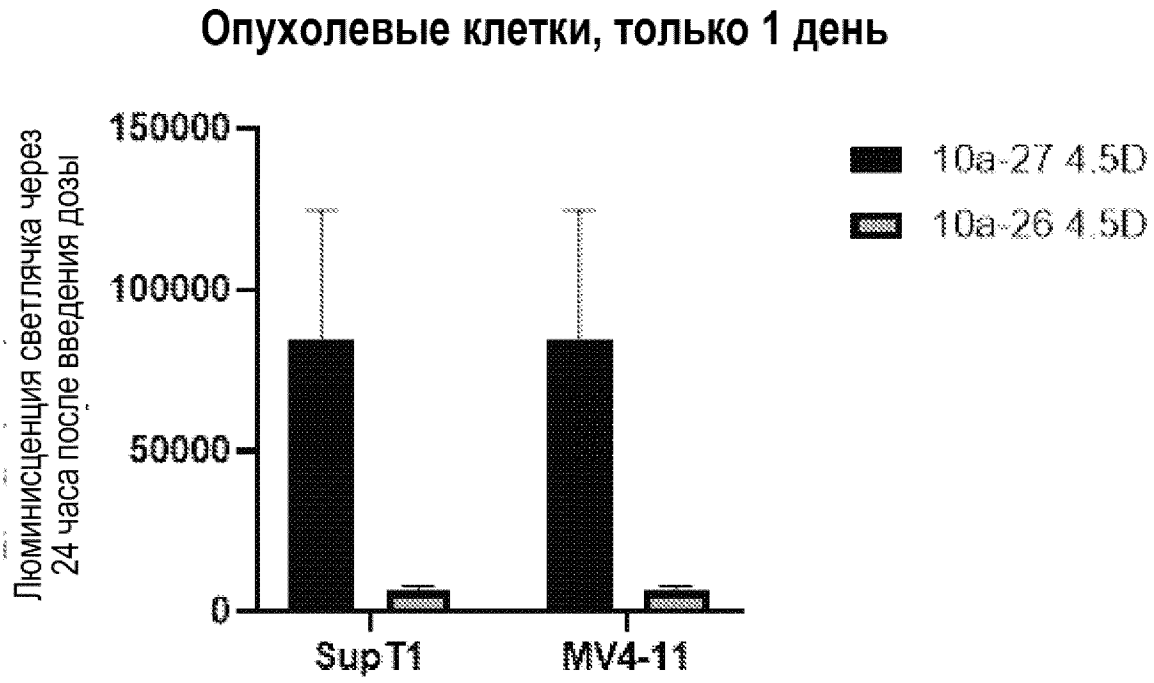
Фиг. 54


5' варианты UTR
Экспрессия
Стабильность
Экспрессия (Д1, RLU; 1C1C7)
Стабильность (Д2/Д1, RLU; 1C1C7)
4x10^8
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
1,5
1,0
0,5
0,0
Оригинальная
UTR1
UTR2
UTR3
UTR4
Имитация

Фиг. 55

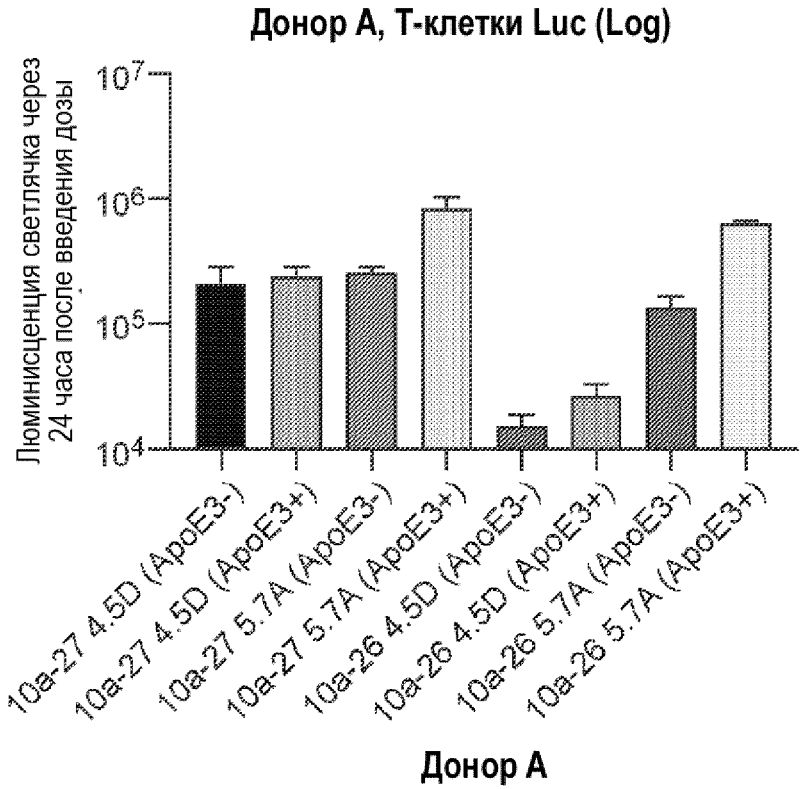

Контроль miR-122 hEpo
hEPO (IU/л, Huh7)
60
40
20
0
Имитация
Оригинальная
miR-122
Имитация
Оригинальная
miR-122
1 День
2 День

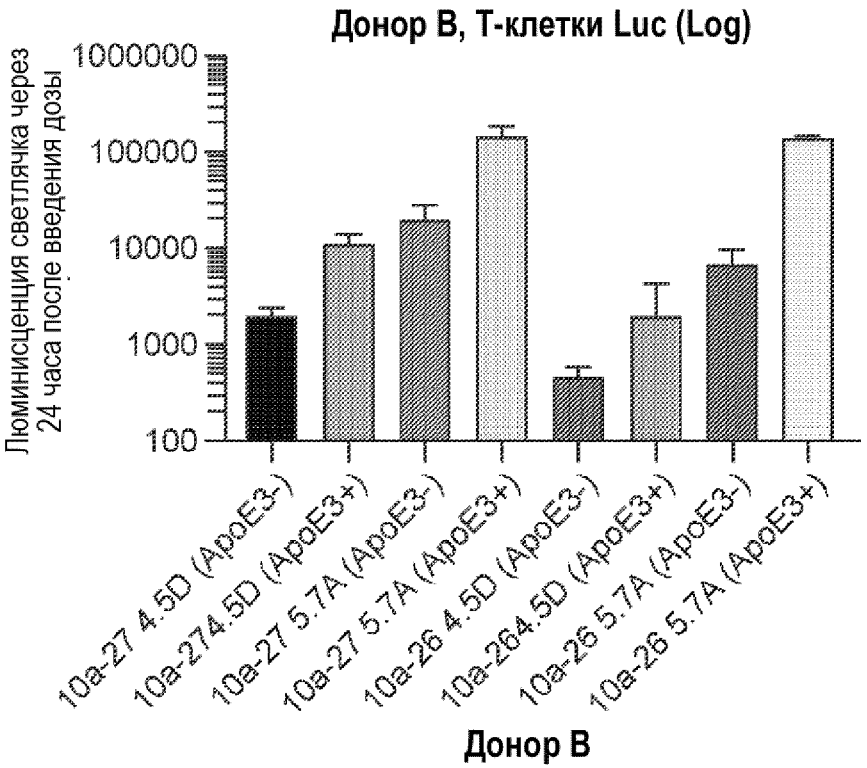
Фиг. 56


Опухолевые клетки, только 1 день
Люминисценция светлячка через 24 часа после введения дозы
150000
100000
50000
0
SupT1
MV4-11
10a-27 4.5D
10a-26 4.5D

Фиг. 57

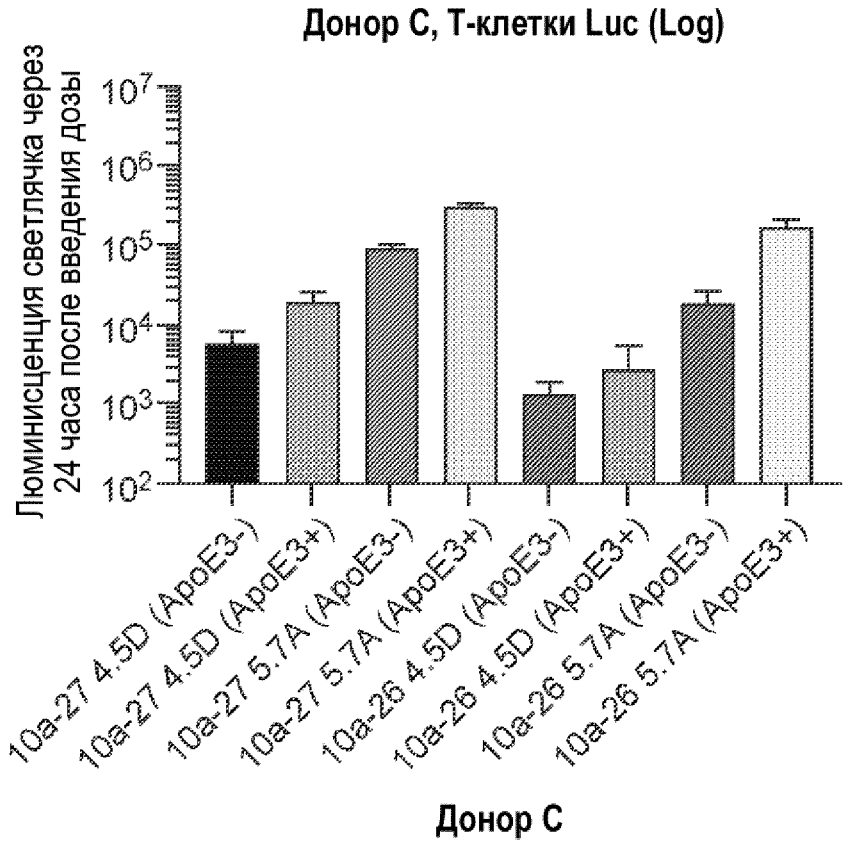
ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

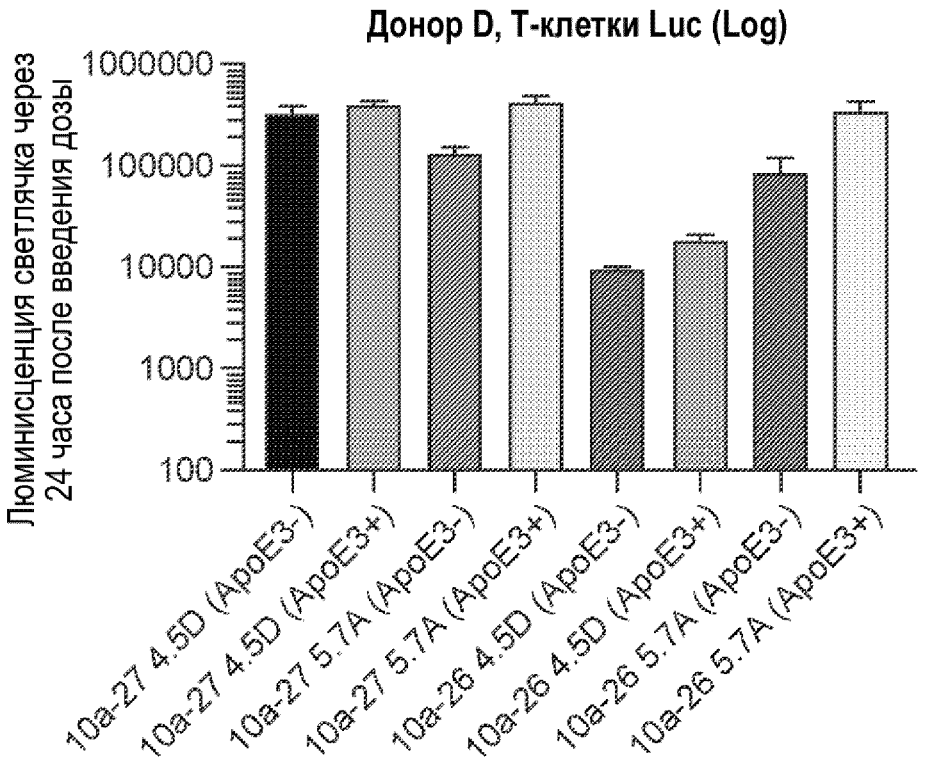




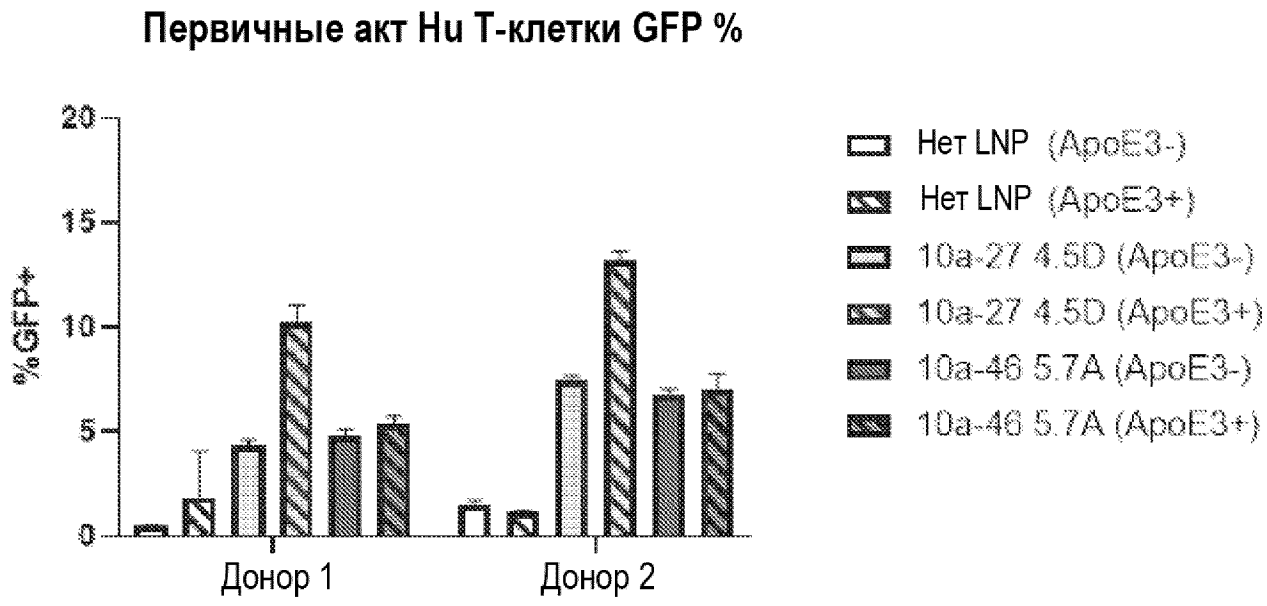
Фиг. 58

ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

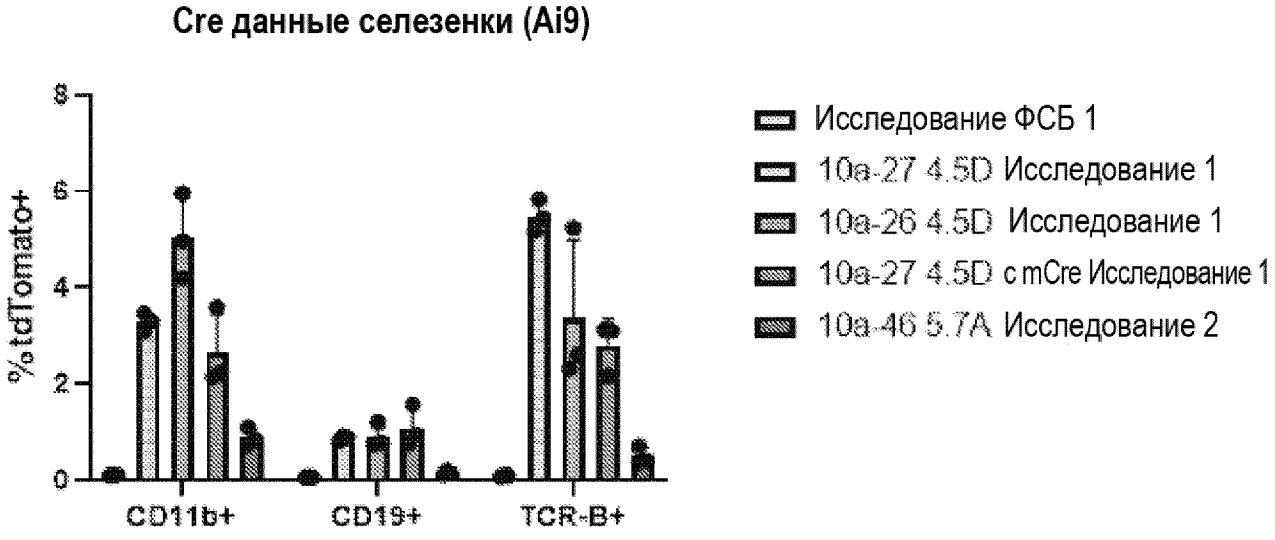




Фиг. 58 (продолж.)

