(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390558 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.11

(22) Дата подачи заявки
2021.09.03

(51) Int. Cl. ***A61K 39/12*** (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **63/074,428; 63/125,769; 63/191,020**
(32) **2020.09.03; 2020.12.15; 2021.05.20**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/049077**
(87) **WO 2022/051629 2022.03.10**

(71) Заявитель:
ФЛАГШИП ПИОНИРИНГ ИННОВЕЙШНС VI, ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:
Кахведжян Авак, Де Бур Александра София, Эшелар Ян Поль Ги Регис, Плугис Николас Маккартни, Вайнштейн Эрика Габриэль, Нельсон Дженнифер А. (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены композиции, фармацевтические препараты на основе полирибонуклеотидов, кодирующих один или несколько иммуногенных полипептидов, и пути их применения. В частности, в настоящем изобретении предусмотрен кольцевой полирибонуклеотид, кодирующий один или несколько иммуногенных полипептидов.

202390558 A1

202390558 A1

ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 2 сентября 2021 года, называется 51509-045WO2_Sequence_Listing_9_2_21_ST25 и имеет размер 52787 байтов.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вакцинация внесла огромный вклад в здоровье как людей, так и животных. С момента изобретения первой вакцины в 1796 году вакцины стали считаться наиболее успешным способом предупреждения многих инфекционных заболеваний посредством стимуляции иммунного ответа у субъекта. По данным Всемирной организации здравоохранения, иммунизация в настоящее время предотвращает от 2 до 3 миллионов смертей ежегодно во всех возрастных группах. На сегодняшний день были разработаны вакцины для предупреждения и контроля распространения более 20 инфекционных заболеваний, включая дифтерию, столбняк, коклюш, грипп и корь, и привели к полной эрадикации натуральной оспы. Остается потребность в разработке новых и улучшенных иммуногенных композиций и путей их применения.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлены композиции, фармацевтические препараты на основе полирибонуклеотидов (например, кольцевых или линейных полирибонуклеотидов), кодирующих один или несколько иммуногенов, и пути их применения. В частности, в настоящем изобретении представлены кольцевые полирибонуклеотиды, кодирующие несколько иммуногенов, кольцевые полирибонуклеотиды, кодирующие по меньшей мере один иммуноген и дополнительно кодирующие по меньшей мере один адъювант, и композиции, содержащие несколько кольцевых полирибонуклеотидов. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам применения кольцевых полирибонуклеотидов, кодирующих один или несколько полипептидных иммуногенов. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут индуцировать иммунный ответ у субъекта при введении. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, можно

применять для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В одном аспекте в настоящем документе представлен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий множество последовательностей, каждая из которых кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два (например, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь и по меньшей мере девять) полипептидных иммуногена характеризуются по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%) идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются по меньшей мере 95% (например, 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%) идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов характеризуются по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%) идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов характеризуются по меньшей мере 95% (например, 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%) идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов характеризуются менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов содержит один или несколько эпитопов, идентифицирующих мишень. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой патоген. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, и каждый полипептидный иммуноген содержит один или несколько эпитопов (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше), соответствующих вирусному иммуногену. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет

собой бактерию, и каждый полипептидный иммуноген содержит один или несколько (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) эпитопов, соответствующих бактериальному иммуногену. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген содержит один или несколько (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять и десять или более) эпитопов, соответствующих опухолевому антигену. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой токсин или аллерген. В некоторых вариантах осуществления мишень ассоциирована с заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой вирусную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой бактериальную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой рак.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два (например, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь или по меньшей мере девять) полипептидных иммуногена идентифицируют отличающиеся белки, при этом каждый из отличающихся белков идентифицирует одну и ту же мишень.

В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов идентифицирует отличающийся белок. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой патоген. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, и каждый из отличающихся белков представляет собой вирусный белок, ассоциированный с вирусом. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой бактерию, и каждый из отличающихся белков представляет собой бактериальный белок, ассоциированный с бактерией. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления каждый из отличающихся белков представляет собой отличающийся опухолевый антиген, ассоциированный с раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления мишенью является аллерген или токсин.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий несколько последовательностей, при этом каждая

последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два (например, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь или по меньшей мере девять) полипептидных иммуногена идентифицируют отличающиеся мишени. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов идентифицирует отличающуюся мишень. В некоторых вариантах осуществления каждая мишень представляет собой отличающийся патоген. В некоторых вариантах осуществления каждая мишень независимо представляет собой раковую клетку, вирус, бактерию, гриб или паразита. В некоторых вариантах осуществления каждая мишень представляет собой отличающийся вирус. В некоторых вариантах осуществления каждая мишень представляет собой отличающуюся бактерию. В некоторых вариантах осуществления мишени предусматривают вирус и бактерию.

В некоторых вариантах осуществления любого из кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, кольцевой полирибонуклеотид содержит от 500 до 20000 рибонуклеотидов (например, от 500 до 10000, от 500 до 9000, от 500 до 8000, от 500 до 5000, от 500 до 4000, от 500 до 3000, от 1000 до 10000, от 1000 до 8000, от 1000 до 5000, от 3000 до 8000, от 4000 до 9000 или от 10000 до 20000)). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 500 до 5000. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 1000 до 5000 рибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 5000 до 10000 рибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере 500 рибонуклеотидов (например, по меньшей мере 600, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 1500, по меньшей мере 2000, по меньшей мере 2500, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 3500, по меньшей мере 4000, по меньшей мере 4500, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 5500, по меньшей мере 6000, по меньшей мере 6500, по меньшей мере 7000, по меньшей мере 7500, по меньшей мере 8000, по меньшей мере 8500, по меньшей мере 9000 или по меньшей мере 9500 рибонуклеотидов).

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь или по меньшей мере девять последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит две или три, от двух до пяти (например, две, три или четыре) или от пяти до

десяти последовательностей (например, пять, шесть, семь, восемь, или девять последовательностей), при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, дополнительно кодирует сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления каждая последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, дополнительно кодирует сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления каждая из последовательностей, кодирующих каждый из полипептидных иммуногенов, функционально связана с участком внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один IRES. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов кодируется одной открытой рамкой считывания, функционально связанной с одним IRES, где в результате экспрессии открытой рамки считывания вырабатывается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность каждого полипептидного иммуногена.

В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов отделен полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов отделен доменом расщепления. В некоторых вариантах осуществления каждый сдвигающий элемент представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит множество IRES. В некоторых вариантах осуществления каждый IRES функционально связан с открытой рамкой считывания, содержащей последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность (например, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять и по меньшей мере десять последовательностей), кодирующих адъювант. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (например, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять и по меньшей мере десять последовательностей) последовательность, кодирующая адъювант, функционально связана с IRES.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и последовательность, кодирующую адъювант, или последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, функционально связана с IRES. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая адъювант, функционально связана с IRES. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген и полипептид, представляющий собой адъювант, кодируются одной открытой рамкой считывания, функционально связанной с одним IRES, где в результате экспрессии открытой рамки считывания вырабатывается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность каждого из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант, отделен полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант, отделен доменом расщепления. В некоторых вариантах осуществления каждый сдвигающий элемент представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит множество IRES. В некоторых вариантах осуществления первый IRES функционально связан с последовательностью, кодирующей полипептидный иммуноген, и второй IRES функционально связан с последовательностью, кодирующей полипептид, представляющий собой адъювант.

В некоторых вариантах осуществления, где кольцевой полирибонуклеотид кодирует по меньшей мере один полипептидный иммуноген и по меньшей мере один адъювант (например, полипептидный адъювант), экспрессия последовательности, кодирующей полипептидный иммуноген, является по меньшей мере 2-кратно, 5-кратно, 10-кратно, 20-кратно, 50-кратно или 100-кратно более высокой, чем экспрессия последовательности, кодирующей адъювант. В некоторых вариантах осуществления экспрессия последовательности, кодирующей полипептидный иммуноген, является по сути такой же, как экспрессия последовательности, кодирующей адъювант.

В другом аспекте настоящего изобретения представлена композиция, содержащая множество кольцевых полирибонуклеотидов, где композиция содержит по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид,

содержащий последовательность, кодирующую адъювант, или последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидного иммуногена и адъюванта функционально связан с IRES.

В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из GM-CSF, IL-1-альфа, IL-1-бета, TGF-бета, TNF-альфа и TNF-бета. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-1. В некоторых вариантах осуществления цитокин, индуцирующий Th-1, выбран из IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-2. В некоторых вариантах осуществления цитокин, индуцирующий Th-2, выбран из IFN-гамма, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13. В некоторых вариантах осуществления хемокин выбран из MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes и TCA-3. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула выбрана из CD80, CD86, CD40-L, CD70 и CD27. В некоторых вариантах осуществления стимулятор врожденного иммунитета выбирают из STING (например, конститутивно активного STING, такого как $STING^{V155M}$, $STING^{R284M}$, $STING^{R284M/V147L/N154S/V155M}$, или $STING^{V147L/N154S/V155M}$), TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1. В некоторых вариантах осуществления стимулятор врожденного иммунитета представляет собой конститутивно активный мутант. В некоторых вариантах осуществления сигнальная молекула выбрана из STING (например, конститутивно активного STING, такого как $STING^{V155M}$, $STING^{R284M}$, $STING^{R284M/V147L/N154S/V155M}$ или $STING^{V147L/N154S/V155M}$), TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, IKK-альфа, комплекса IKK, TBK1, B-катенина и каспазы 1. В некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции выбран из AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 и IRF5. В некоторых вариантах осуществления рецептор цитокина выбран из IL-2-бета-R, IFN-гамма-R и IL-6R. В некоторых вариантах осуществления бактериальный компонент выбран из флагеллина и MBL.

В некоторых вариантах осуществления любого из кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в настоящем документе, по меньшей мере одна

последовательность, кодирующая адъювант, дополнительно кодирует сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления каждая последовательность, кодирующая иммуноген, дополнительно кодирует сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность, кодирующая иммуноген, не кодирует сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления ни одна из последовательностей, кодирующих иммуноген, дополнительно не кодирует сигнальную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления последовательность, которая является стимулятором врожденной иммунной системы, представляет собой GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер.

В некоторых вариантах осуществления любого из кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, где кольцевой полирибонуклеотид содержит первый полирибонуклеотид с 5'-концом и 3'-концом, где каждый из 5'-конца и 3'-конца гибридизируется со вторым полинуклеотидом, таким образом соединяя 5'-конец и 3'-конец первого полирибонуклеотида с образованием кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид получают посредством лигирования с помощью шунта. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид получают путем обеспечения линейного полирибонуклеотида, содержащего 3'-конец и 5'-конец, где каждый из 3'-конца и 5'-конца содержит часть интрона, и где интронная часть 3'-конца и интронная часть 5'-конца катализируют реакцию сплайсинга, обеспечивая таким образом ковалентное конъюгирование 5'-конца и 3'-конца с образованием кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой саморасщепляющийся интрон группы I.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлена композиция, содержащая множество кольцевых полирибонуклеотидов, каждый из которых содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген. В некоторых вариантах осуществления каждый из множества кольцевых полирибонуклеотидов представляет собой кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую первый

полипептидный иммуноген, и по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй полипептидный иммуноген, где первый и второй полипептидные иммуногены характеризуются по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%) идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептидные иммуногены характеризуются по меньшей мере 95% (по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%) идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептидные иммуногены характеризуются менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов содержит один или несколько эпитопов, идентифицирующих мишень. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую первый полипептидный иммуноген, и по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй полипептидный иммуноген, где первый и второй полипептидные иммуногены идентифицируют отличающиеся белки, при этом каждый отличающийся белок идентифицирует одну и ту же мишень. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую первый полипептидный иммуноген, и по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй полипептидный иммуноген, где первый полипептидный иммуноген идентифицирует первую мишень, и второй полипептидный иммуноген идентифицирует вторую мишень. В некоторых вариантах осуществления каждая мишень независимо представляет собой раковую клетку, вирус, бактерию, гриб, паразита, токсин или аллерген. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой патоген. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой раковую клетку, аллерген или токсин. В некоторых вариантах осуществления каждый полипептидный иммуноген функционально связан с IRES.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен фармацевтический препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида, где кольцевой полирибонуклеотид

содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и при этом кольцевой полирибонуклеотид составляет по меньшей мере 25% (вес./вес.) (например, по меньшей мере 30%(вес./вес.), 40%(вес./вес.), 50% (вес./вес.), 60% (вес./вес.), 70% (вес./вес.), 75% (вес./вес.), 80% (вес./вес.), 85% (вес./вес.), 90% (вес./вес.), 91% (вес./вес.), 92% (вес./вес.), 93% (вес./вес.), 94% (вес./вес.), 95% (вес./вес.), 96% (вес./вес.), 97% (вес./вес.), 98% (вес./вес.) или 99% (вес./вес.)) от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления циклический полирибонуклеотид составляет по меньшей мере 70% (вес./вес.), 75% (вес./вес.), 80% (вес./вес.), 85% (вес./вес.), 90% (вес./вес.), 91% (вес./вес.), 92% (вес./вес.), 93% (вес./вес.), 94% (вес./вес.), 95% (вес./вес.), 96% (вес./вес.), 97% (вес./вес.), 98% (вес./вес.) или 99% (вес./вес.) от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит не более 75% (вес./вес.), 60% (вес./вес.), 50% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 30% (вес./вес.) , 20% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 5% (вес./вес.) или 1% (вес./вес.) молекул линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит не более 0,5% (вес./вес.) (например, 0,4% (вес./вес.), 0,3% (вес./вес.), 0,2% (вес./вес.), 0,1% (вес./вес.) и 0,05% (вес./вес.)) молекул линейного полирибонуклеотида от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит по меньшей мере 1% (вес./вес.) линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит от 30% до 40% (вес./вес.) циклического полирибонуклеотида и от 1% до 10% (вес./вес.), 10%-20% (вес./вес.), 20%-30% (вес./вес.), 30%-40% (вес./вес.), 40%-50% (вес./вес.), 50%-60% (вес./вес.) или 60%-70% (вес./вес.) линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит от 40% до 60% (вес./вес.) циклического полирибонуклеотида и от 1% до 10% (вес./вес.), 10%-20% (вес./вес.), 20%-30% (вес./вес.), 30%-40% (вес./вес.), 40%-50% (вес./вес.), 50%-60% (вес./вес.) линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит от 60% до 80% (вес./вес.) циклического полирибонуклеотида и от 1% до 10% (вес./вес.), 10%-20% (вес./вес.), 20%-30% (вес./вес.), 30%-40% (вес./вес.) линейного полирибонуклеотида.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен фармацевтический препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида, где кольцевой полирибонуклеотид

содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и при этом фармацевтический препарат содержит не более 75% (вес./вес.), 60% (вес./вес.), 50% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 5% (вес./вес.) или 1% (вес./вес.) молекул линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит не более 20% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) или 0,5% (вес./вес.) молекул линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления препарат содержит не более 15% (вес./вес.) (например, 15% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) и 0,5% (вес./вес.)) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит не более 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) или 0,5% (вес./вес.) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен фармацевтический препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида, где кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и при этом фармацевтический препарат содержит не более 15% (вес./вес.) (например, 15% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) или 0,5% (вес./вес.)) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления препарат содержит не более 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) или 0,5% (вес./вес.) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

В некоторых вариантах осуществления одного из фармацевтических препаратов, описанных в данном документе, фармацевтический препарат содержит менее 10 ЕЭ/кг (например, 9 ЕЭ/кг, 8 ЕЭ/кг, 7 ЕЭ/кг, 6 ЕЭ/кг, 5 ЕЭ/кг, 4 ЕЭ/кг, 3 ЕЭ/кг, 2 ЕЭ/кг и 1 ЕЭ/кг) или лишен эндотоксина согласно измерению в тесте с лизатом амебоцитов *Limulus*. В

некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат характеризуется биологической нагрузкой, составляющей менее 100 КОЕ/100 мл или менее 10 КОЕ/100 мл, перед стерилизацией. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат представляет собой стерильный фармацевтический препарат, например, поддерживает рост менее 100 жизнеспособных микроорганизмов при тестировании в асептических условиях. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат соответствует стандарту USP <71>. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат соответствует стандарту USP <85>. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат представляет собой промежуточный фармацевтический препарат конечного лекарственного продукта.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат представляет собой конечный лекарственный продукт для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат характеризуется концентрацией, составляющей по меньшей мере 0,1 нг/мл, 0,5 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг /мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл или 500 мг/мл, молекул кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит не более 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 мкг/мл, 5000 мкг/мл, 10000 мкг/мл или 100000 мкг/мл молекул дезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит белковое загрязнение (например, фермент) в количестве, составляющем менее 0,1 нг, 1 нг, 5 нг, 10 нг, 15 нг, 20 нг, 25 нг, 30 нг, 35 нг, 40 нг, 50 нг, 60 нг, 70 нг, 80 нг, 90 нг, 100 нг, 200 нг, 300 нг, 400 нг или 500 нг белкового загрязнения на миллиграмм (мг) молекул кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат характеризуется соотношением поглощения A260/A280, составляющим от приблизительно 1,6 до 2,3 (например, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1 и 2,2), измеренным с помощью спектрофотометра.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат является по сути свободным от технологической примеси, выбранной из клеточного белка, клеточной дезоксирибонуклеиновой кислоты, фермента, компонента реагента, компонента геля или хроматографического материала. В некоторых вариантах осуществления