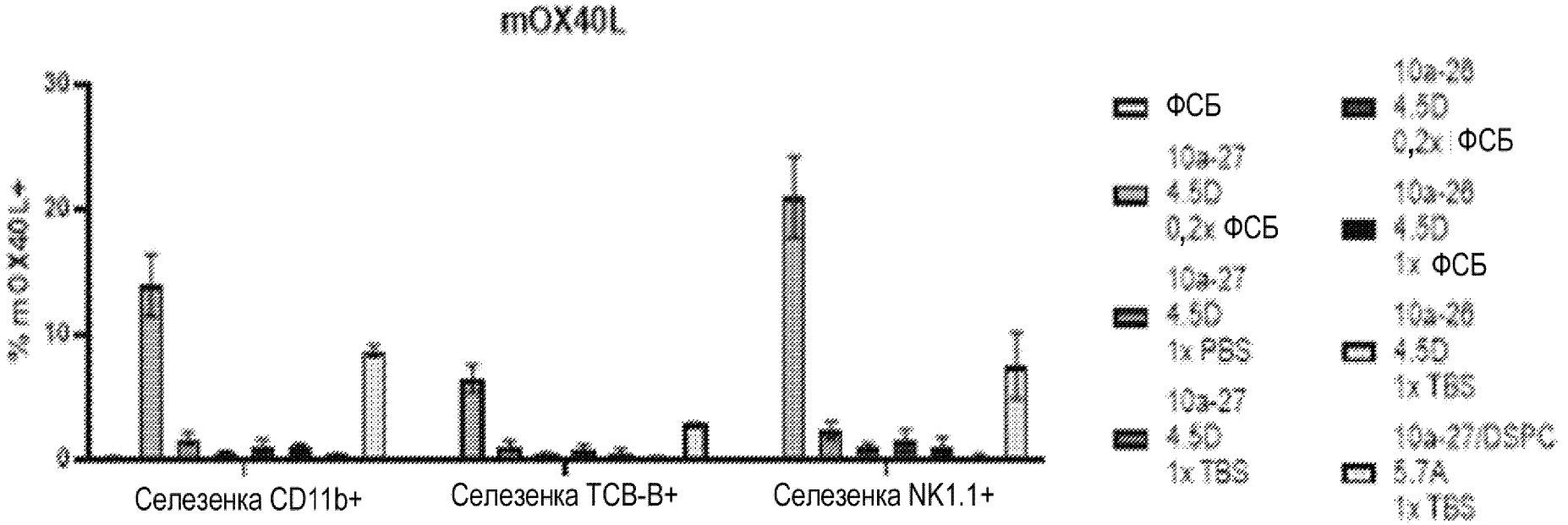

Первичные акт Hu T-клетки GFP %
%GFP+
20
15
10
5
0
Донор 1
Донор 2
Нет LNP (ApoE3-)
Нет LNP (ApoE3+)
10a-27 4.5D (ApoE3-)
10a-27 4.5D (ApoE3+)
10a-46 5.7A (ApoE3-)
10a-46 5.7A (ApoE3+)

Фиг. 59


Cre данные селезенки (Ai9)
% tdTomato+
8
6
4
2
0
CD11b+
CD19+
TCR-B+
Исследование ФСБ 1
10a-27 4.5D Исследование 1
10a-26 4.5D Исследование 1
10a-27 4.5D с mCre Исследование 1
10a-46 5.7A Исследование 2

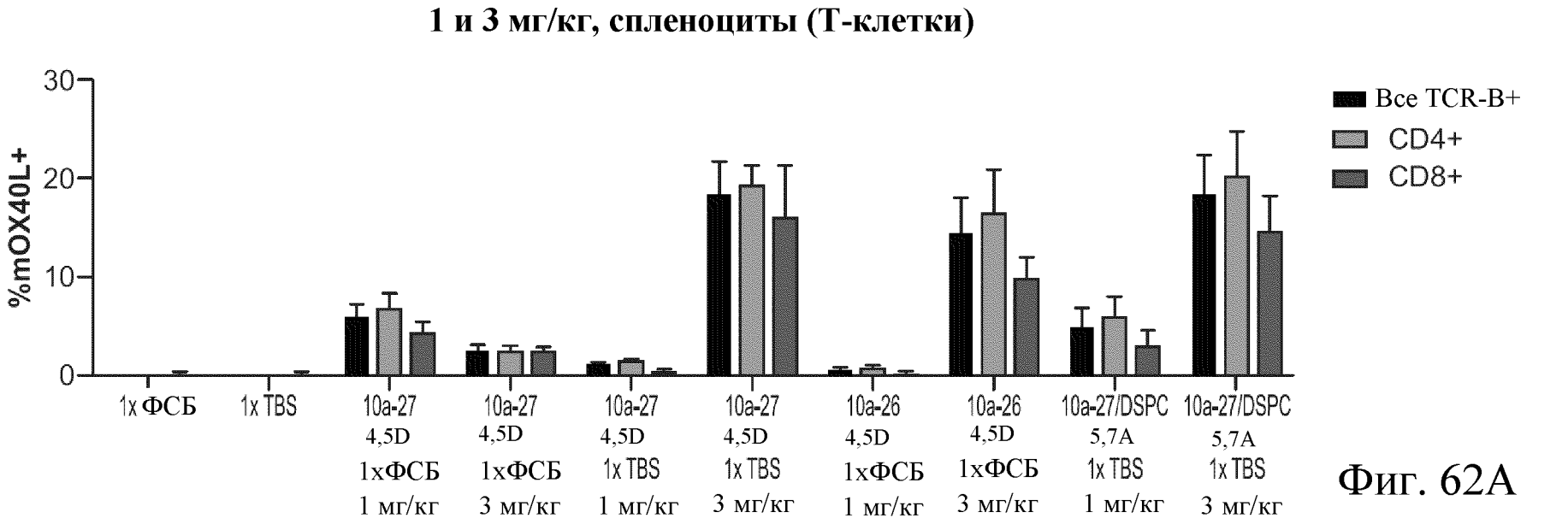
Фиг. 60

ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

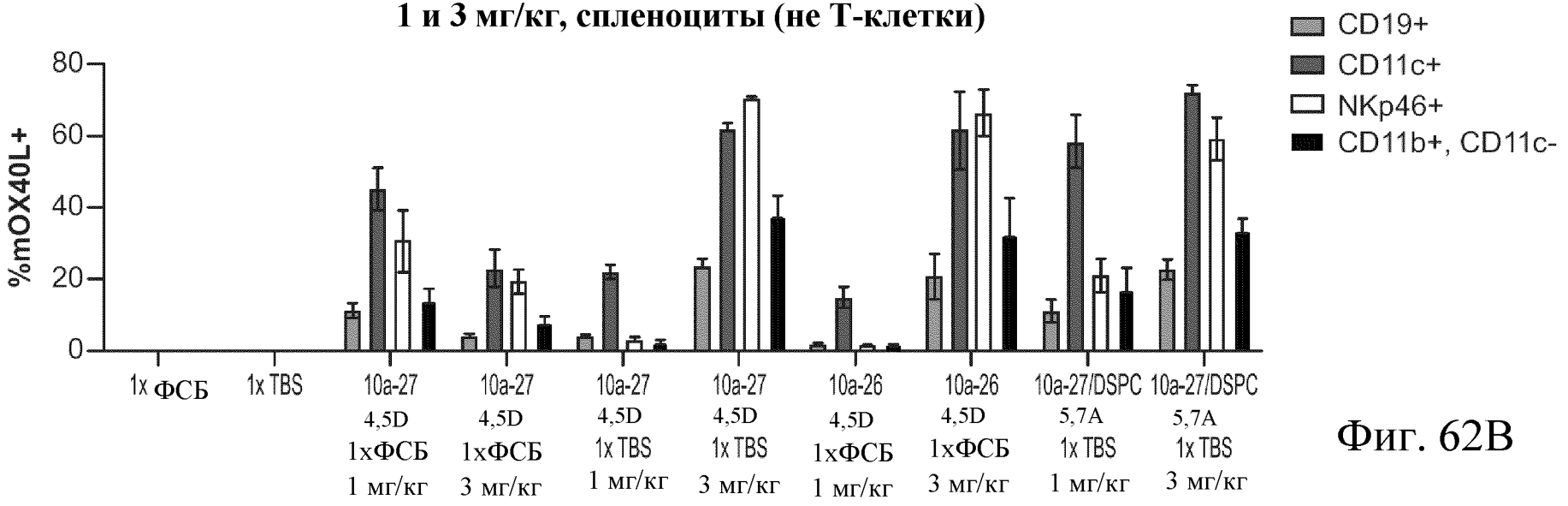


Фиг. 61

ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА



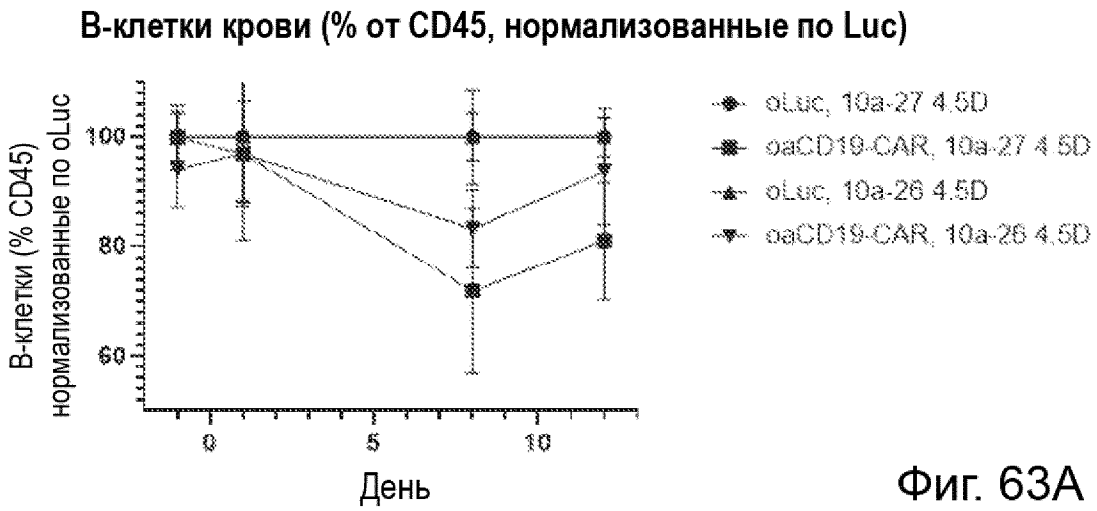
Фиг. 62A



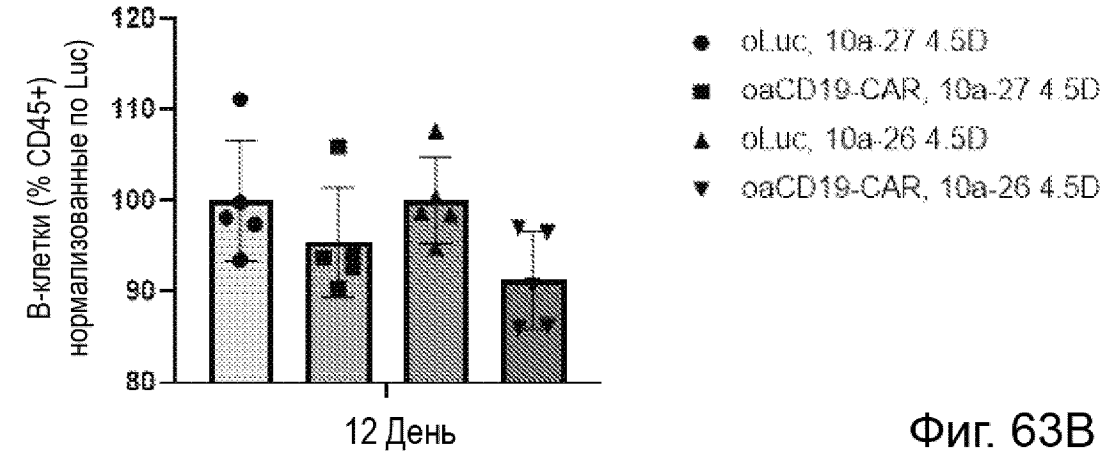
Фиг. 62B

1 и 3 мг/кг, масса
Процент увеличения массы тела (24 часа)
10
5
0
-5
-10
1хФСБ
1x TBS
10a-27 4.5D 1хФСБ 1 мг/кг
10a-27 4.5D 1хФСБ 3 мг/кг
10a-27 4.5D 1x TBS 1 мг/кг
10a-27 4.5D 1x TBS 3 мг/кг
10a-26 4.5D 1хФСБ 1 мг/кг
10a-26 4.5D 1хФСБ 3 мг/кг
10a-27/DSPC 5.7A 1x TBS 1 мг/кг
10a-27/DSPC 5.7A 1x TBS 3 мг/кг

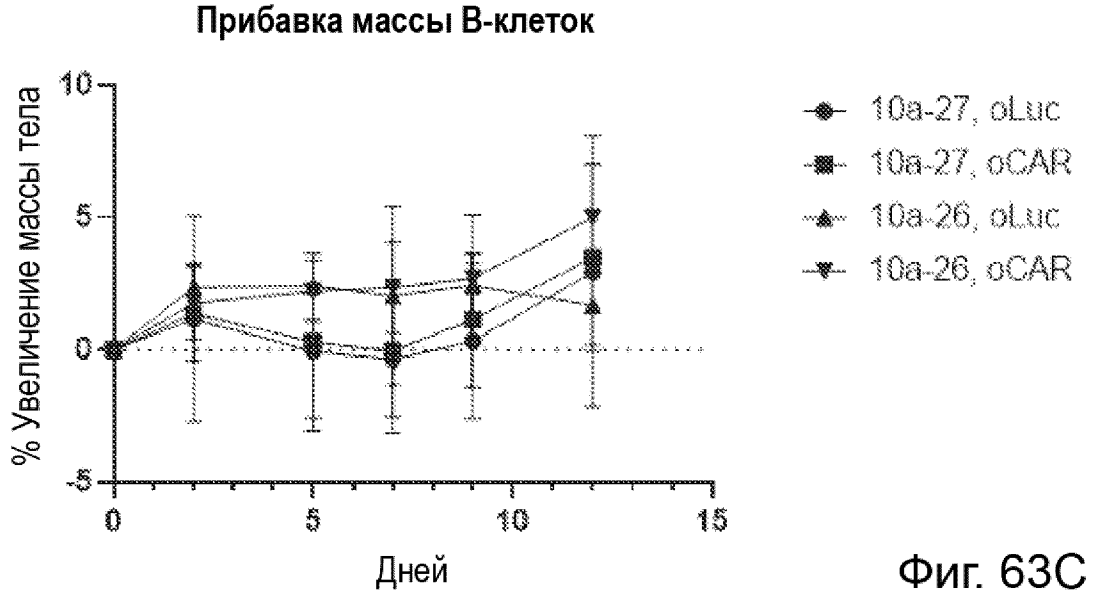
Фиг. 62C



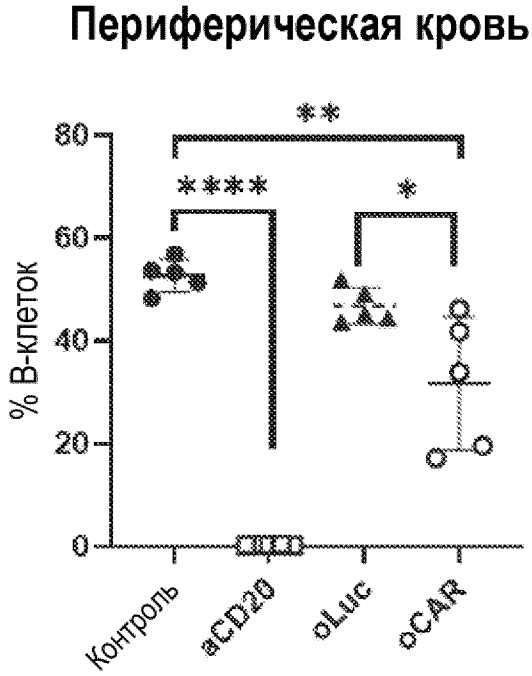
Фиг. 63A



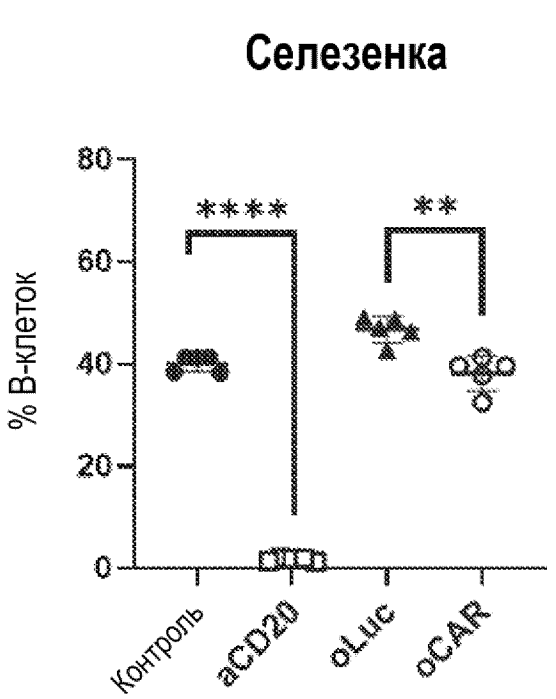
Фиг. 63B



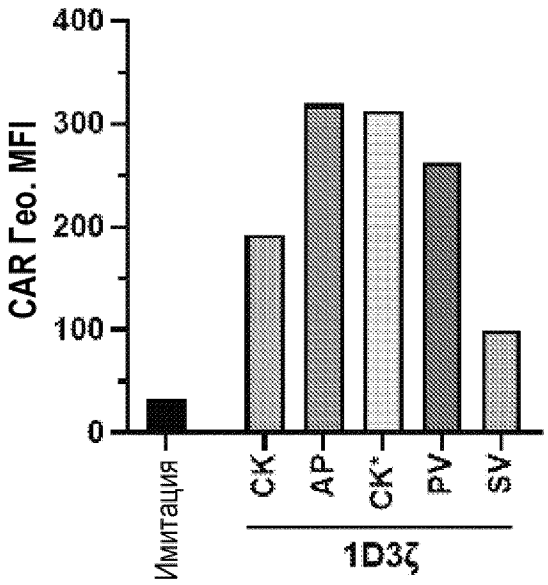
Фиг. 63C



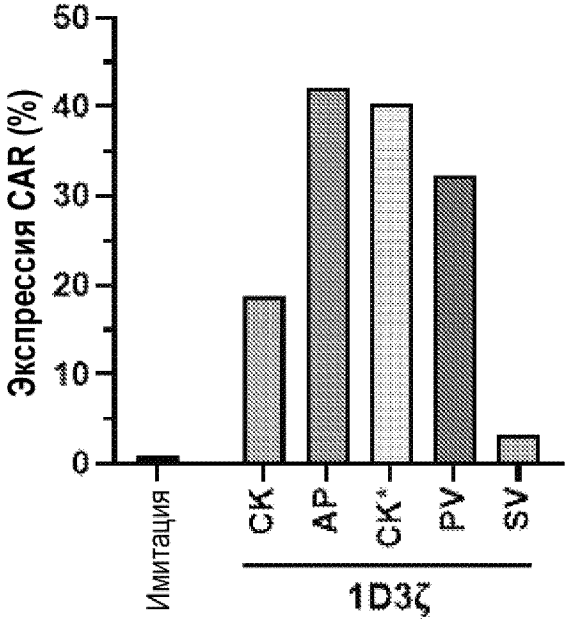
Фиг. 64A



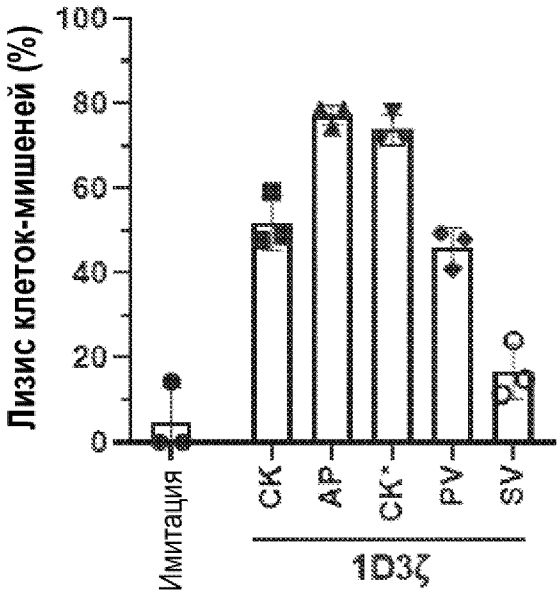
Фиг. 64B



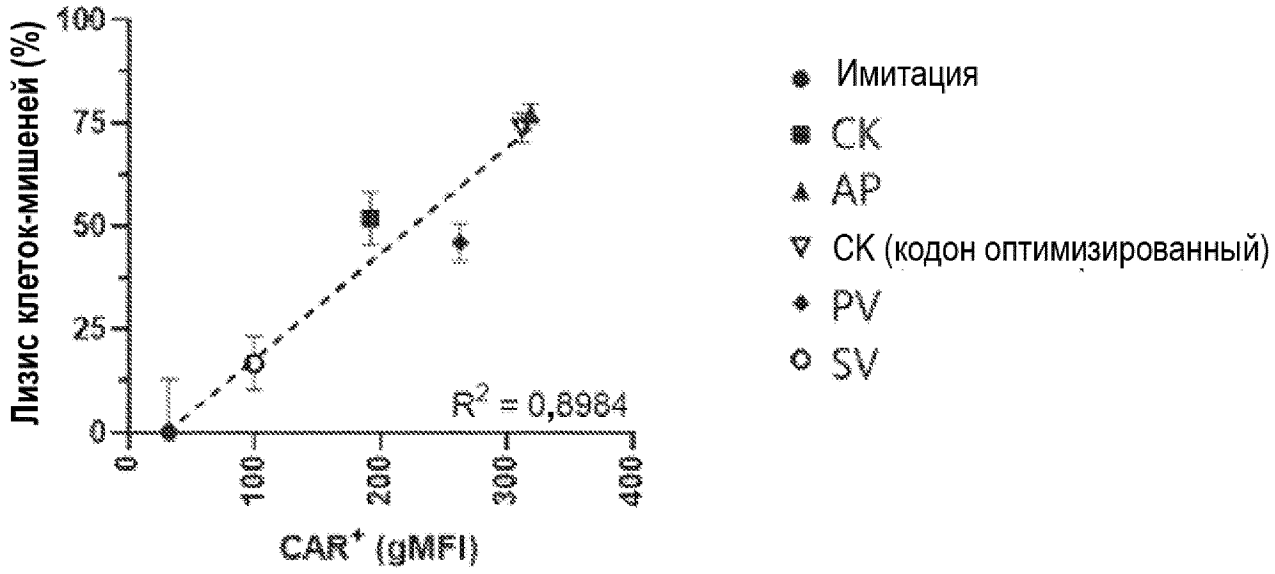
Фиг. 65A



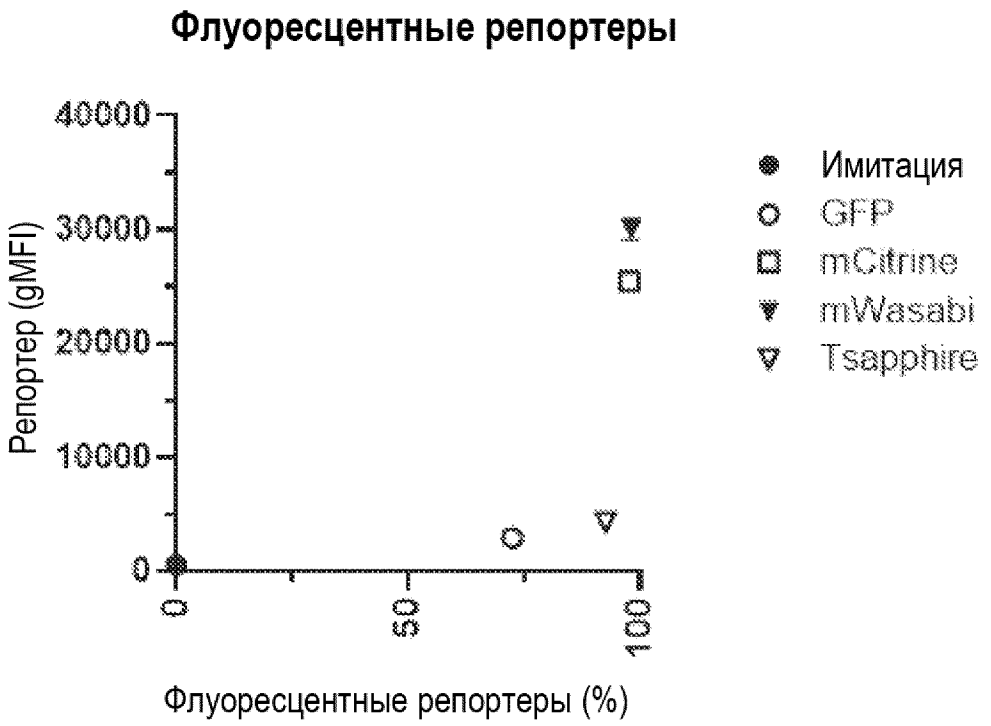
Фиг. 65B



Фиг. 65C


Лизис клеток-мишеней (%)
100
75
50
25
0
0
100
200
300
400
CAR+ (gMFI)
R2 = 0,8984
Имитация
CK
AP
CK (кодон оптимизированный)
PV
SV