фармацевтический препарат характеризуется пониженным уровнем одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа после очистки по сравнению с уровнем до очистки. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид представляет собой кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид получают в соответствии со способом, включающим стадии получения множества молекул линейных полирибонуклеотидов; циркуляризации линейных молекул полирибонуклеотидов с получением препарата на основе молекул кольцевых полирибонуклеотидов и обработки препарата с удалением молекул линейных полирибонуклеотидов из препарата. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает оценку количества молекул линейных полирибонуклеотидов в препарате, оставшихся после стадии обработки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает дополнительную обработку препарата, где дополнительная обработка включает обработку препарата с удалением молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом из препарата, и/или обработку препарата с удалением молекул дезоксирибонуклеотидов из препарата, и/или обработку препарата с удалением белковых загрязнений из препарата, и/или обработку препарата с удалением эндотоксина из препарата.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая любое из кольцевых полирибонуклеотидов, композиций или фармацевтических препаратов, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит любое из кольцевых полирибонуклеотидов, композиций или фармацевтических препаратов, описанных в данном документе, и протамин или соль протамина (например, сульфат протамина). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганический адъювант, низкомолекулярный адъювант и эмульсию типа масло-в-воде, липид или полимер, пептид или пептидогликан, углевод или полисахарид, сапонин, адъювант на основе РНК, адъювант на основе ДНК, вирусную частицу, бактериальный адъювант, гибридную молекулу, ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, неорганическую наночастицу или многокомпонентный адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганический адъювант. В некоторых вариантах осуществления неорганический

адъювант представляет собой соль алюминия или соль кальция. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой имиквимод, резиквимод или гардиквимод. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой эмульсию типа масло-в-воде. В некоторых вариантах осуществления эмульсия типа масло-в-воде представляет собой сквален, MF59, AS03, состав Montanide, необязательно Montanide ISA 51 или Montanide ISA 720, или неполный адъювант Фрейнда в виде эмульсии типа масло-в-воде. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество представляет собой липид или полимер. В некоторых вариантах осуществления липид или полимер представляют собой полимерную наночастицу, необязательно PLGA, PLG, PLA, PGA или PHB, липосому, необязательно виросомы или CAF01, липидную наночастицу или ее компонент, липополисахарид (LPS), необязательно монофосфорил-липид A (MPLA) или глюкопиранозил-липид A (GLA), липопептид, необязательно Pam2 (Pam2CSK4) или Pam3 (Pam3CSK4) или гликолипид, необязательно димиколат трегалозы. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой пептид или пептидогликан. В некоторых вариантах осуществления пептид или пептидогликан соответствуют целым синтетическим или очищенным грамотрицательным или грамположительным бактериям или их частям, необязательно N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамину (MDP), слитому белку, содержащему флагеллин, маннозосвязывающему лектину (MBL), цитокинам или хемокинам. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой углевод или полисахарид. В некоторых вариантах осуществления углевод или полисахарид представляют собой декстран (разветвленный микробный полисахарид), декстрансульфат, лентинан, зимозан, бета-глюкан, дельтин, маннан или хитин. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой сапонин. В некоторых вариантах осуществления сапонин представляет собой гликозид или полициклические агликоны, присоединенные к одной или нескольким боковым цепям сахара, необязательно ISCOMS, матриксу ISCOMS или QS-21. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой адъювант на основе РНК. В некоторых вариантах осуществления адъювант на основе РНК представляет собой поли(IC), поли(IC:LC), шпилечные РНК, необязательно с последовательностью, содержащей 5'PPP, вирусную последовательность, последовательности, содержащие поли(U), dsRNA, природную или синтетическую иммуностимулирующую последовательность РНК, аналоги нуклеиновой кислоты, необязательно циклический GMP-AMP или циклический динуклеотид, такой как

циклический ди-GMP, или аналог иммуностимулирующей основы, необязательно C8-замещенный или N7,C8-дизамещенный гуаниновый рибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой адъювант на основе ДНК. В некоторых вариантах осуществления адъювант на основе ДНК представляет собой CpG, dsDNA или природную или синтетическую иммуностимулирующую последовательность ДНК. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой вирусную частицу. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица представляет собой виросому, необязательно бислой фосфолипидной клеточной мембраны. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой бактериальный адъювант. В некоторых вариантах осуществления бактериальный адъювант представляет собой флагеллин, LPS или бактериальный токсин, необязательно энтеротоксин, термолабильный токсин или холерный токсин. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой гибридную молекулу. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой CpG, конъюгированный с имиквимодом. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита. В некоторых вариантах осуществления MAMP гриба или ооцита представляет собой хитин или бета-глюкан. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганическую наночастицу. В некоторых вариантах осуществления неорганическая наночастица представляет собой золотой наностержень, наночастицу на основе диоксида кремния, необязательно наночастицу на основе мезопористого диоксида кремния (MSN). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой многокомпонентный адъювант. В некоторых вариантах осуществления многокомпонентный адъювант представляет собой AS01, AS03, AS04, полный адъювант Фрейнда или CAF01.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая смесь, содержащую любой из циклических полирибонуклеотидов, композиций или фармацевтических препаратов, описанных в данном документе, и спирт, где содержание спирта составляет от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 75% об./об. (например, 0,5% об./об., 1% об./об., 5% об./об., 10% об./об., 15% об./об., 20% об./об., 25% об./об., 30% об. /об., 35% об./об., 40% об./об., 45% об./об., 50% об./об., 55% об./об., 60% об./об., 65% об./об. и 70% об./об.) в смеси.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая смесь, содержащую линейный полирибонуклеотид, который содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую полипептидный

иммуноген, и спирт, где содержание спирта составляет от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 75% об./об. (например, 0,5% об./об., 1% об./об., 5% об./об., 10% об./об., 15% об./об., 20% об./об., 25% об./об., 30% об./об., 35% об./об., 40% об./об., 45% об./об., 50% об./об., 55% об./об., 60% об./об., 65% об./об. и 70% об./об.) в смеси.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит множество последовательностей, при этом каждая из которых кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два (например, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь и по меньшей мере девять) полипептидных иммуногена характеризуются по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%) идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются по меньшей мере 95% (например, 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%) идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов содержит один или несколько эпитопов, идентифицирующих мишень. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой патоген. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, и каждый полипептидный иммуноген содержит один или несколько эпитопов (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше), соответствующих вирусному иммуногену. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой бактерию, и каждый полипептидный иммуноген содержит один или несколько (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) эпитопов, соответствующих бактериальному иммуногену. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген содержит один или несколько (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) эпитопов, соответствующих опухолевому антигену. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой токсин или аллерген. В некоторых вариантах осуществления мишень

ассоциирована с заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой вирусную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой бактериальную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой рак.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два (например, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь и по меньшей мере девять) полипептидных иммуногена идентифицируют отличающиеся белки, при этом каждый из отличающихся белков идентифицирует одну и ту же мишень. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов идентифицирует отличающийся белок. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой патоген. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирус, и каждый из отличающихся белков представляет собой вирусный белок, ассоциированный с вирусом. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой бактерию, и каждый из отличающихся белков представляет собой бактериальный белок, ассоциированный с бактерией. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления каждый из отличающихся белков представляет собой отличающийся опухолевый антиген, ассоциированный с раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления мишенью является аллерген или токсин.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два (например, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь и по меньшей мере девять) полипептидных иммуногена идентифицируют отличающиеся мишени. В некоторых вариантах осуществления каждый из полипептидных иммуногенов идентифицирует отличающуюся мишень. В некоторых вариантах осуществления каждая мишень представляет собой отличающийся патоген. В некоторых вариантах осуществления каждая мишень независимо представляет собой раковую клетку, вирус, бактерию, гриб или паразита. В некоторых вариантах осуществления каждая мишень представляет собой отличающийся вирус. В некоторых

вариантах осуществления каждая мишень представляет собой отличающуюся бактерию. В некоторых вариантах осуществления мишени предусматривают вирус и бактерию.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь или по меньшей мере девять последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит от двух до трех, от двух до пяти (например, от трех до четырех) или от пяти до десяти последовательностей (например, шесть, семь, восемь и девять последовательностей), при этом каждая последовательность кодирует иммуногенный полипептид.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность (например, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять последовательностей), кодирующих адъювант. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (например, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять последовательностей) последовательность, кодирующая адъювант, функционально связана с IRES.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и последовательность, кодирующую адъювант, или последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, функционально связана с IRES. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая адъювант, функционально связана с IRES. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой провоспалительный цитокин. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин выбран из

GM-CSF, IL-1-альфа, IL-1-бета, TGF-бета, TNF-альфа и TNF-бета. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-1. В некоторых вариантах осуществления цитокин, индуцирующий Th-1, выбран из IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-2. В некоторых вариантах осуществления цитокин, индуцирующий Th-2, выбран из IFN-гамма, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13. В некоторых вариантах осуществления хемокин выбран из MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes и TCA-3. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула выбрана из CD80, CD86, CD40-L, CD70 и CD27. В некоторых вариантах осуществления стимулятор врожденного иммунитета выбирают из STING (например, конститутивно активного (caSTING), такого как $STING^{V155M}$, $STING^{R284M}$, $STING^{R284M/V147L/N154S/V155M}$ или $STING^{V147L/N154S/V155M}$), TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1. В некоторых вариантах осуществления стимулятор врожденного иммунитета представляет собой конститутивно активный мутант. В некоторых вариантах осуществления сигнальная молекула выбрана из STING (например, caSTING, такого как $STING^{V155M}$, $STING^{R284M}$, $STING^{R284M/V147L/N154S/V155M}$ или $STING^{V147L/N154S/V155M}$), TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, IKK-альфа, комплекса IKK, TBK1, B-катенина и каспазы 1. В некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции выбран из AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 и IRF5. В некоторых вариантах осуществления рецептор цитокина выбран из IL-2-бета-R, IFN-гамма-R и IL-6R. В некоторых вариантах осуществления бактериальный компонент выбран из флагеллина и MBL.