Фиг. 66

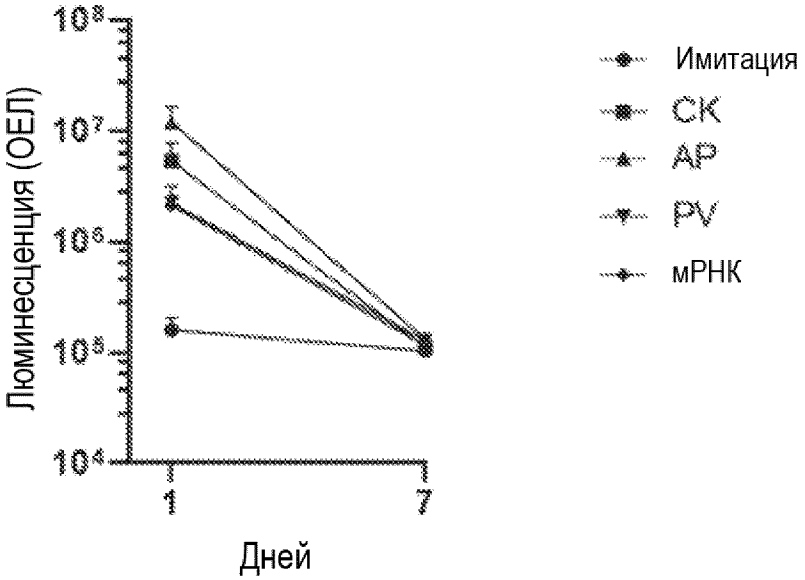


Фиг. 67A



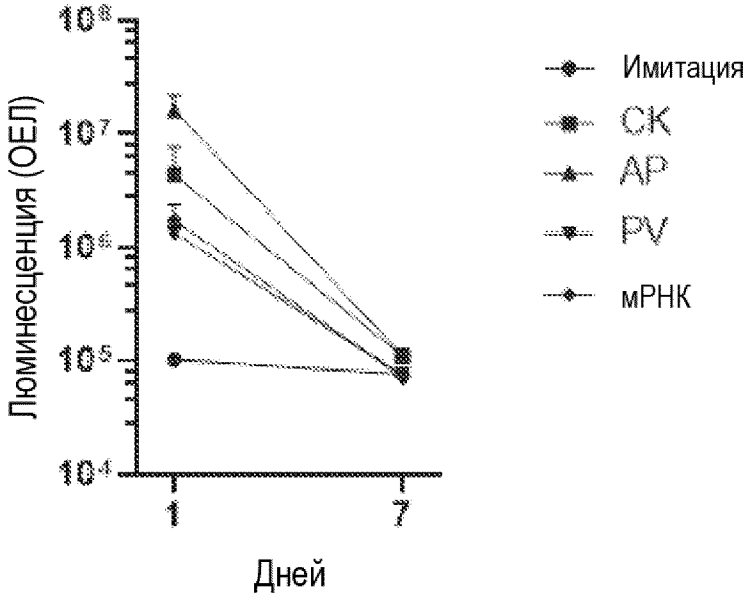
Фиг. 67B

Донор A

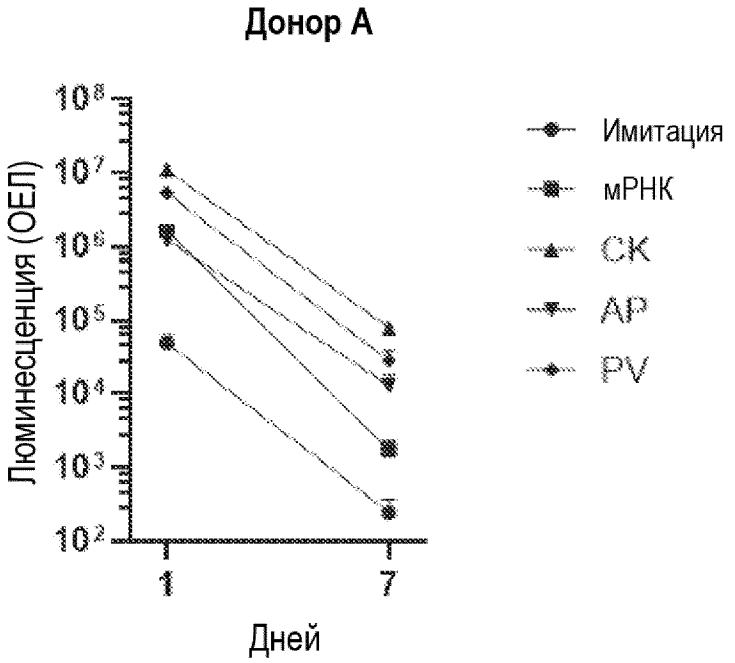


Фиг. 68A

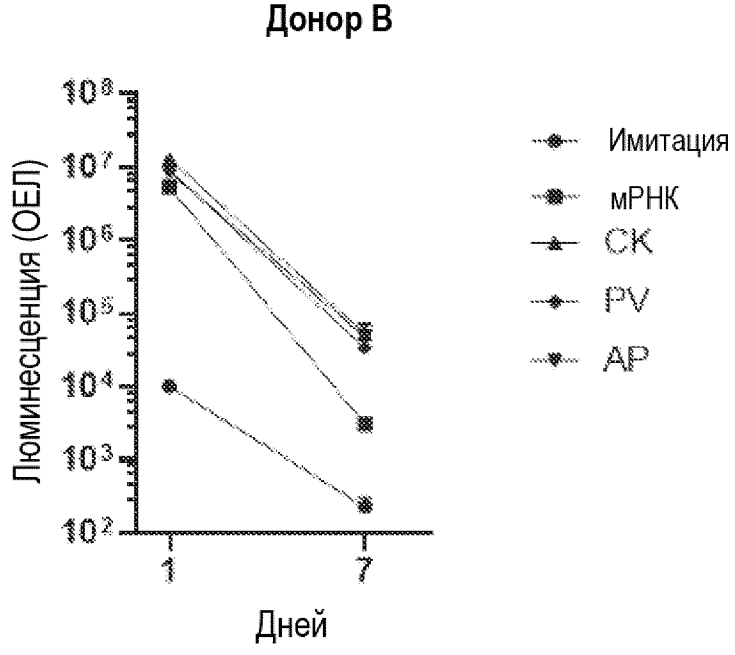
Донор B



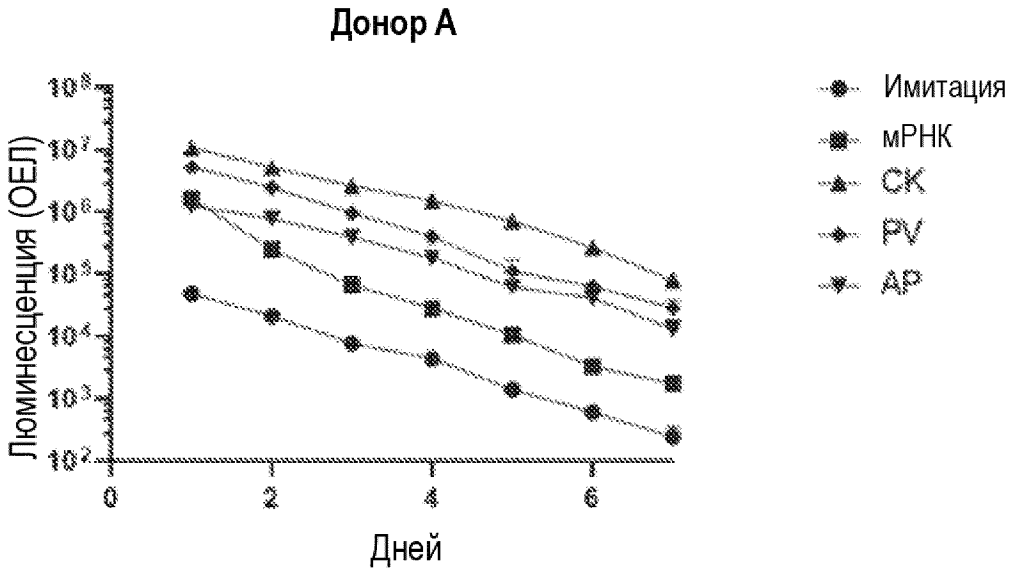
Фиг. 68B



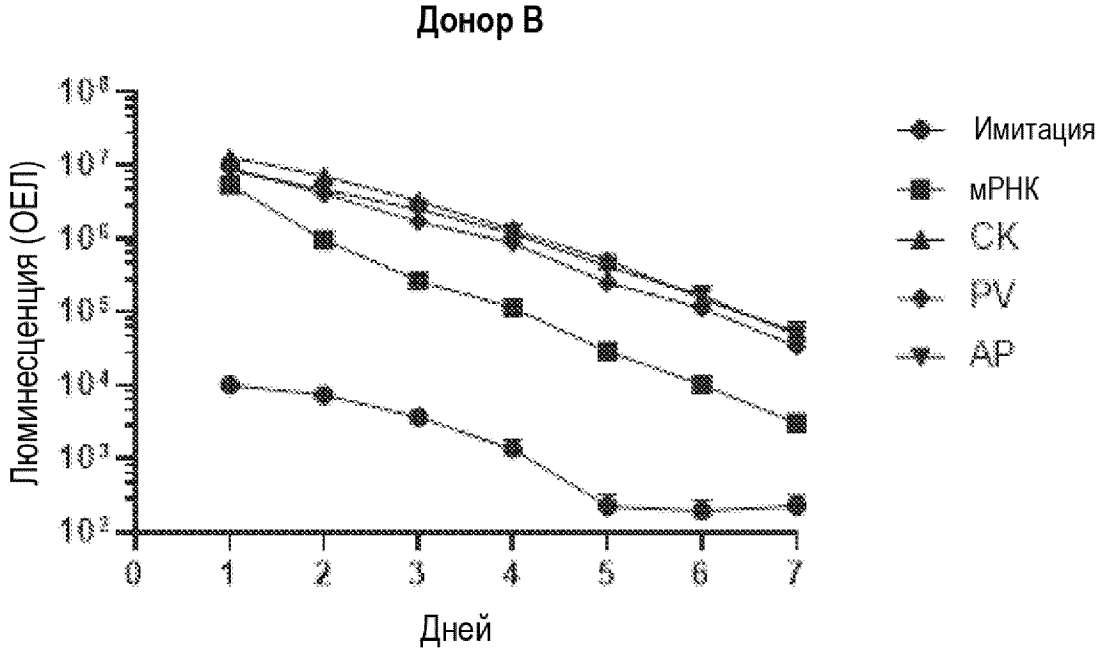
Фиг. 68C



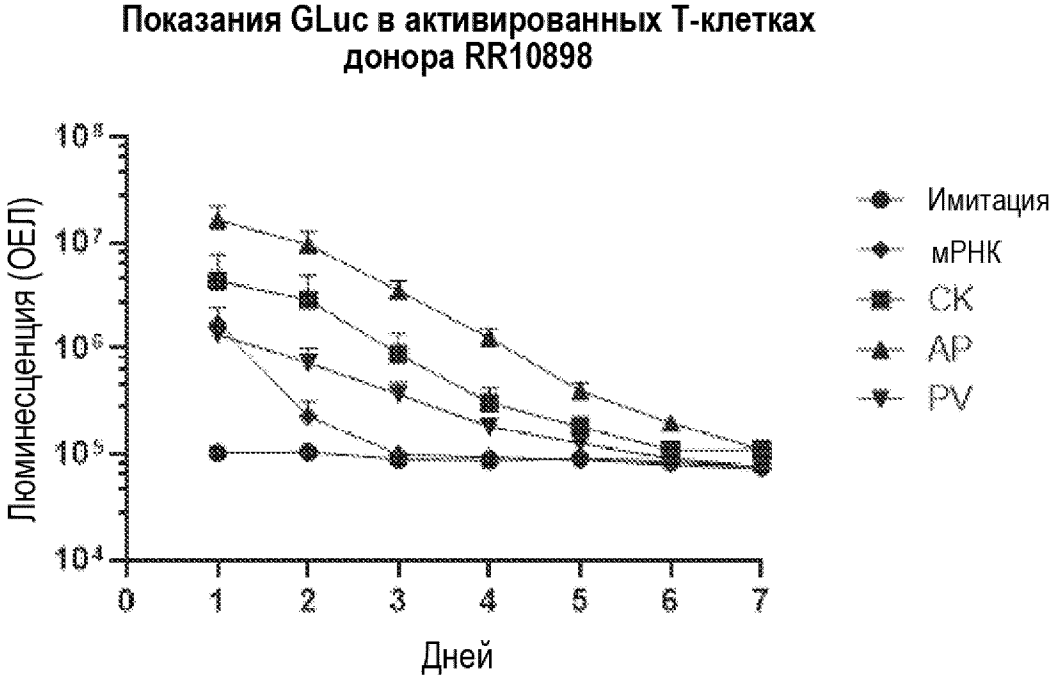
Фиг. 68D



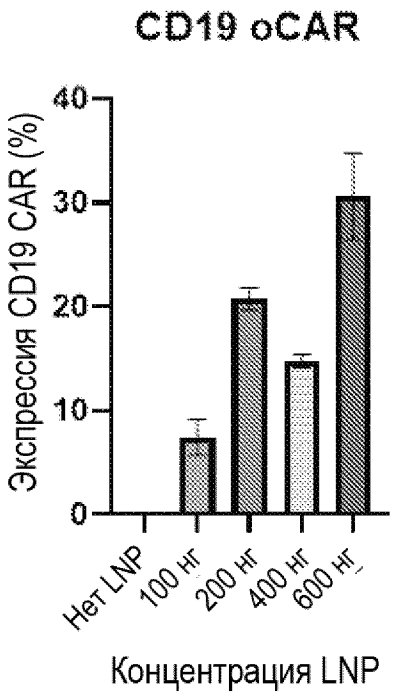
Фиг. 68E



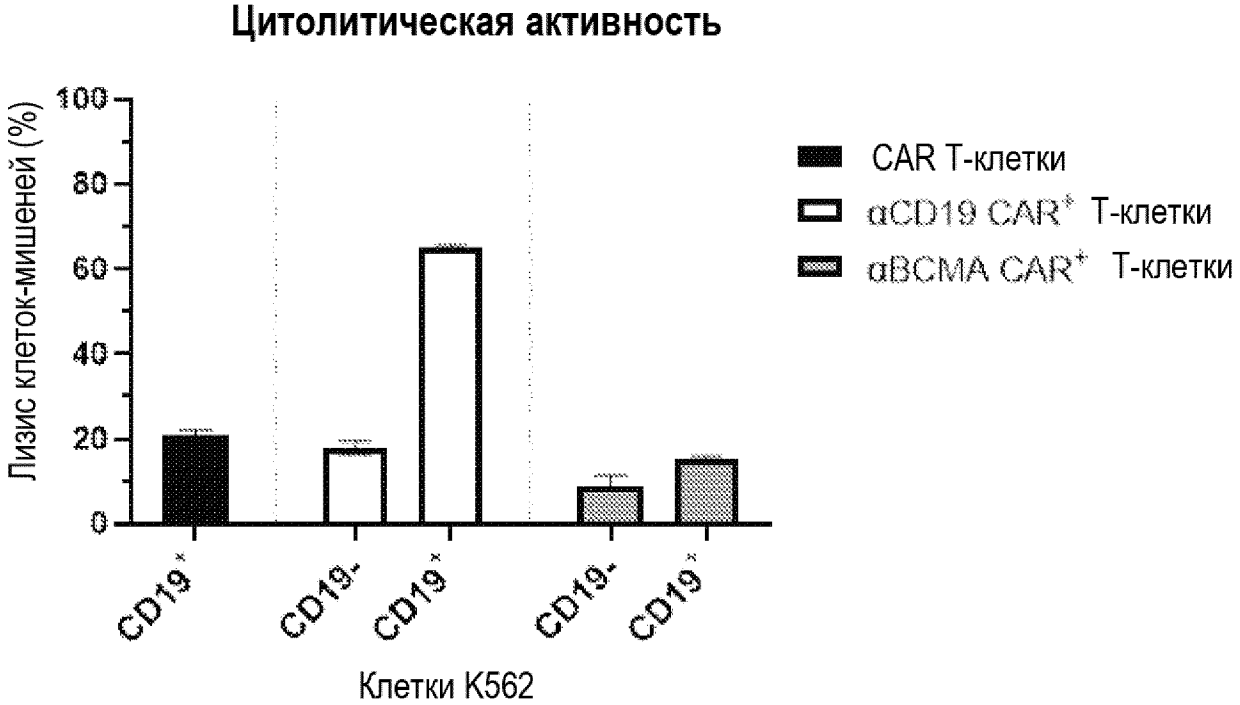
Фиг. 68F


Показания GLuc в активированных Т-клетках донора RR10898
Люминесценция (ОЕЛ)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
0
1
2
3
4
5
6
7
Дней
Имитация
мРНК
СК
АР
PV

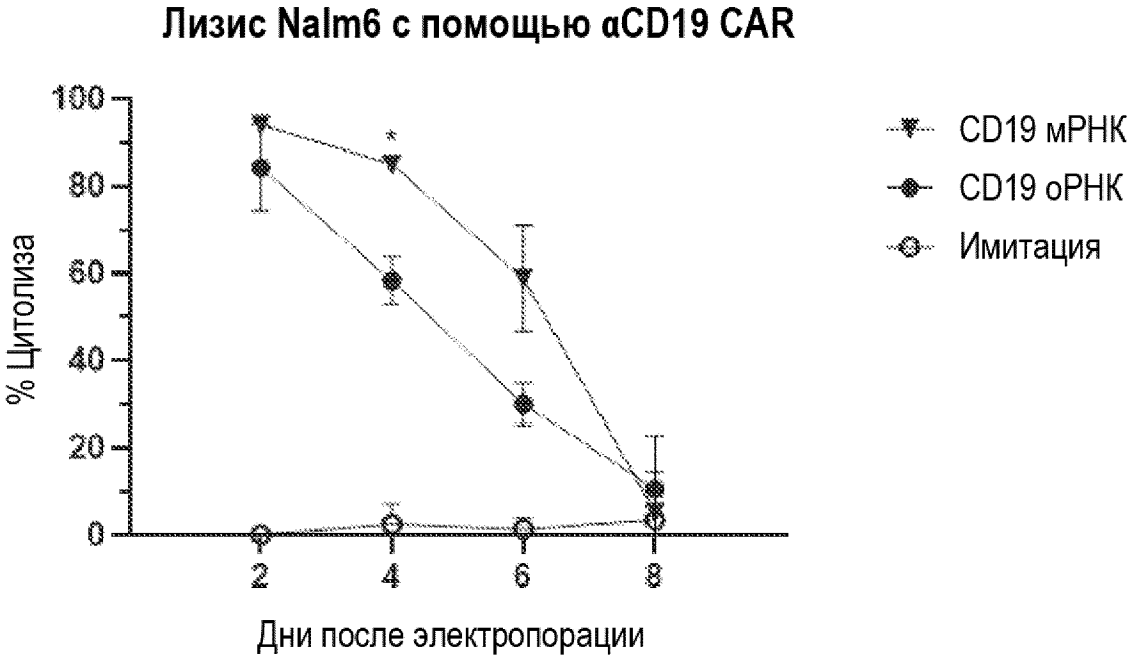
Фиг. 68G



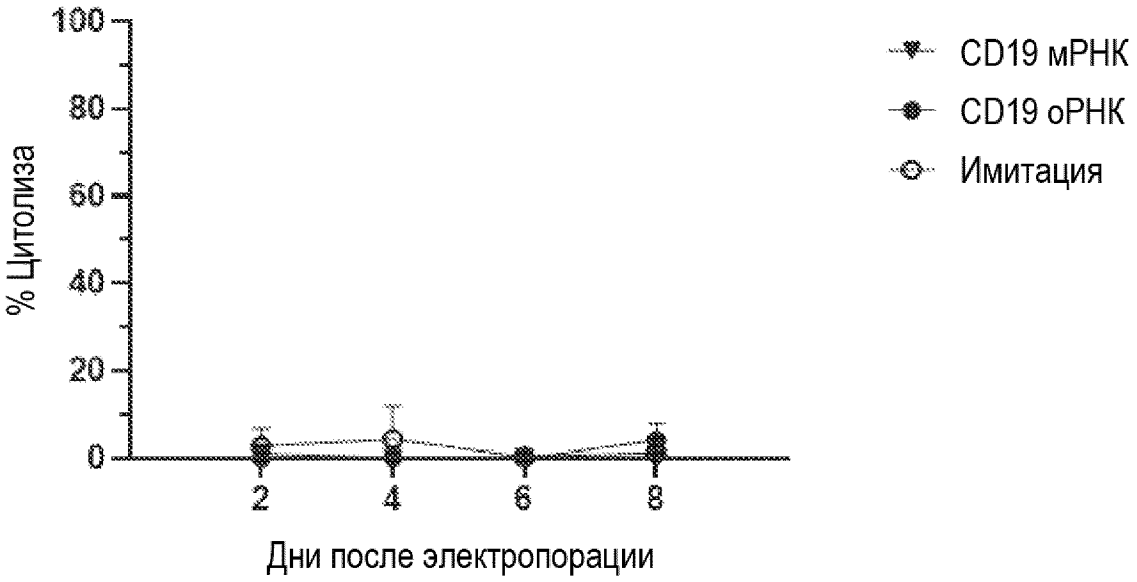
Фиг. 69A



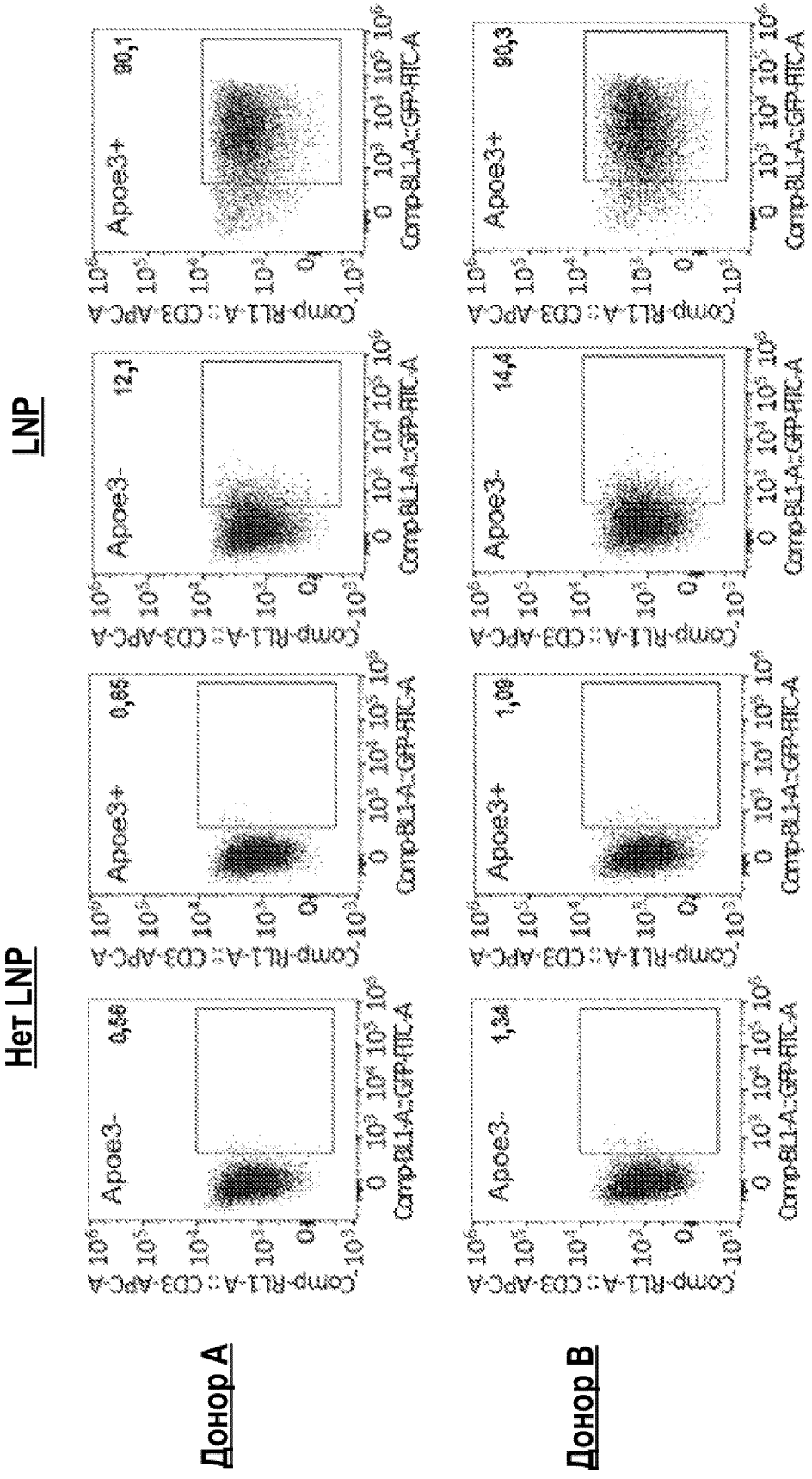
Фиг. 69B



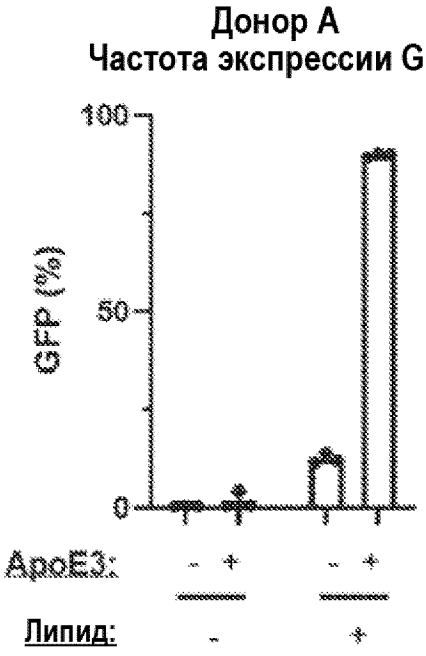
Фиг. 70A



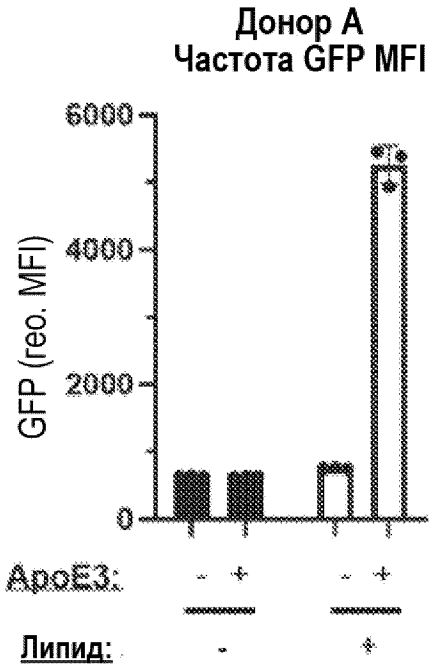
Фиг. 70B


Нет LNP
LNP
Донор A
Донор B
Apoe3-
Apoe3+
0,58
0,85
1,34
1,09
12,1
90,1
14,4
90,3
Comp-RL1-A :: CD3-APC-A
Comp-BL1-A :: GFP-FITC-A