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид содержит последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления последовательность, которая является стимулятором врожденной иммунной системы, представляет собой GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер.

В некоторых вариантах осуществления содержание спирта составляет от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 60% об./об. (например, 0,5% об./об., 1% об./об., 5% об./об., 10% об./об., 15% об. /об., 20% об./об., 25% об./об., 30% об./об., 35% об./об., 40% об./об., 45% об./об., 50% об./об. и 55% об./об.), от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 50% об./об. (например, 0,5% об./об., 1% об./об., 5% об./об., 10% об./об., 15% об./об., 20% об./об., 25% об./об., 30% об./об., 35% об./об., 40% об./об. и 45% об./об.), от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 40% об./об. (например, 0,5% об./об., 1% об./об., 5% об./об., 10% об./об., 15% об./об., 20% об./об., 25% об./об., 30%

об./об. и 35% об./об.), от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 20% об./об., от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 15% об./об. (например, 0,5% об./об., 1% об./об., 5% об./об., 10% об./об. и 15% об./об.), от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 10% об./об. (например, 0,5% об./об., 1% об./об., 5% об./об. и 10% об./об.), от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 5% об./об. (например, 0,5% об./об., 1% об./об., 2% об./об., 3% об./об. и 4% об./об.), от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 1% об./об. (например, 0,4% об./об., 0,5% об./об., 0,6% об./об., 0,7% об./об., 0,8% об./об. и 0,9% об./об.) или от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 0,5% об./об. в смеси. В некоторых вариантах осуществления содержание спирта составляет от приблизительно 0,5% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 1% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 5% об./об. до приблизительно 75% об./об., приблизительно от 10% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 15% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 20% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 30% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 40% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 50% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 60% об./об. до приблизительно 75% об./об. или от приблизительно 70 % об./об. до приблизительно 75% об./об. в смеси.

В некоторых вариантах осуществления спирт выбран из метанола, этанола, изопропанола, феноксиэтанола, триэтаноламина, фенилэтилового спирта, бутанола, пентанола, цетилового спирта, этиленгликоля, пропиленгликоля, денатурированного спирта, бензилового спирта, специально денатурированного спирта, гликоля, стеарилового спирта, цетеарилового спирта, ментола, полиэтиленгликолей (PEG)-400, этоксилированных жирных кислот или гидроксиэтилцеллюлозы. В некоторых вариантах осуществления спирт представляет собой этанол.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для местного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкость, гель, лосьон, пасту, крем, пену или помаду. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется значением pH, составляющим приблизительно 6-8 (например, приблизительно 6,5-7,5 или приблизительно 7). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется значением вязкости, которое составляет приблизительно столько же, как таковое у воды.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является по сути свободной от гидрофобных или липофильных групп. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является по сути свободной от углеводородов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является по сути свободной от катионных липосом. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является по сути свободной от жирных кислот, липидов, липосом, холестерина или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганический адъювант, низкомолекулярный адъювант и эмульсию типа масло-в-воде, липид или полимер, пептид или пептидогликан, углевод или полисахарид, сапонин, адъювант на основе РНК, адъювант на основе ДНК, вирусную частицу, бактериальный адъювант, гибридную молекулу, ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, неорганическую наночастицу или многокомпонентный адъювант. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит средство, способствующее проникновению в клетку.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ доставки полирибонуклеотида субъекту, включающий местное нанесение кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, иммуногенной композиции, описанной в данном документе, фармацевтического препарата, описанного в данном документе, на участок поверхности тела субъекта.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ доставки полирибонуклеотида субъекту, включающий (a) нанесение стерилизующего средства на участок поверхности тела субъекта и (b) нанесение композиции, содержащей циклический полирибонуклеотид, описанный в данном документе, иммуногенной композицию, описанной в данном документе, фармацевтического препарата, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, и разбавителя на участок поверхности тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиция (b) не содержит носитель. В некоторых вариантах осуществления стерилизующее средство представляет собой спирт, ультрафиолетовое излучение, лазерное излучение или нагревание.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ доставки полирибонуклеотида субъекту, включающий (a) нанесение спирта на участок поверхности тела субъекта и (b) нанесение композиции, содержащей циклический полирибонуклеотид,

описанный в данном документе, иммуногенной композицию, описанной в данном документе, фармацевтического препарата, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, и разбавителя на участок поверхности тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления спирт выбран из группы, состоящей из метанола, этанола, изопропанола, феноксиэтанола, триэтаноламина, фенилэтилового спирта, бутанола, пентанола, цетилового спирта, этиленгликоля, пропиленгликоля, денатурированного спирта, бензилового спирта, специально денатурированного спирта, гликоля, стеарилового спирта, цетеарилового спирта, ментола, полиэтиленгликолей (PEG)-400, этоксилированных жирных кислот или гидроксиэтилцеллюлозы. В некоторых вариантах осуществления спирт представляет собой этанол.

В некоторых вариантах осуществления (например, в некоторых вариантах осуществления местной доставки, описанных в данном документе) участок поверхности тела субъекта выбрана из площади поверхности кожи, полости рта, полости носа, желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей или любой их комбинации.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, включающий введение субъекту любого из циклических полирибонуклеотидов, композиций, фармацевтических препаратов или фармацевтических композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию или грибковую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой рак. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние ассоциированы с воздействием аллергена. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние ассоциированы с воздействием токсина.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту любого из кольцевых полирибонуклеотидов, композиций, фармацевтических препаратов или фармацевтических композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления способ относится к млекопитающему, отличному от человека. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее, отличное от человека, представляет

собой корову, овцу, козу, свинью, собаку, лошадь или кошку. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой птицу. В некоторых вариантах осуществления птица представляет собой курицу, петуха, индейку или попугая. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту адъюванта. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой молекулярную единицу, отдельную от кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида или препарата или композиции. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганический адъювант, низкомолекулярный адъювант и эмульсию типа масло-в-воде, липид или полимер, пептид или пептидогликан, углевод или полисахарид, сапонин, адъювант на основе РНК, адъювант на основе ДНК, вирусную частицу, бактериальный адъювант, гибридную молекулу, ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, неорганическую наночастицу или многокомпонентный адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой полипептидный адъювант. В некоторых вариантах осуществления полипептидный адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления стимулятор врожденной иммунной системы выбран из РНК, содержащей GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

В некоторых вариантах осуществления любое из кольцевых полирибонуклеотидов, композиций, фармацевтических препаратов или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в виде однократной дозы. В некоторых вариантах осуществления любое из кольцевых полирибонуклеотидов, композиций, фармацевтических препаратов или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту два или больше раз, три или больше раз, четыре или больше раз или пять или больше раз. В некоторых вариантах осуществления введение любого из кольцевых полирибонуклеотидов, композиций, фармацевтических препаратов или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, осуществляют приблизительно раз в неделю, приблизительно раз в две недели, приблизительно раз в три недели, приблизительно раз в месяц, приблизительно раз в два месяца, приблизительно раз в три месяца, приблизительно раз в четыре месяца, приблизительно раз в пять месяцев,

приблизительно раз в шесть месяцев, приблизительно раз в год, приблизительно раз в два года, приблизительно раз в три года, приблизительно раз в четыре года, приблизительно раз в пять лет или приблизительно раз в десять лет.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту полипептидного иммуногена (например, белковой субъединицы, содержащей полипептидный иммуноген). В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген соответствует (например, характеризуется 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности) полипептидному иммуногену, кодируемому последовательностью кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген вводят субъекту после введения любого из кольцевых полирибонуклеотидов, иммуногенных композиций, фармацевтических препаратов или фармацевтических композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген обеспечивает поддержание или усиление иммунного ответа у субъекта в отношении полипептидного иммуногена.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ поддержания или усиления иммунного ответа у субъекта, включающий: (i) введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида, кодирующего полипептидный иммуноген, и (ii) введение субъекту полипептидного иммуногена, где стадию (ii) осуществляют по прошествии периода продолжительностью от 1 недели до 6 месяцев (например, от 1 месяца до 5 месяцев, от 2 месяцев до 3 месяцев, от 2 недель до 3 месяцев или от 3 месяцев до 6 месяцев) после стадии (i), и где введение полипептидного иммуногена на стадии (ii) обеспечивает поддержание или усиление иммунного ответа субъекта в отношении полипептидного иммуногена. В некоторых вариантах осуществления полипептидный иммуноген содержит один или несколько эпитопов, идентифицирующих мишень. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой патоген. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой раковую клетку, аллерген или токсин.

Пронумерованные варианты осуществления

[1] Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности.

[2] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [1], где по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности.

[3] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [1] или [2], где по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности.

[4] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [1], где каждый из полипептидных иммуногенов характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности.

[5] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [4], где каждый из полипептидных иммуногенов характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности.

[6] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [4] или [5], где каждый из полипептидных иммуногенов характеризуется менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности.

[7] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [6], где каждый из полипептидных иммуногенов содержит один или несколько эпитопов, которые идентифицируют мишень.

[8] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [7], где мишень представляет собой патоген.

[9] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [8], где патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита.

[10] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [9], где патоген представляет собой вирус, и каждый полипептидный иммуноген содержит один или несколько эпитопов, соответствующих вирусному иммуногену.

[11] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [9], где патоген представляет собой бактерию, и каждый полипептидный иммуноген содержит один или несколько эпитопов, соответствующих бактериальному иммуногену.

[12] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [7], где мишень представляет собой раковую клетку.

[13] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [12], где каждый полипептидный иммуноген содержит один или несколько эпитопов, соответствующих опухолевому антигену.

[14] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [7], где мишень представляет собой токсин или аллерген.

[15] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [7] – [14], где мишень ассоциирована с заболеванием, нарушением или состоянием.

[16] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [15], где заболевание, нарушение или состояние представляет собой вирусную инфекцию.

[17] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [15], где заболевание, нарушение или состояние представляет собой бактериальную инфекцию.

[18] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [15], где заболевание, нарушение или состояние представляет собой рак.

[19] Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два полипептидных иммуногена идентифицируют отличающиеся белки, где каждый из отличающихся белков идентифицирует одну и ту же мишень.

[20] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [19], где каждый из полипептидных иммуногенов идентифицирует отличающийся белок.

[21] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [19] или [20], где мишень представляет собой патоген.

[22] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [21], где патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита.

[23] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [22], где патоген представляет собой вирус и каждый из отличающихся белков представляет собой вирусный белок, ассоциированный с вирусом.

[24] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [22], где патоген представляет собой бактерию, и каждый из отличающихся белков представляет собой бактериальный белок, ассоциированный с бактериями.

[25] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [19] или [20], где мишень представляет собой раковую клетку.

[26] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [25], где каждый из отличающихся белков представляет собой отличающийся опухолевый антиген, ассоциированный с раковой клеткой.

[27] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [19] или [20], где мишень представляет собой аллерген или токсин.

[28] Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два полипептидных иммуногена идентифицируют отличающиеся мишени.

[29] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [28], где каждый из полипептидных иммуногенов идентифицирует отличающуюся мишень.

[30] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [28] или [29], где каждая мишень представляет собой отличающийся патоген.

[31] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [30], где каждая мишень независимо представляет собой раковую клетку, вирус, бактерию, гриб или паразита.

[32] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [31], где каждая мишень представляет собой отличающийся вирус.

[33] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [31], где каждая мишень представляет собой отличающуюся бактерию.

[34] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [31], где мишени предусматривают вирус и бактерию.

[35] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [34], где кольцевой полирибонуклеотид содержит от 500 до 20000 рибонуклеотидов.

[36] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [35], где кольцевой полирибонуклеотид содержит от 500 до 10000 рибонуклеотидов.

[37] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [36], где кольцевой полирибонуклеотид содержит от 500 до 5000 рибонуклеотидов.

[38] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов от [1] до [34], где кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере 500 рибонуклеотидов.

[39] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [38], где кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере 1000 рибонуклеотидов.

[40] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [39], где кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере 5000 рибонуклеотидов.

[41] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [40], где кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь или по меньшей мере девять последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген.

[42] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [40], где кольцевой полирибонуклеотид содержит от двух до трех, от двух до пяти или от пяти до

десяти последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген.

[43] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [40], где по меньшей мере одна последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, дополнительно кодирует сигнальную последовательность.

[44] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [40], где каждая последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, дополнительно кодирует сигнальную последовательность.

[45] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [44], где каждая из последовательностей, кодирующих каждый из полипептидных иммуногенов, функционально связана с участком внутренней посадки рибосомы (IRES).

[46] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [45], где кольцевой полирибонуклеотид содержит один IRES.

[47] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [46], где каждый из полипептидных иммуногенов кодируется одной открытой рамкой считывания, функционально связанной с одним IRES, где в результате экспрессии открытой рамки считывания вырабатывается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность каждого полипептидного иммуногена.

[48] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [47], где каждый из полипептидных иммуногенов отделен полипептидным линкером.

[49] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [47], где каждый из полипептидных иммуногенов отделен доменом расщепления.

[50] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [49], где каждый сдвигающий элемент представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A.

[51] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [45], где кольцевой полирибонуклеотид содержит множество IRES.

[52] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [51], где каждый IRES функционально связан с открытой рамкой считывания, содержащей последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген.

[53] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [52], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую адъювант.

[54] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [53], где по меньшей мере одна последовательность, кодирующая адъювант, функционально связана с IRES.

[55] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [53] или [54], где адъювант представляет собой полипептид.

[56] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [55], где адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

[57] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [56], где цитокин представляет собой провоспалительный цитокин.

[58] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [57], где провоспалительный цитокин выбран из GM-CSF, IL-1-альфа, IL-1-бета, TGF-бета, TNF-альфа и TNF-бета.

[59] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [57], где цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-1.

[60] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [59], где цитокин, индуцирующий Th-1, выбран из IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18.

[61] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [56], где цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-2.

[62] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [61], где цитокин, индуцирующий Th-2, выбран из IFN-гамма, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13.

[63] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [56], где хемокин выбран из MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes и TCA-3.

[64] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [56], где костимулирующая молекула выбрана из CD80, CD86, CD40-L, CD70 и CD27.

[65] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [56], где стимулятор врожденного иммунитета выбран из STING (например, caSTING), TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1.

[66] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [65], где стимулятор врожденного иммунитета представляет собой конститутивно активный мутант.

[67] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [567], где сигнальная молекула выбрана из STING (например, caSTING), TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, IKK-альфа, комплекса IKK, TBK1, B-катенина и каспазы 1.

[68] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [56], где активатор транскрипции выбран из AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 и IRF5.

[69] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [56], где рецептор цитокина выбран из IL-2-бета-R, IFN-гамма-R и IL-6R.

[70] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [56], где бактериальный компонент выбран из флагеллина и MBL.

[71] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [53] – [70], где по меньшей мере последовательность, кодирующая адъювант, дополнительно кодирует сигнальную последовательность.

[72] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [70], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[73] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [72], где последовательность, которая является стимулятором врожденной иммунной системы, представляет собой GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер.

[74] Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий (a) последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и (b) последовательность, кодирующую адъювант, или последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[75] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [74], где последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, функционально связана с IRES.

[76] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [74] или [75], где последовательность, кодирующая адъювант, функционально связана с IRES.

[77] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [74] – [76], где адъювант представляет собой полипептид.

[78] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [77], где полипептидный иммуноген и полипептид, представляющий собой адъювант, кодируются одной открытой рамкой считывания, функционально связанной с одним IRES, при этом в результате экспрессии открытой рамки считывания вырабатывается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность каждого из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант.

[79] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [78], где каждый из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант, отделен полипептидным линкером.

[80] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [78], где каждый из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант, отделен доменом расщепления.

[81] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [80], где каждый сдвигающий элемент представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A.

[82] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [77], где кольцевой полирибонуклеотид содержит множество IRES.

[83] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [82], где первый IRES функционально связан с последовательностью, кодирующей полипептидный иммуноген, и второй IRES функционально связан с последовательностью, кодирующей полипептид, представляющий собой адъювант.

[84] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [74] – [83], где экспрессия последовательности, кодирующей полипептидный иммуноген, является 2-кратно более высокой, чем экспрессия последовательности, кодирующей адъювант.

[85] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [74] – [84], где экспрессия последовательности, кодирующей полипептидный иммуноген, является 5-кратно, 10-кратно или 100-кратно более высокой, чем экспрессия последовательности, кодирующей адъювант.

[86] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [74] – [85], где адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

[87] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где цитокин представляет собой провоспалительный цитокин.

[88] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [87], где провоспалительный цитокин выбран из GM-CSF, IL-1-альфа, IL-1-бета, TGF-бета, TNF-альфа и TNF-бета.

[89] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-1.

[90] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [89], где цитокин, индуцирующий Th-1, выбран из IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18.

[91] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-2.

[92] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [91], где цитокин, индуцирующий Th-2, выбран из IFN-гамма, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13.

[93] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где хемокин выбран из MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes и TCA-3.

[94] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [93], где костимулирующая молекула выбрана из CD80, CD86, CD40-L, CD70 и CD27.

[95] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где стимулятор врожденного иммунитета выбран из STING (например, caSTING), TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1.

[96] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [95], где стимулятор врожденного иммунитета представляет собой конститутивно активный мутант.

[97] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где сигнальная молекула выбрана из STING (например, caSTING), TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, IKK-альфа, комплекса IKK, TBK1, B-катенина и каспазы 1.

[98] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где активатор транскрипции выбран из AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 и IRF5.

[99] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где рецептор цитокина выбран из IL-2-бета-R, IFN-гамма-R и IL-6R.

[100] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [86], где бактериальный компонент выбран из флагеллина и MBL.

[101] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [74] – [100], где последовательность, кодирующая адъювант, дополнительно кодирует сигнальную последовательность.

[102] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [74] – [101], где последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, дополнительно кодирует сигнальную последовательность.