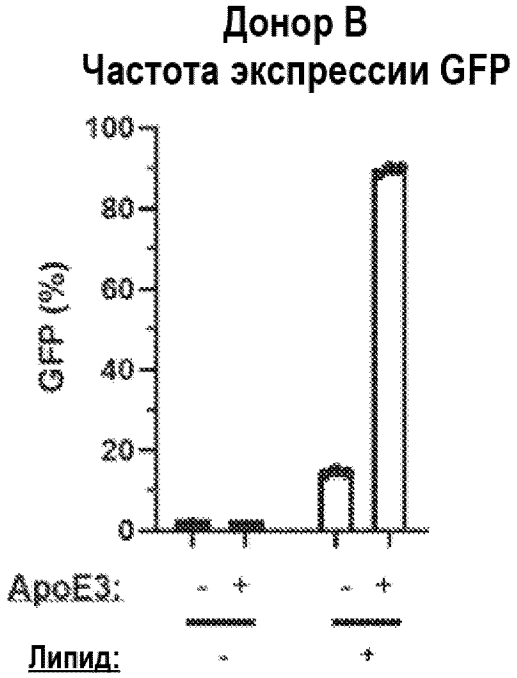
Фиг. 71A



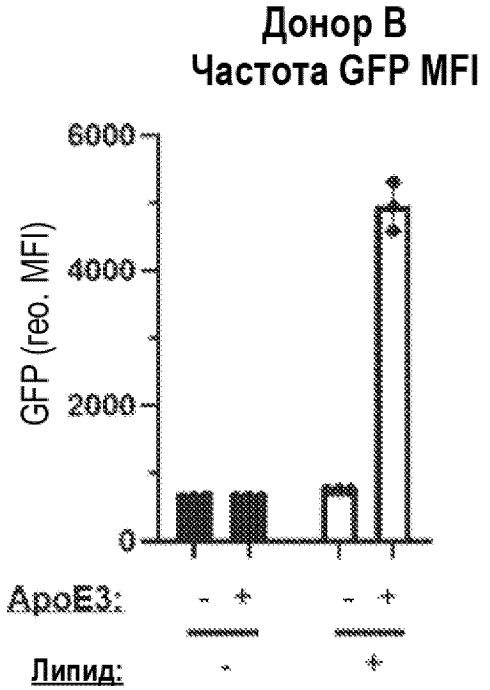
Фиг. 71B



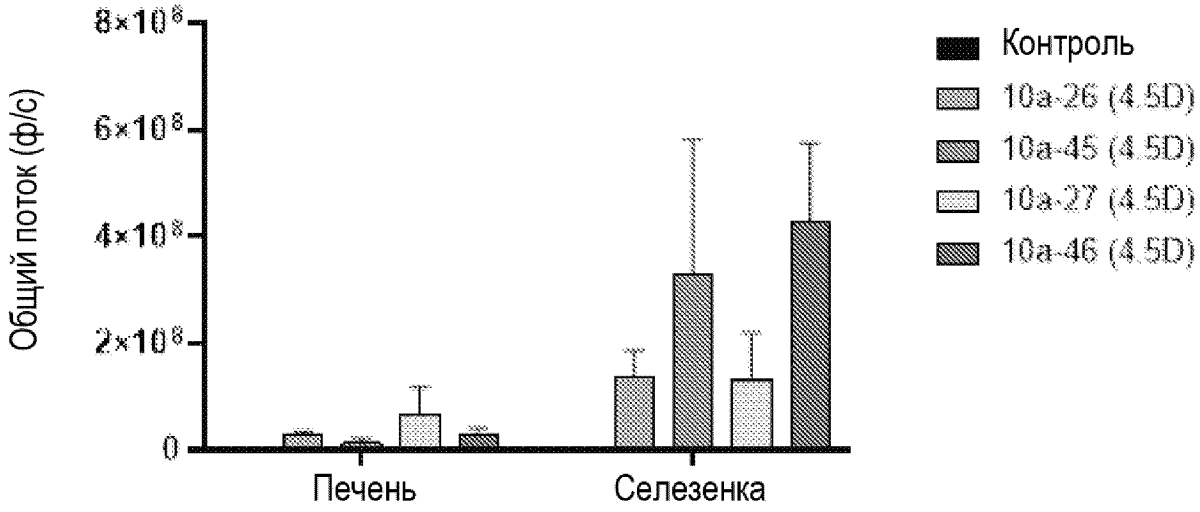
Фиг. 71C



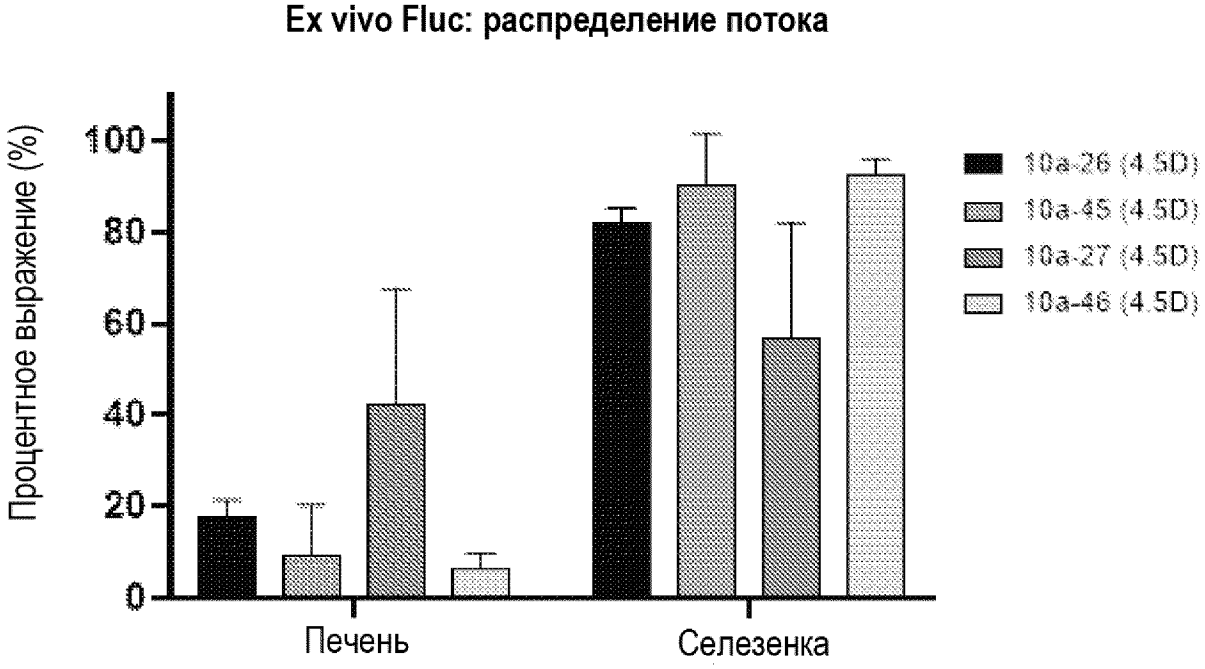
Фиг. 71D



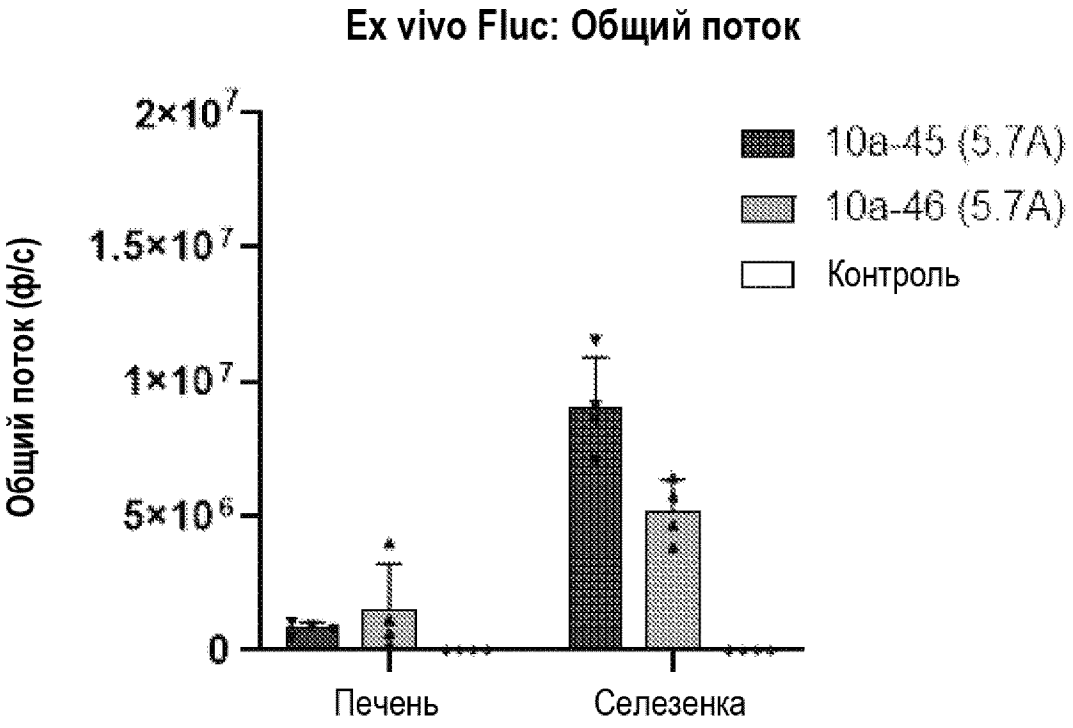
Фиг. 71E



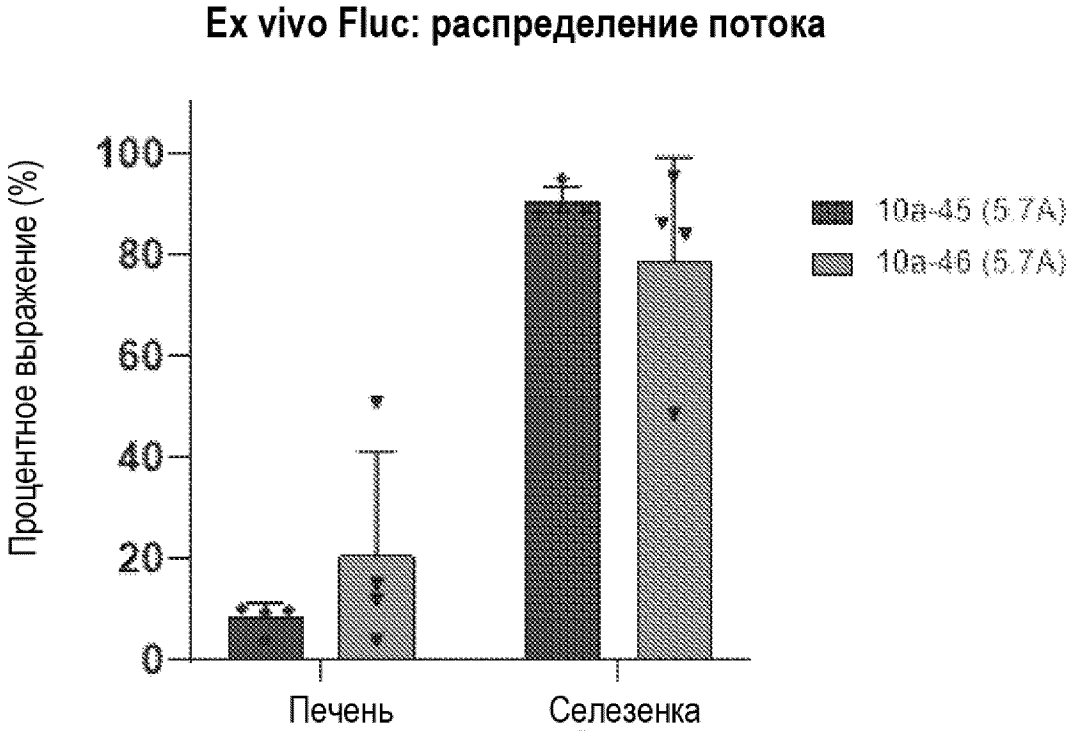
Фиг. 72A



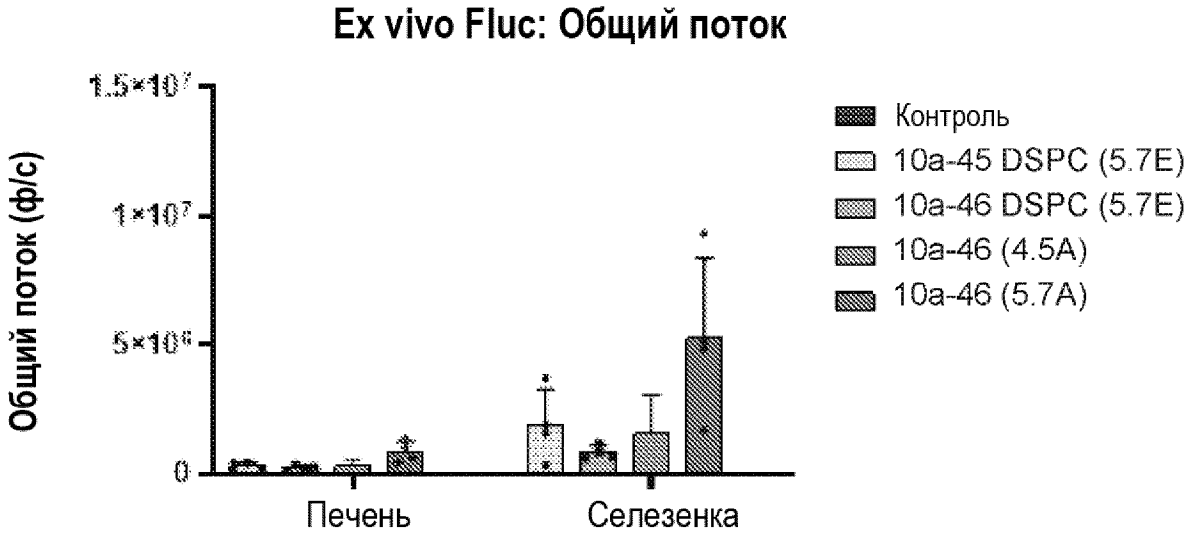
Фиг. 72B



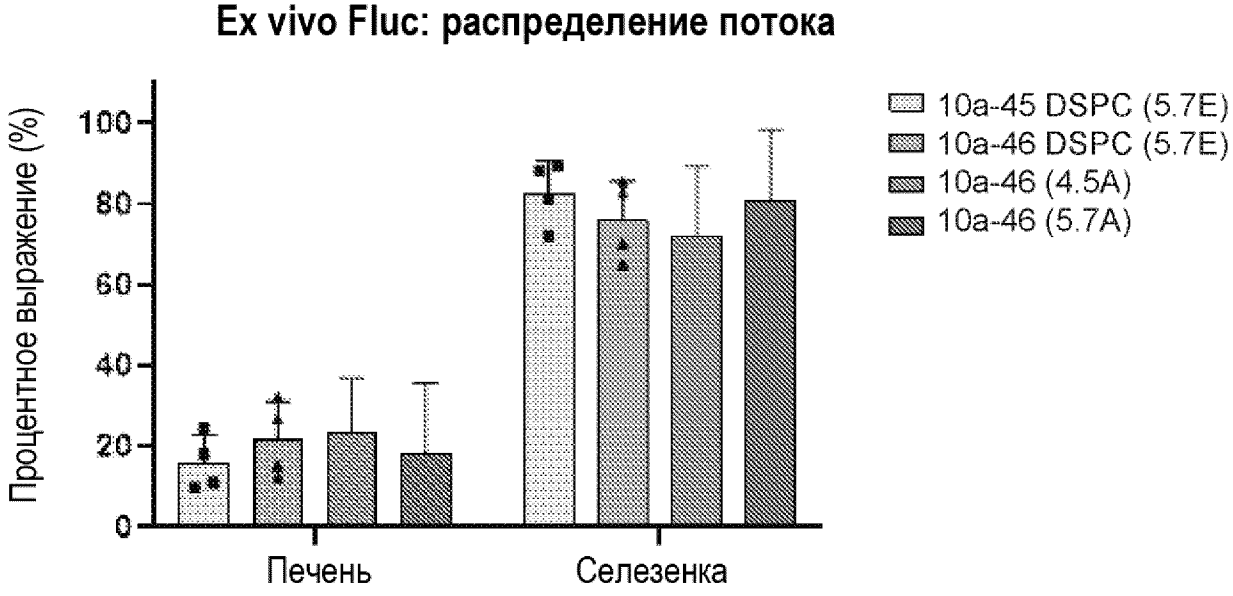
Фиг. 72C



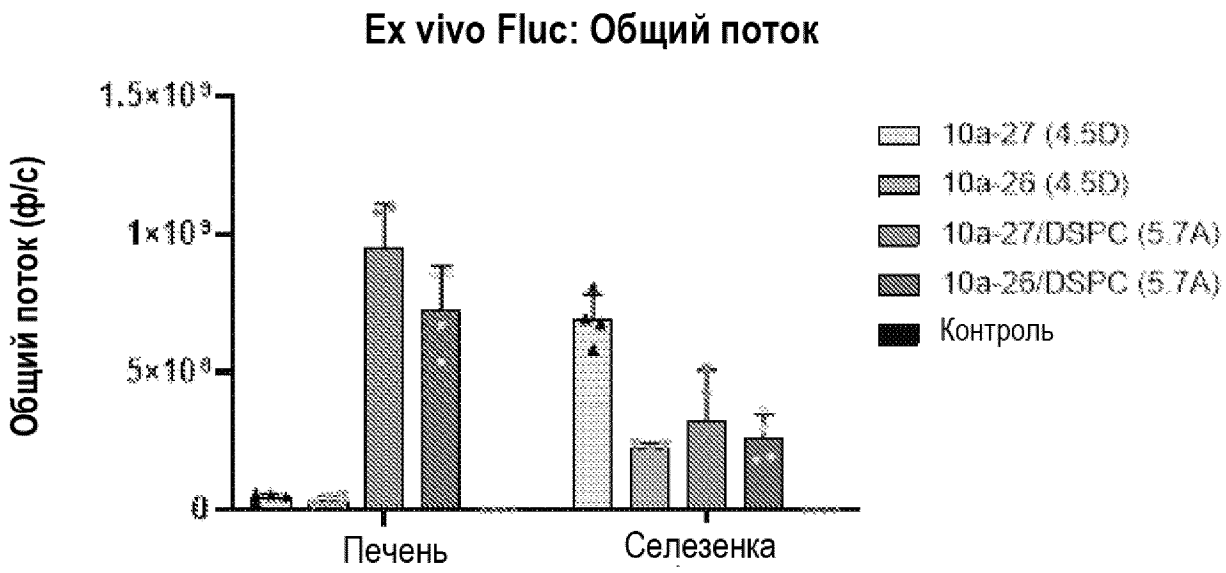
Фиг. 72D



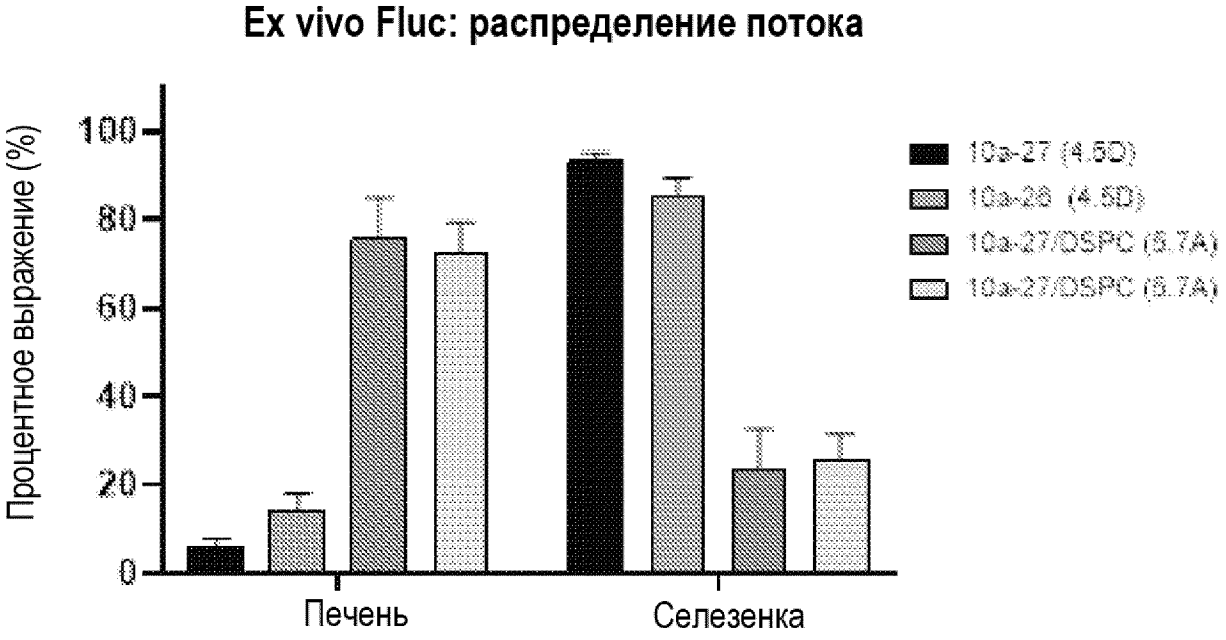
Фиг. 72E



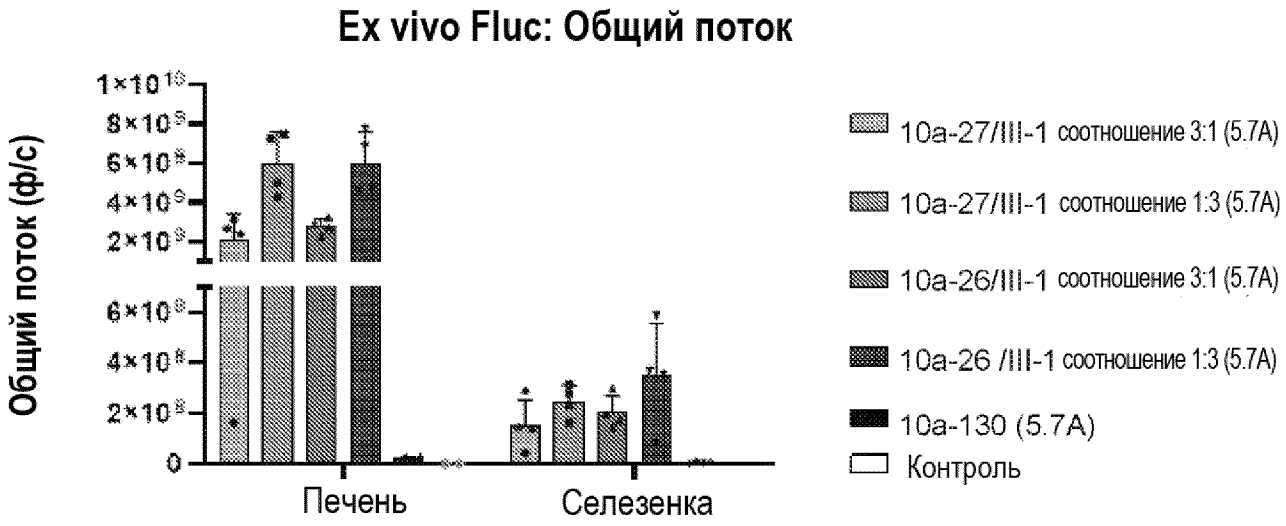