[103] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [74] – [101], где последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, не кодирует сигнальную последовательность.

[104] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [74] или [75], где последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы, выбрана из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

[105] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов от [1] до [104], где кольцевой полирибонуклеотид содержит первый полирибонуклеотид с 5'-концом и 3'-концом, где каждый из 5'-конца и 3'-конца гибридизируется со вторым полинуклеотидом, таким образом соединяя 5'-конец и 3'-конец первого полирибонуклеотида с образованием кольцевого полирибонуклеотида.

[106] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [105], где кольцевой полирибонуклеотид получен посредством лигирования с помощью шунта.

[107] Кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов от [1] до [104], где кольцевой полирибонуклеотид получают путем обеспечения линейного полирибонуклеотида, содержащего 3'-конец и 5'-конец, где каждый из 3'-конца и 5'-конца содержит часть интрона, и где интронная часть 3'-конца и интронная часть 5'-конца катализируют реакцию сплайсинга, обеспечивая таким образом ковалентное конъюгирование 5'-конца и 3'-конца с образованием кольцевого полирибонуклеотида.

[108] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфу [107], где интрон представляет собой саморасщепляющийся интрон группы I.

[109] Иммуногенная композиция, содержащая множество кольцевых полирибонуклеотидов, каждый из которых содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген.

[110] Иммуногенная композиция по параграфу [109], где каждый из множества кольцевых полирибонуклеотидов представляет собой кольцевой полирибонуклеотид, описанный в любом из параграфов [1] – [108].

[111] Иммуногенная композиция по параграфу [109], где композиция содержит (a) по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую первый полипептидный иммуноген, и (b) по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй полипептидный иммуноген, где первый и второй полипептидные иммуногены характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности.

[112] Иммуногенная композиция по параграфу [111], где первый и второй полипептидные иммуногены характеризуются по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности.

[113] Иммуногенная композиция по параграфу [111] или [112], где первый и второй полипептидные иммуногены характеризуются менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности.

[114] Иммуногенная композиция по любому из параграфов [111] – [113], где каждый из полипептидных иммуногенов содержит один или несколько эпитопов, которые идентифицируют мишень.

[115] Иммуногенная композиция по параграфу [114], где мишень представляет собой патоген.

[116] Иммуногенная композиция по параграфу [115], где мишень представляет собой раковую клетку, аллерген или токсин.

[117] Иммуногенная композиция по параграфу [109], где композиция содержит (a) по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую первый полипептидный иммуноген, и (b) по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй полипептидный иммуноген, где первый и второй полипептидные иммуногены идентифицируют отличающиеся белки, при этом каждый отличающийся белок идентифицирует одну и ту же мишень.

[118] Иммуногенная композиция по параграфу [117], где мишень представляет собой патоген.

[119] Иммуногенная композиция по параграфу [118], где патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита.

[120] Иммуногенная композиция по параграфу [119], где патоген представляет собой раковую клетку, аллерген или токсин.

[121] Иммуногенная композиция по параграфу [109], где композиция содержит (a) по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую первый полипептидный иммуноген, и (b) по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую второй полипептидный иммуноген, где первый полипептидный иммуноген идентифицирует первую мишень, а второй полипептидный иммуноген идентифицирует вторую мишень.

[122] Иммуногенная композиция по параграфу [121], где каждая мишень представляет собой патоген.

[123] Иммуногенная композиция по параграфу [121] или [122], где каждая мишень независимо представляет собой раковую клетку, вирус, бактерию, гриб, паразита, токсин или аллерген.

[124] Иммуногенная композиция по любому из параграфов [109] – [123], где каждый полипептидный иммуноген функционально связан с IRES.

[125] Иммуногенная композиция, содержащая множество кольцевых полирибонуклеотидов, где композиция содержит (a) по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и (b) по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий

последовательность, кодирующую адъювант, или последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[126] Иммуногенная композиция по параграфу [125], где адъювант представляет собой полипептид.

[127] Иммуногенная композиция по параграфу [126], где адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

[128] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где цитокин представляет собой провоспалительный цитокин.

[129] Иммуногенная композиция по параграфу [128], где провоспалительный цитокин выбран из GM-CSF, IL-1-альфа, IL-1-бета, TGF-бета, TNF-альфа и TNF-бета.

[130] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-1.

[131] Иммуногенная композиция по параграфу [130], где цитокин, индуцирующий Th-1, выбран из IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18.

[132] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-2.

[133] Иммуногенная композиция по параграфу [132], где цитокин, индуцирующий Th-2, выбран из IFN-гамма, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13.

[134] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где хемокин выбран из MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes и TCA-3.

[135] Иммуногенная композиция по параграфу [134], где костимулирующая молекула выбрана из CD80, CD86, CD40-L, CD70 и CD27.

[136] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где стимулятор врожденного иммунитета выбран из STING (например, caSTING), TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1.

[137] Иммуногенная композиция по параграфу [136], где стимулятор врожденного иммунитета представляет собой конститутивно активный мутант.

[138] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где сигнальная молекула выбрана из STING (например, caSTING), TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, IKK-альфа, комплекса IKK, TBK1, B-катенина и каспазы 1.

[139] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где активатор транскрипции выбран из AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 и IRF5.

[140] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где рецептор цитокина выбран из IL-2-бета-R, IFN-гамма-R и IL-6R.

[141] Иммуногенная композиция по параграфу [127], где бактериальный компонент выбран из флагеллина и MBL.

[142] Иммуногенная композиция по любому из параграфов [125] – [141], где каждый из полипептидного иммуногена и адъюванта функционально связан с IRES.

[143] Иммуногенная композиция по параграфу [125], где последовательность, которая является стимулятором врожденной иммунной системы, представляет собой GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер.

[144] Иммуногенная композиция по любому из параграфов от [1] до [143], где кольцевой полирибонуклеотид содержит первый полирибонуклеотид с 5'-концом и 3'-концом, где каждый из 5'-конца и 3'-конца гибридизируется со вторым рибонуклеотидом, таким образом соединяя 5'-конец и 3'-конец первого полирибонуклеотида с образованием кольцевого полирибонуклеотида.

[145] Кольцевой полирибонуклеотид по параграфам [1] – [144], где кольцевой полирибонуклеотид получен посредством лигирования с помощью шунта.

[146] Иммуногенная композиция по любому из параграфов от [1] до [143], где кольцевой полирибонуклеотид получают путем обеспечения линейного полирибонуклеотида, содержащего 3'-конец и 5'-конец, где каждый из 3'-конца и 5'-конца содержит часть интрона, и где интронная часть 3'-конца и интронная часть 5'-конца катализируют реакцию сплайсинга, обеспечивая таким образом ковалентное конъюгирование 5'-конца и 3'-конца с образованием кольцевого полирибонуклеотида.

[147] Иммуногенная композиция по параграфу [146], где интрон представляет собой саморасщепляющийся интрон группы I.

[148] Фармацевтический препарат на основе циклического полирибонуклеотида, где циклический полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и при этом циклический полирибонуклеотид составляет по меньшей мере 25% (вес./вес.) от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[149] Фармацевтический препарат по параграфу [148], где циклический полирибонуклеотид составляет по меньшей мере 30% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 50% (вес./вес.), 60% (вес./вес.), 70% (вес./вес.), 75% (вес./вес.), 80% (вес./вес.), 85% (вес./вес.), 90% (вес./вес.), 91% (вес./вес.), 92% (вес./вес.), 93% (вес./вес.), 94% (вес./вес.), 95%

(вес./вес.), 96% (вес./вес.), 97% (вес./вес.), 98% (вес./вес.) или 99% (вес./вес.) от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[150] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] или [149], где фармацевтический препарат содержит не более 75% (вес./вес.), 60% (вес./вес.), 50% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 5% (вес./вес.) или 1% (вес./вес.) молекул линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[151] Фармацевтический препарат по параграфу [150], где фармацевтический препарат содержит не более 0,5% (вес./вес.) молекул линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[152] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [151], где препарат содержит не более 15% (вес./вес.) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[153] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [152], где препарат содержит не более 10% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) или 0,5% (вес./вес.) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[154] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] или [149], где фармацевтический препарат содержит по меньшей мере 1% (вес./вес.) линейного полирибонуклеотида.

[155] Фармацевтическая композиция по параграфу [154], где фармацевтический препарат содержит от 30% до 40% (вес./вес.) кольцевого полирибонуклеотида и от 1% до 10% (вес./вес.), 10%-20% (вес./вес.), 20%-30% (вес./вес.), 30%-40% (вес./вес.), 40%-50% (вес./вес.), 50%-60% (вес./вес.) или 60%-70% (вес./вес.) линейного полирибонуклеотида.

[156]. Фармацевтическая композиция по параграфу [154], где фармацевтический препарат содержит от 40% до 60% (вес./вес.) кольцевого полирибонуклеотида и от 1% до 10% (вес./вес), 10%-20% (вес./вес.), 20%-30% (вес./вес.), 30%-40% (вес./вес.), 40%-50% (вес./вес.), 50%-60% (вес./вес.) линейного полирибонуклеотида.