Фиг. 72F



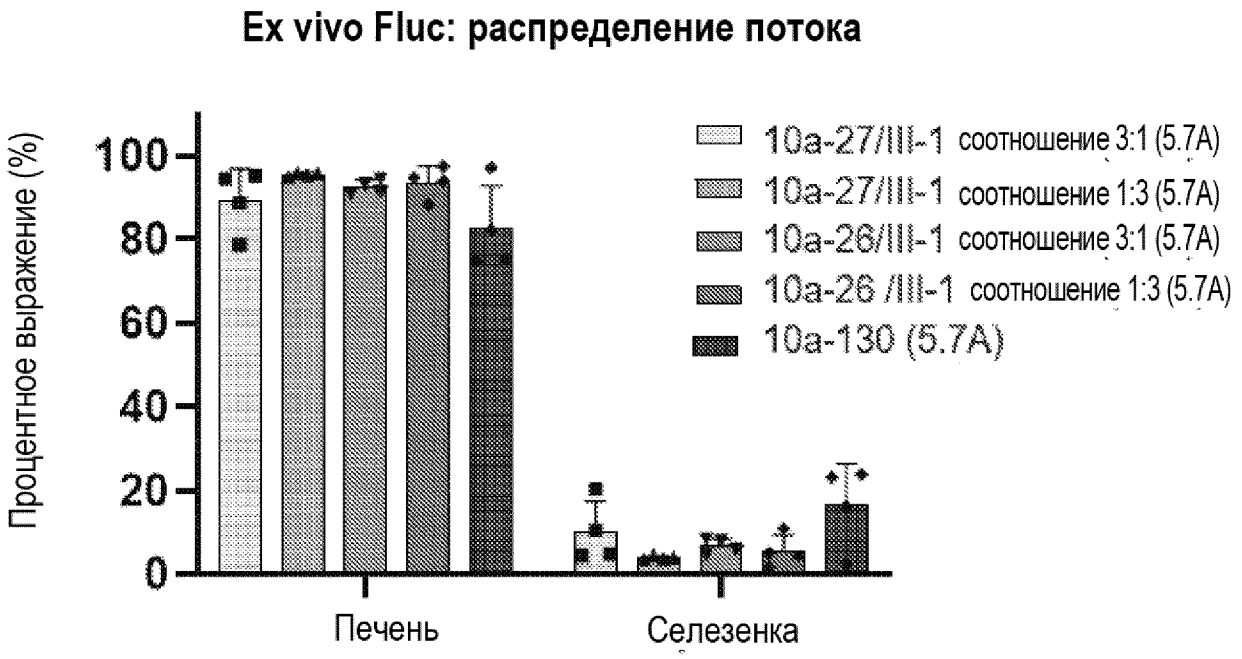
Фиг. 72G



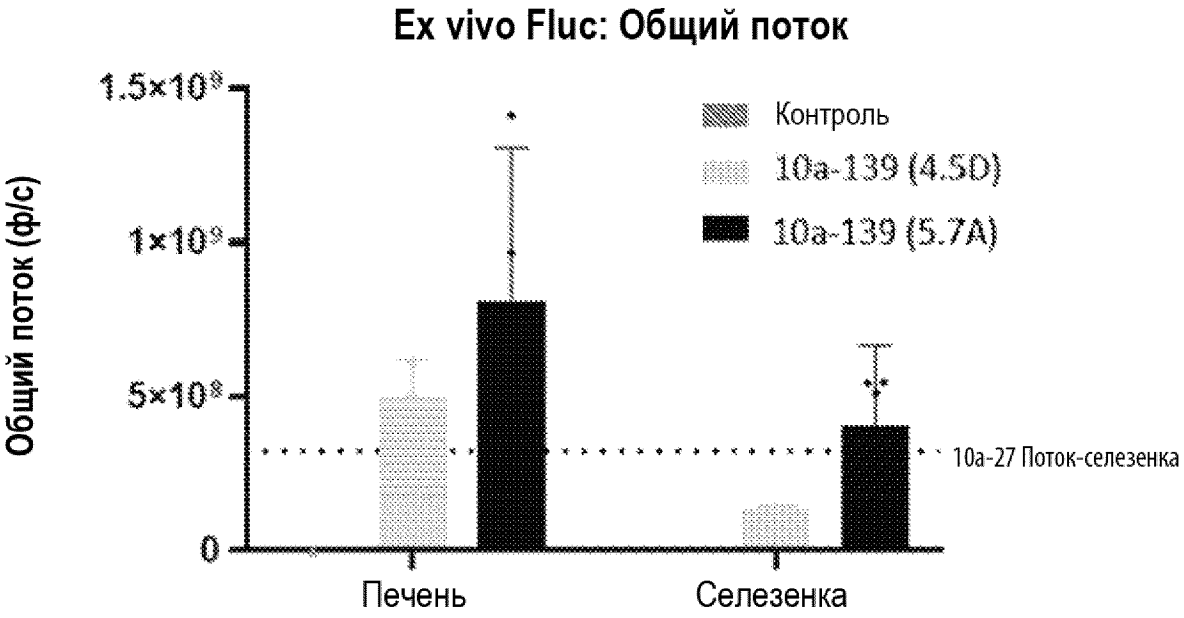
Фиг. 72H



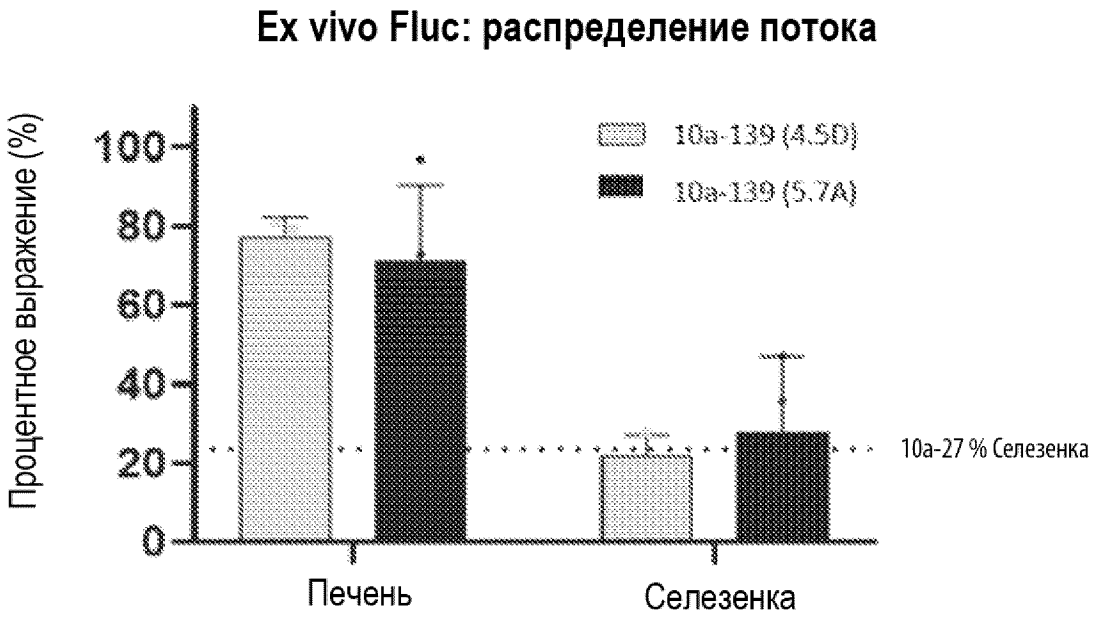
Фиг. 72I



Фиг. 72J



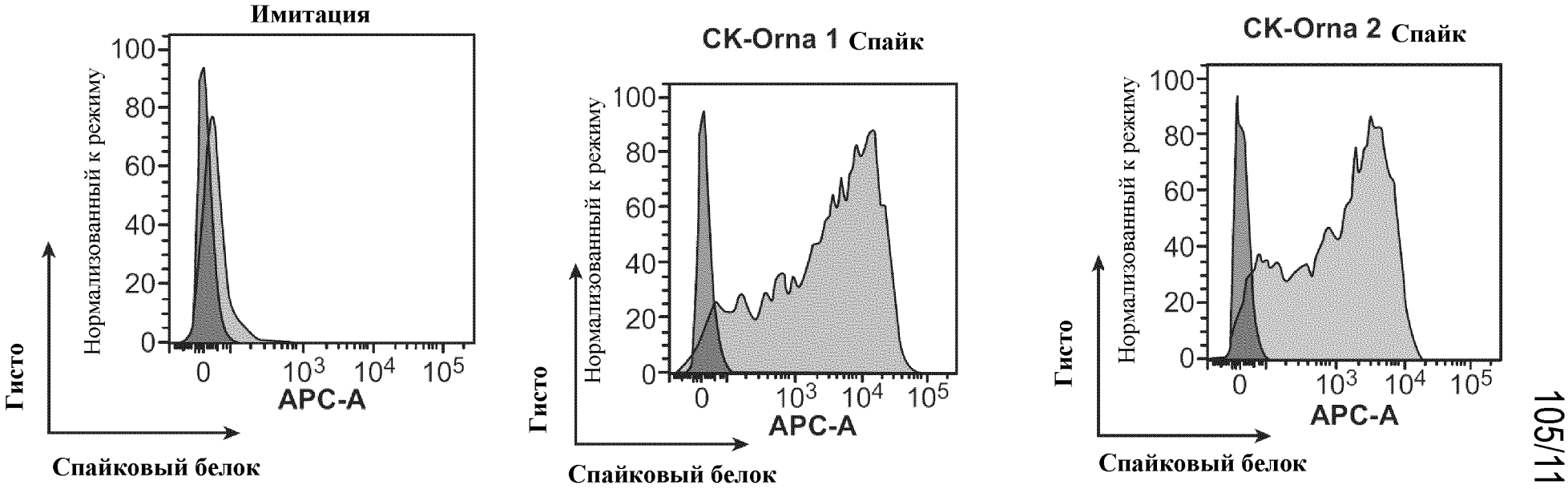
Фиг. 72K



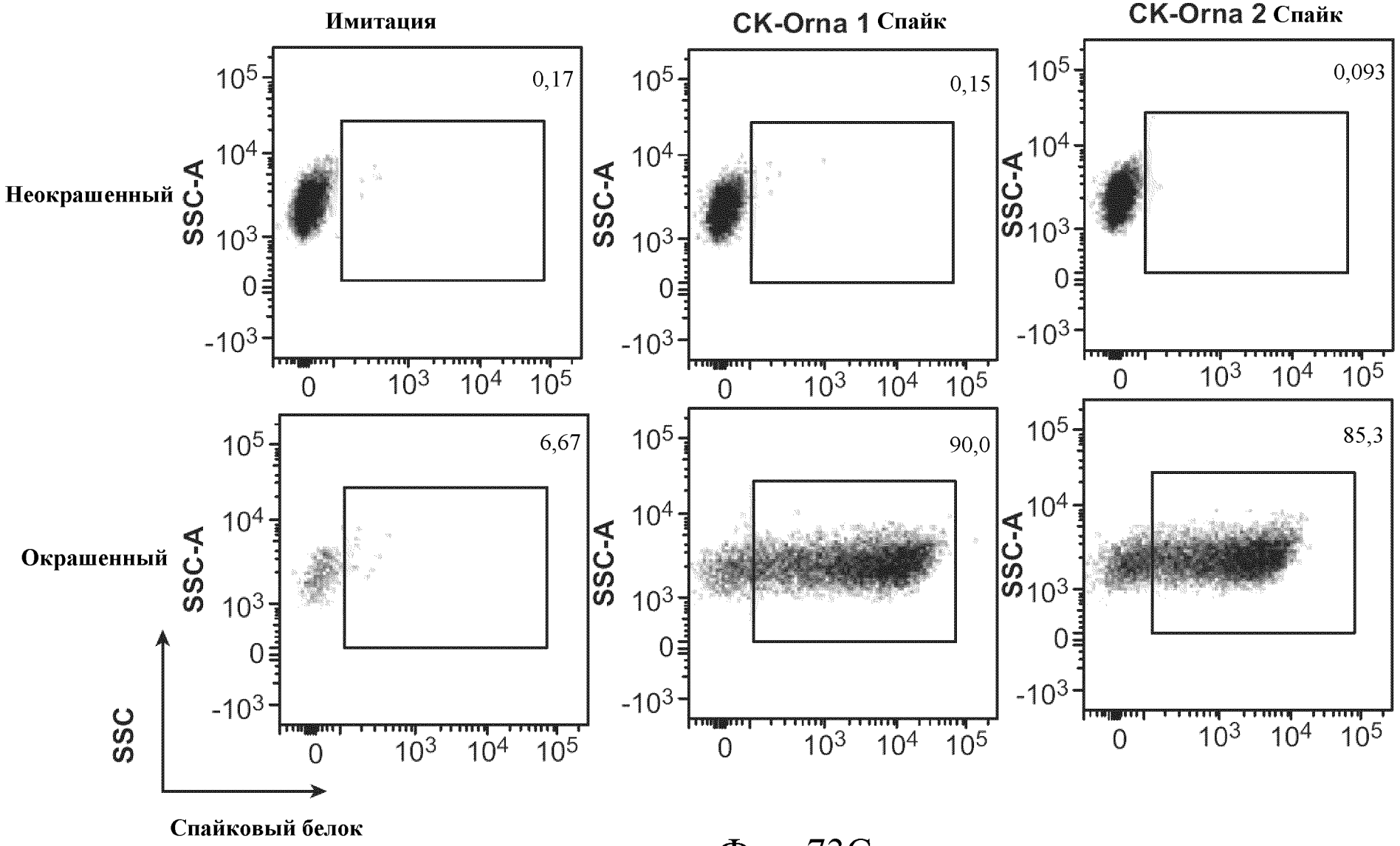
Фиг. 72L

мОЕ
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
Время [мин]

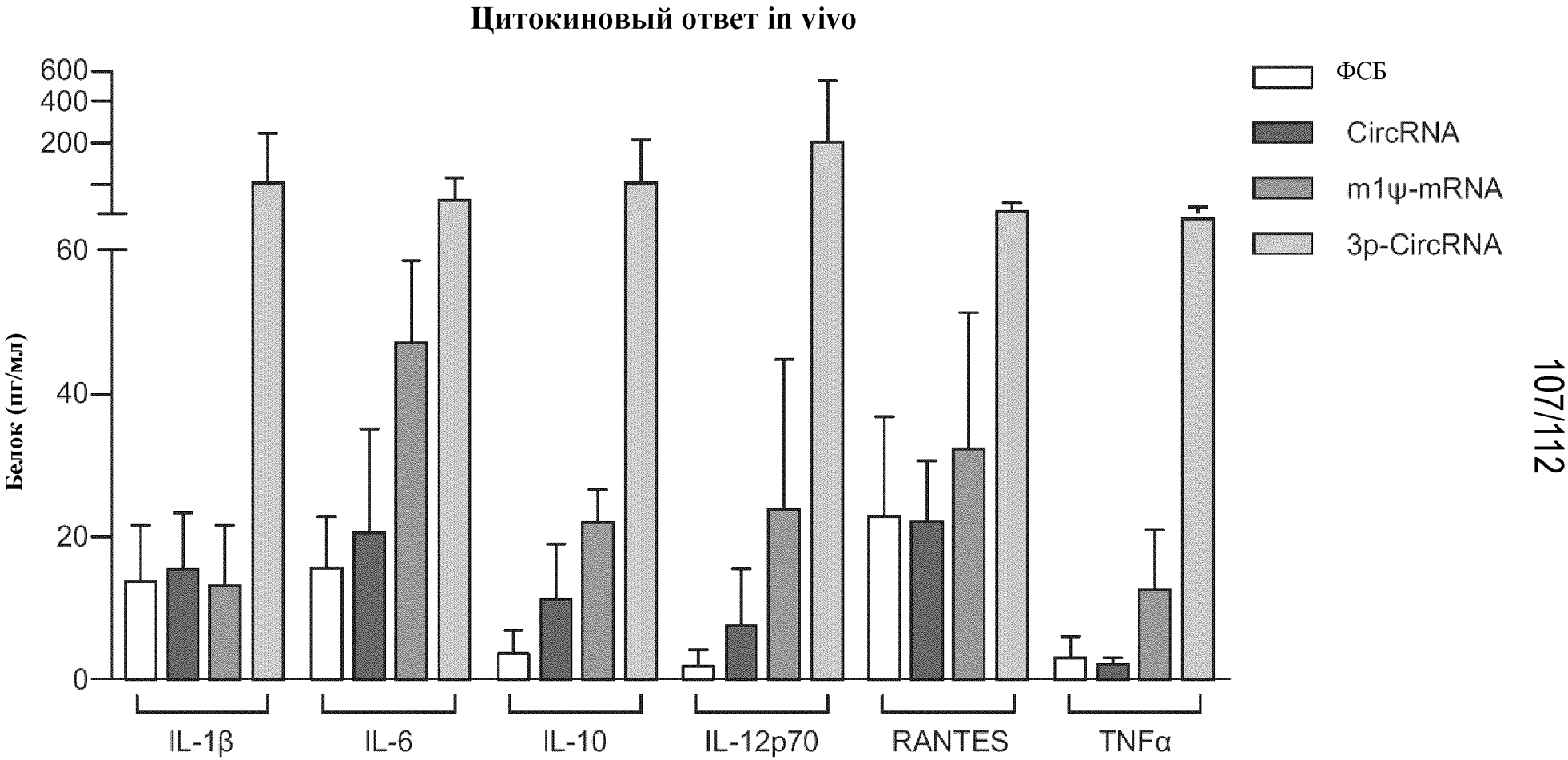
Фиг. 73A


Имитация
CK-Orna 1 Спайк
CK-Orna 2 Спайк
Нормализованный к режиму
Гисто
Спайковый белок
APC-A
0
20
40
60
80
100
0
10^3
10^4
10^5

Фиг. 73B

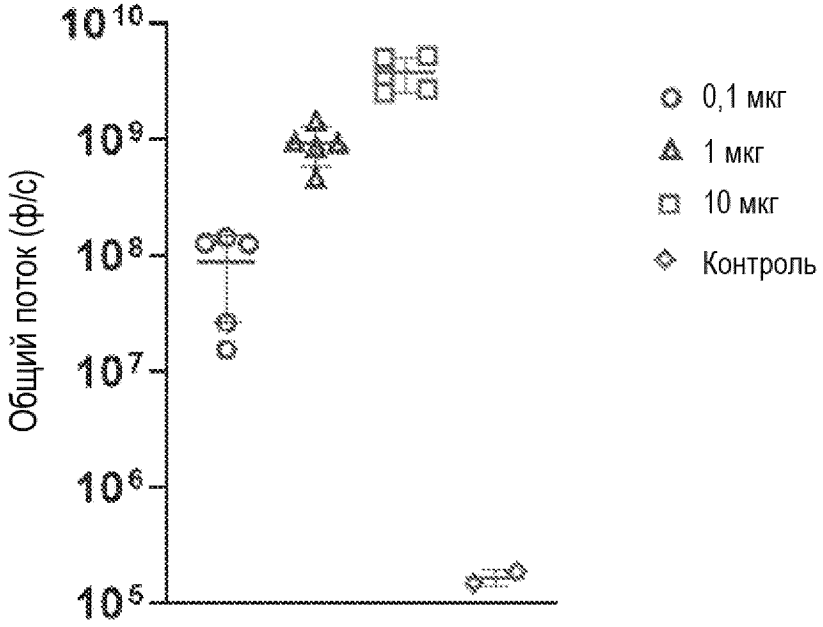

Имитация
CK-Orna 1 Спайк
CK-Orna 2 Спайк
Неокрашенный
Окрашенный
SSC-A
SSC
Спайковый белок
0,17
0,15
0,093
6,67
90,0
85,3

Фиг. 73C


Цитокиновый ответ in vivo
Белок (пг/мл)
600
400
200
60
40
20
0
ФСБ
CircRNA
m1ψ-mRNA
3p-CircRNA
IL-1β
IL-6
IL-10
IL-12p70
RANTES
TNFα

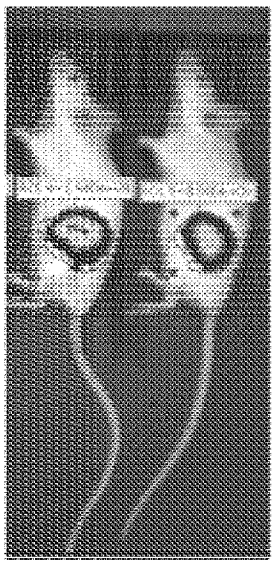
Фиг. 74

Живой поток всего тела через 6 часов после внутримышечной инъекции

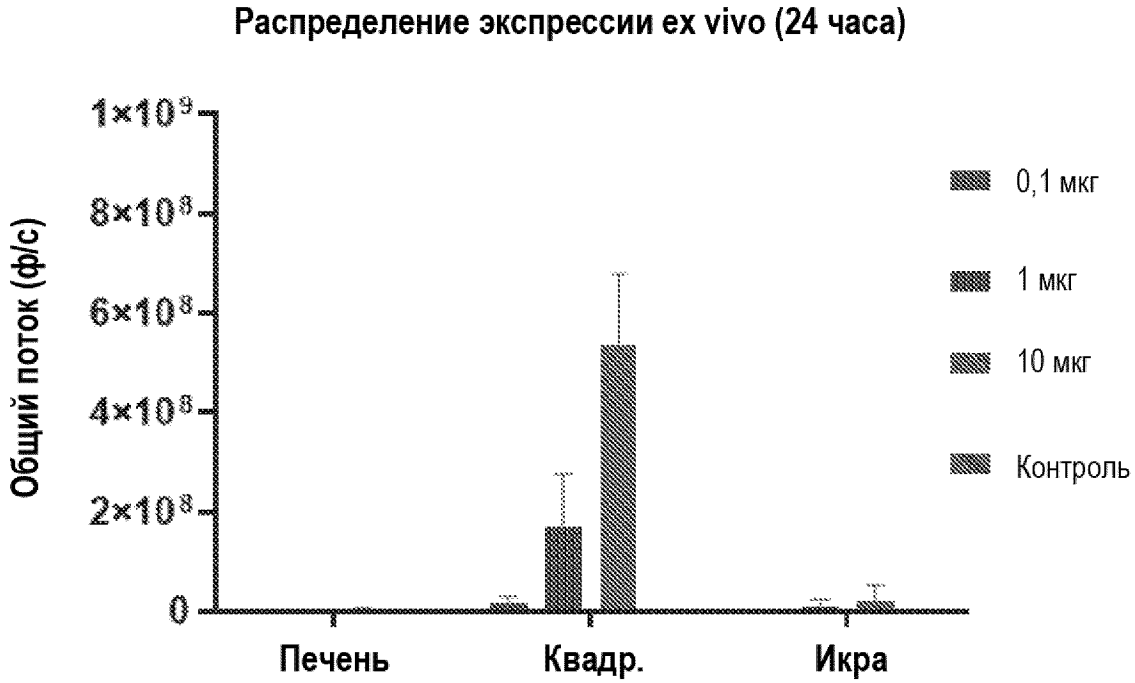


Фиг. 75A

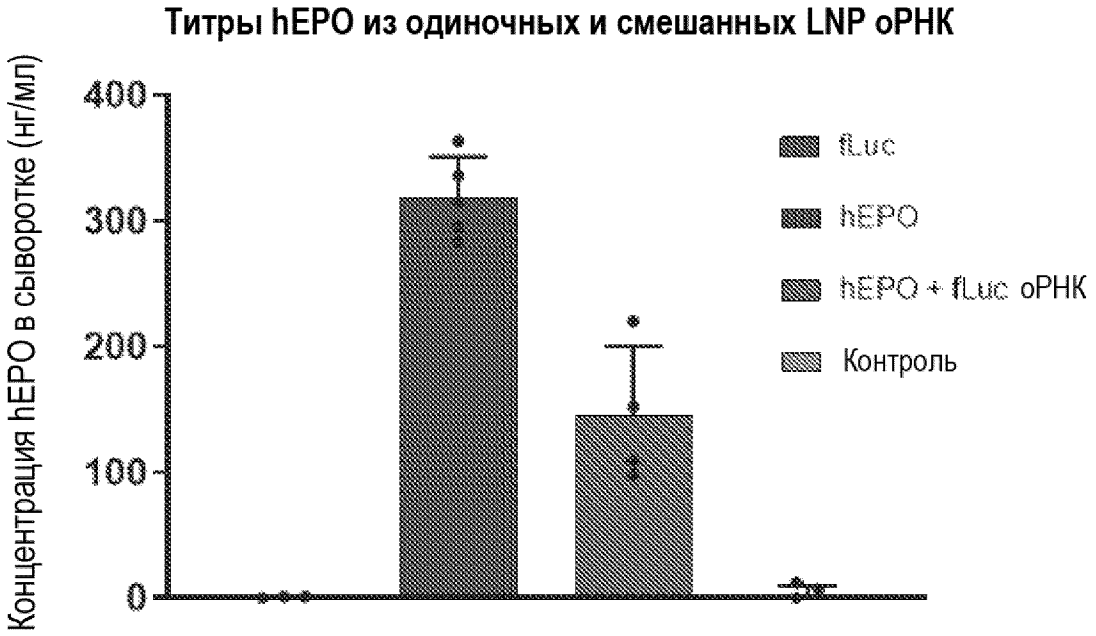
IVIS всего тела: 1 мкг дозы внутримышечно через 6 часов



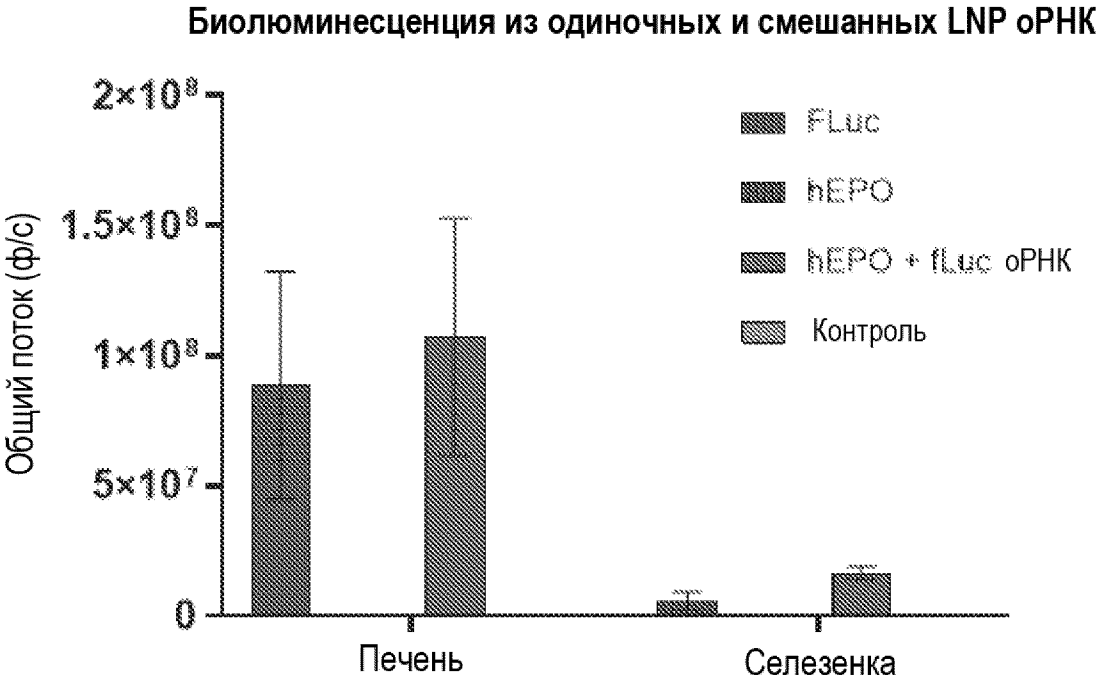
Фиг. 75B


Распределение экспрессии ex vivo (24 часа)
Общий поток (ф/с)
1×10⁹
8×10⁸
6×10⁸
4×10⁸
2×10⁸
0
Печень
Квадр.
Икра
0,1 мкг
1 мкг
10 мкг
Контроль

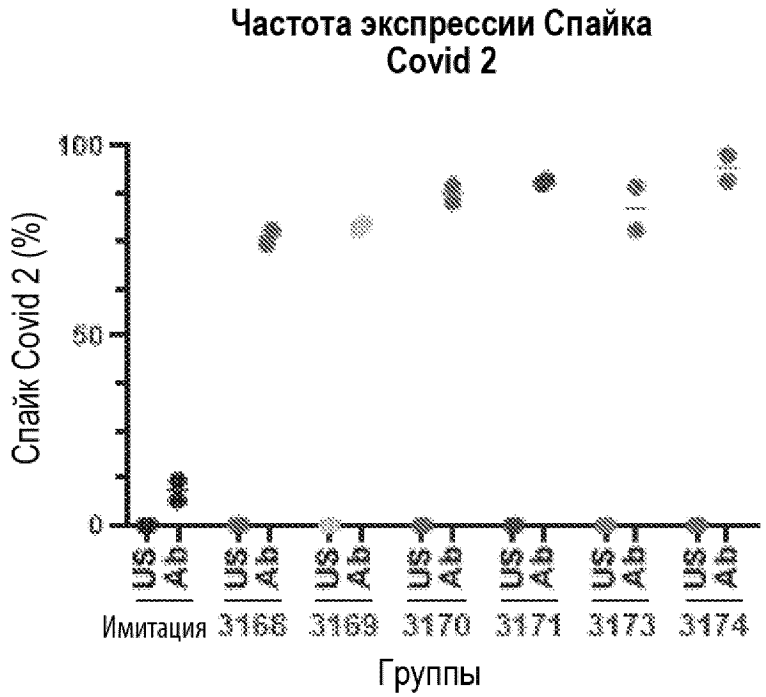
Фиг. 75C



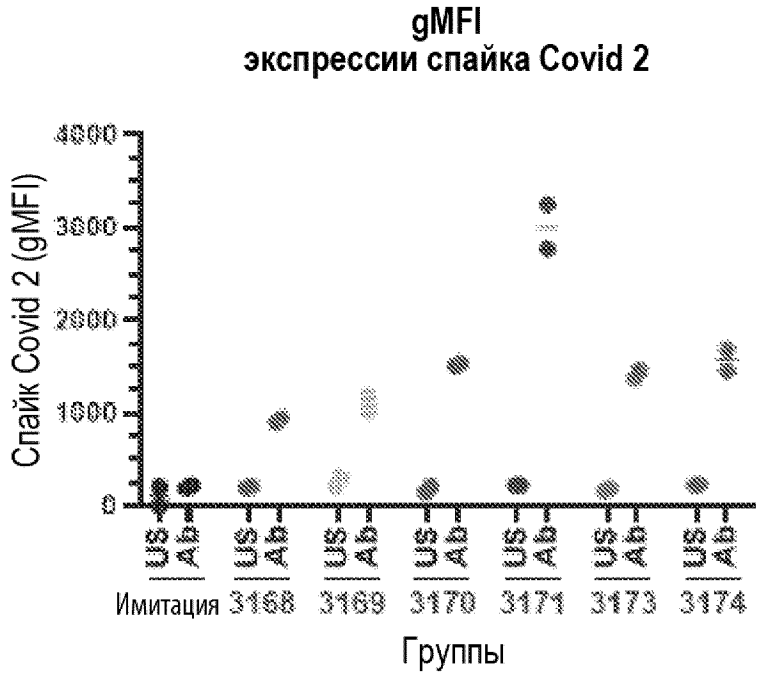
Фиг. 76A



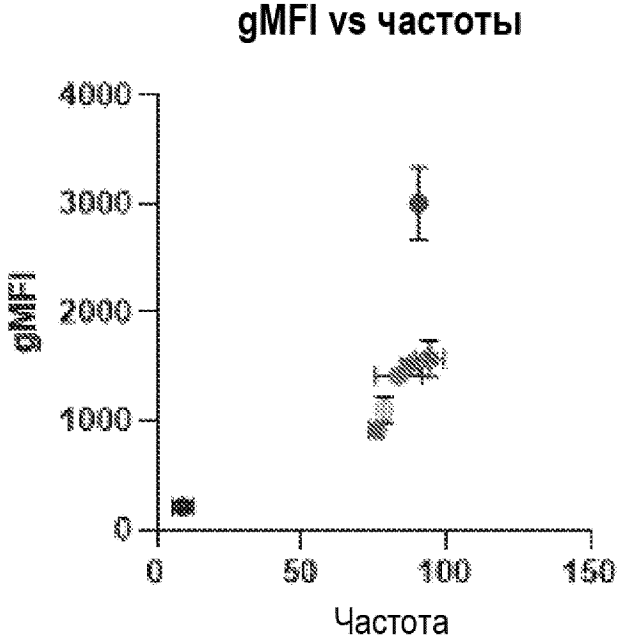
Фиг. 76B



Фиг. 77A



Фиг. 77B


gMFI vs частоты
4000
3000
2000
1000
0
gMFI
0
50
100
150
Частота

Фиг. 77C