[157] Фармацевтическая композиция по параграфу [154], где фармацевтический препарат содержит от 60% до 80% (вес./вес.) кольцевого полирибонуклеотида и от 1% до 10% (вес./вес.), 10%-20% (вес./вес.), 20%-30% (вес./вес.), 30%-40% (вес./вес.) линейного полирибонуклеотида.

[158] Фармацевтический препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида, где кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и где фармацевтический препарат содержит не более 75% (вес./вес.) линейных молекул полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[159] Фармацевтический препарат по параграфу [158], где фармацевтический препарат содержит не более 60% (вес./вес.), 50% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) или 0,5% (вес./вес.) молекул линейных полирибонуклеотидов от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[160] Фармацевтический препарат по параграфу [158] или [159], где препарат содержит не более 15% (вес./вес.) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[161] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [158] – [160], где препарат содержит не более 10% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) или 0,5% (вес./вес.) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[162] Фармацевтический препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида, где кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и где фармацевтический препарат содержит не более 15% (вес./вес.) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[163] Фармацевтический препарат по параграфу [162], где препарат содержит не более 10% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) или 0,5% (вес./вес.) молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом от общего количества молекул рибонуклеотидов в фармацевтическом препарате.

[164] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [163], где указанный фармацевтический препарат содержит менее 10 ЕЭ/кг или лишен эндотоксина согласно измерению в тесте с лизатом амебоцитов *Limulus*.

[165] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [163], где фармацевтический препарат характеризуется биологической нагрузкой, составляющей менее 100 КОЕ/100 мл или менее 10 КОЕ/100 мл перед стерилизацией.

[166] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [165], где фармацевтический препарат представляет собой стерильный фармацевтический препарат, например, поддерживает рост менее 100 жизнеспособных микроорганизмов при тестировании в асептических условиях.

[167] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [166], где фармацевтический препарат соответствует стандарту USP <71>.

[168] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [67], где фармацевтический препарат соответствует стандарту USP <85>.

[169] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [168], где фармацевтический препарат представляет собой промежуточный фармацевтический препарат конечного лекарственного продукта.

[170] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [169], где фармацевтический препарат представляет собой конечный лекарственный продукт для введения субъекту.

[171] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [170], где фармацевтический препарат характеризуется концентрацией, составляющей по меньшей мере 0,1 нг/мл, 0,5 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл или 500 мг/мл молекул кольцевых полирибонуклеотидов.

[172] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [171], где фармацевтический препарат содержит не более 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 мкг/мл, 5000 мкг/мл, 10000 мкг/мл или 100000 мкг/мл молекул дезоксирибонуклеотидов.

[173] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [172], где фармацевтический препарат содержит белковое загрязнение (например, фермент) в количестве, составляющем менее 0,1 нг, 1 нг, 5 нг, 10 нг, 15 нг, 20 нг, 25 нг, 30 нг, 35 нг, 40 нг, 50 нг, 60 нг, 70 нг, 80 нг, 90 нг, 100 нг, 200 нг, 300 нг, 400 нг или 500 нг белкового загрязнения на миллиграмм (мг) молекул кольцевых полирибонуклеотидов.

[174] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [173], где фармацевтический препарат характеризуется соотношением поглощения A260/A280, составляющим от приблизительно 1,6 до 2,3, измеренным с помощью спектрофотометра.

[175] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [174], где фармацевтический препарат является по сути свободным от технологической примеси, выбранной из клеточного белка, клеточной дезоксирибонуклеиновой кислоты, фермента, компонента реагента, компонента геля или хроматографического материала.

[176] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [175], где фармацевтический препарат характеризуется пониженным уровнем одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа после очистки по сравнению с уровнем до очистки.

[177] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [176], где кольцевой полирибонуклеотид представляет собой кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [108].

[178] Фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [177], где кольцевой полирибонуклеотид получают в соответствии со способом, включающим стадии:

(a) получения множества линейных полирибонуклеотидных молекул;

b) циркуляризации линейных молекул полирибонуклеотидов с получением препарата молекул кольцевых полирибонуклеотидов и

c) обработки препарата с удалением молекул линейных полирибонуклеотидов из препарата.

[179] Фармацевтический препарат по параграфу [178], где способ дополнительно включает d) оценку количества молекул линейных полирибонуклеотидов в препарате, оставшихся после стадии обработки.

[180] Фармацевтический препарат по параграфу [178] или [179], где способ дополнительно включает e) дополнительную обработку препарата, где дополнительная обработка включает:

- обработку препарата с удалением из препарата молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом, и/или

- обработку препарата с удалением молекул дезоксирибонуклеотидов из препарата, и/или

- обработку препарата с удалением белковых загрязнений из препарата, и/или

- обработку препарата с удалением эндотоксина из препарата.

[181] Фармацевтическая композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [108], иммуногенную композицию по любому из параграфов [109] – [147] или фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [180] и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[182] Фармацевтическая композиция по параграфу [181], дополнительно содержащая адъювант.

[183] Фармацевтическая композиция по параграфу [182], где адъювант представляет собой неорганический адъювант, низкомолекулярный адъювант и эмульсию типа масло-в-воде, липид или полимер, пептид или пептидогликан, углевод или полисахарид, сапонин, адъювант на основе РНК, адъювант на основе ДНК, вирусную частицу, бактериальный адъювант, гибридную молекулу, ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, неорганическую наночастицу или многокомпонентный адъювант.

[184] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой неорганический адъювант.

[185] Фармацевтическая композиция по параграфу [184], где неорганический адъювант представляет собой соль алюминия или соль кальция.

[186] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой малую молекулу.

[187] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где малая молекула представляет собой имиквимод, резиквимод или гардиквимод.

[188] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой эмульсию типа масло-в-воде.

[189] Фармацевтическая композиция по параграфу [188], где эмульсия типа масло-в-воде представляет собой сквален, MF59, AS03, состав Montanide, необязательно Montanide ISA 51 или Montanide ISA 720, или неполный адъювант Фрейнда и эмульсию типа масло-в-воде.

[190] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой липид или полимер.

[191] Фармацевтическая композиция по параграфу [190], где липид или полимер представляют собой полимерную наночастицу, необязательно PLGA, PLG, PLA, PGA или PHB, липосому, необязательно виросомы или CAF01, липидную наночастицу или ее компонент, липополисахарид (LPS), необязательно монофосфорил-липид A (MPLA) или

глюкопиранозил-липид A (GLA), липопептид, необязательно Pam2 (Pam2CSK4) или Pam3 (Pam3CSK4) или гликолипид, необязательно димиколат трегалозы.

[192] Фармацевтическая композиция по параграфу [187], где адъювант представляет собой пептид или пептидогликан.

[193] Фармацевтическая композиция по параграфу [192], где пептид или пептидогликан соответствуют целым синтетическим или очищенным грамотрицательным или грамположительным бактериям или их частям, необязательно N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамину (MDP), слитому белку, содержащему флагеллин, маннозосвязывающему лектину (MBL), цитокинам или хемокинам.

[194] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой углевод или полисахарид.

[195] Фармацевтическая композиция по параграфу [194], где углевод или полисахарид представляют собой декстран (разветвленный микробный полисахарид), декстрансульфат, лентинан, зимозан, бета-глюкан, дельтин, маннан или хитин.

[196] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где вспомогательное вещество представляет собой сапонин.

[197] Фармацевтическая композиция по параграфу [196], где сапонин представляет собой гликозид или полициклический агликон, присоединенный к одной или нескольким боковым цепям сахара, необязательно ISCOMS, матриксу ISCOMS или QS-21.

[198] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой вспомогательное вещество на основе РНК.

[199] Фармацевтическая композиция по параграфу [198], где адъювант на основе РНК представляет собой поли(IC), поли(IC:LC), шпилечные РНК, необязательно с последовательностью, содержащей 5'PPP, вирусную последовательность, последовательности, содержащие поли(U), dsRNA, природную или синтетическую иммуностимулирующую последовательность РНК, аналоги нуклеиновых кислот, необязательно циклический GMP-AMP или циклический динуклеотид, такой как циклический ди-GMP, или аналог иммуностимулирующей основы, необязательно C8-замещенный или N7,C8-дизамещенный гуаниновый рибонуклеотид.

[200] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой вспомогательное вещество на основе ДНК.

[201] Фармацевтическая композиция по параграфу [200], где адъювант на основе ДНК представляет собой CpG, dsDNA или природную или синтетическую иммуностимулирующую последовательность ДНК.

[202] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой вирусную частицу.

[203] Фармацевтическая композиция по параграфу [202], где вирусная частица представляет собой виросому, необязательно бислой фосфолипидной клеточной мембраны.

[204] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой бактериальный адъювант.

[205] Фармацевтическая композиция по параграфу [204], где бактериальный адъювант представляет собой флагеллин, LPS или бактериальный токсин, необязательно энтеротоксины, термолабильный токсин или холерный токсин.

[206] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой гибридную молекулу.

[207] Фармацевтическая композиция по параграфу [206], где адъювант представляет собой CpG, конъюгированный с имиквимодом.

[208] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита.

[209] Фармацевтическая композиция по параграфу [208], где MAMP гриба или ооцита представляет собой хитин или бета-глюкан.

[210] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой неорганическую наночастицу.

[211] Фармацевтическая композиция по параграфу [210], где неорганическая наночастица представляет собой золотой наностержень, наночастицу на основе диоксида кремния, необязательно наночастицы мезопористого диоксида кремния (MSN).

[212] Фармацевтическая композиция по параграфу [183], где адъювант представляет собой многокомпонентный адъювант.

[213] Фармацевтическая композиция по параграфу [212], где многокомпонентный адъювант представляет собой AS01, AS03, AS04, полный адъювант Фрейнда или CAF01.

[214] Фармацевтическая композиция, содержащая смесь, включающую (a) полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и (b) спирт, где спирт составляет от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 75% об./об. в смеси.

[215] Фармацевтическая композиция по параграфу [214], где полирибонуклеотид представляет собой кольцевой полирибонуклеотид.

[216] Фармацевтическая композиция, содержащая смесь, включающую (a) кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [108], иммуногенную композицию по любому из параграфов [109] – [147] или фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [180], и (b) спирт, где спирт составляет от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 75% об./об. в смеси.

[217] Фармацевтическая композиция по параграфу [214], где полирибонуклеотид представляет собой линейный полирибонуклеотид.

[218] Фармацевтическая композиция по параграфу [217], где линейный полирибонуклеотид содержит множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности.

[219] Фармацевтическая композиция по параграфу [218], где по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности.

[220] Фармацевтическая композиция по параграфу [217], где линейный полирибонуклеотид содержит множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два полипептидных иммуногена идентифицируют отличающиеся белки, где каждый из отличающихся белков идентифицирует одну и ту же мишень.

[221] Фармацевтическая композиция по параграфу [217], где линейный полирибонуклеотид содержит множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два из полипептидных иммуногена идентифицируют отличающиеся мишени.

[222] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [217] – [221], где линейный полирибонуклеотид содержит по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь или по меньшей мере девять последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген.

[223] Фармацевтическая композиция по параграфу [215], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую адъювант.

[224] Фармацевтическая композиция по параграфу [223], где адъювант представляет собой полипептид.

[225] Фармацевтическая композиция по параграфу [224], где адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

[226] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [215] или [223] – [225], где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[227] Фармацевтическая композиция по параграфу [226], где последовательность, которая является стимулятором врожденной иммунной системы, представляет собой GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер.

[228] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [227], где содержание спирта составляет от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 60% об./об., от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 50% об./об., от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 40% об./об., от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 20% об./об., от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 15% об./об., от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 10% об./об., от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 5% об./об., от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 1% об./об. или от приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 0,5% об./об. в смеси.

[229] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [227], где содержание спирта составляет от приблизительно 0,5% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 1% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 5% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 10% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 15% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 20% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 30% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 40% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 50% об./об. до приблизительно 75% об./об., от приблизительно 60% об./об. до приблизительно 75% об./об. или от приблизительно 70% об./об. до приблизительно 75% об./об. в смеси.

[230] Способ по любому из параграфов [214] – [229], где спирт выбран из метанола, этанола, изопропанола, феноксиэтанола, триэтаноламина, фенилэтилового спирта, бутанола, пентанола, цетилового спирта, этиленгликоля, пропиленгликоля, денатурированного спирта, бензилового спирта, специально денатурированного спирта,

гликоля, стеарилового спирта, цетеарилового спирта, ментола, полиэтиленгликолей (PEG)-400, этоксилированных жирных кислот или гидроксиэтилцеллюлозы.

[231] Способ по параграфу [230], где спирт представляет собой этанол.

[232] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [231], где фармацевтическая композиция составлена для местного применения.

[233] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [232], где фармацевтическая композиция представляет собой жидкость, гель, лосьон, пасту, крем, пену или помаду.

[234] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [233], где фармацевтическая композиция характеризуется значением pH, составляющим приблизительно 6-8.

[235] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [234], где фармацевтическая композиция характеризуется значением вязкости, которое составляет приблизительно столько же, как таковое у воды.

[236] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [235], где фармацевтическая композиция является по сути свободной от гидрофобных или липофильных групп.

[237] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [236], где фармацевтическая композиция является по сути свободной от углеводородов.

[238] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [237], где фармацевтическая композиция является по сути свободной от катионных липосом.

[239] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [238], где фармацевтическая композиция является по сути свободной от жирных кислот, липидов, липосом, холестерина или любой их комбинации.

[240] Фармацевтическая композиция по любому из параграфов [214] – [239], при этом композиция дополнительно содержит адъювант.

[241] Фармацевтическая композиция по параграфу [240], где адъювант представляет собой неорганический адъювант, низкомолекулярный адъювант и эмульсию типа масло-в-воде, липид или полимер, пептид или пептидогликан, углевод или полисахарид, сапонин, адъювант на основе РНК, адъювант на основе ДНК, вирусную частицу, бактериальный адъювант, гибридную молекулу, ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, неорганическую наночастицу или многокомпонентный адъювант.

[242] Способ доставки полирибонуклеотида субъекту, включающий местное нанесение фармацевтической композиции по любому из параграфов [214] – [241] на участок поверхности тела субъекта.

[243] Способ доставки полирибонуклеотида субъекту, включающий:

a) нанесение стерилизующего средства на участок поверхности тела субъекта;

b) нанесение композиции, содержащей циклический полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [108], иммуногенную композицию по любому из параграфов [109] – [147], фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [180] или фармацевтическую композицию по любому из параграфов [181] – [242] и разбавитель на участок поверхности тела субъекта.

[244] Способ по параграфу [243], где композиция (b) не содержит носитель.

[245] Способ по параграфу [243] или [244], где стерилизующее средство представляет собой спирт, ультрафиолетовое излучение, лазерное излучение или нагревание.

[246] Способ доставки полирибонуклеотида субъекту, включающий:

a) нанесение спирта на участок поверхности тела субъекта и

b) нанесение композиции, содержащей циклический полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [108], иммуногенную композицию по любому из параграфов [109] – [147], фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [180] или фармацевтическую композицию по любому из параграфов [181] – [241] и разбавитель на участок поверхности тела субъекта.

[247] Способ по параграфу [246], где спирт выбран из группы, состоящей из метанола, этанола, изопропанола, феноксиэтанола, триэтаноламина, фенилэтилового спирта, бутанола, пентанола, цетилового спирта, этиленгликоля, пропиленгликоля, денатурированного спирта, бензилового спирта, специально денатурированного спирта, гликоля, стеарилового спирта, цетеарилового спирта, ментола, полиэтиленгликолей (PEG)-400, этоксилированных жирных кислот или гидроксиэтилцеллюлозы.

[248] Способ по параграфу [247], где спирт представляет собой этанол.

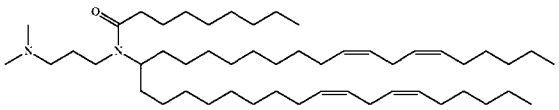
[249] Способ по любому из параграфов [243] – [248], где участок поверхности тела субъекта выбрана из участка поверхности кожи, полости рта, полости носа, желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей или любой их комбинации.

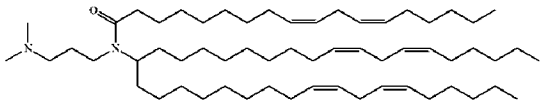
[250] Липидная наночастица (LNP), содержащая кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [108] или иммуногенную композицию по любому из параграфов [109] – [147].

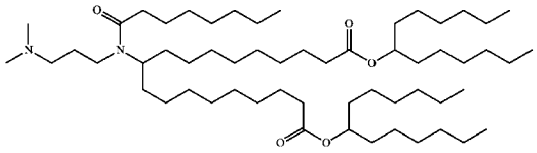
[251] LNP по параграфу [250], содержащий ионизируемый липид.

[252] LNP по параграфу [250], содержащий катионный липид.

[253] LNP по параграфу [252], где катионный липид характеризуется структурой в соответствии со следующим:


(i),


(ii) или


(iii).

[254] LNP по любому из параграфов [250] – [253], дополнительно содержащая один или несколько нейтральных липидов, например DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE, SM, стероид, например холестерин, и/или один или несколько липидов, конъюгированных с полимером, например пегилированный липид, например PEG-DAG, PEG-PE, PEG-S-DAG, PEG-Cer или PEG-диалкилоксипропилкарбамат.

[255] Способ лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида по любому из параграфов [1] – [108], иммуногенной композиции по любому из параграфов [109] – [147], фармацевтического препарата по любому из параграфов [148] – [180], фармацевтической композиции по любому из параграфов [181] – [241] или LNP по любому из параграфов [250] – [254].

[256] Способ по параграфу [255], где заболевание, нарушение или состояние представляют собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию или грибковую инфекцию.

[257] Способ по параграфу [255], где заболевание, нарушение или состояние представляют собой рак.

[258] Способ по параграфу [255], где заболевание, нарушение или состояние ассоциированы с воздействием аллергена.

[259] Способ по параграфу [255], где заболевание, нарушение или состояние ассоциированы с воздействием токсина.

[260] Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида по любому из параграфов

[1] – [108], иммуногенной композиции по любому из параграфов [109] – [147], фармацевтического препарата по любому из параграфов [148] – [180], фармацевтической композиции по любому из параграфов [181] – [241] или LNP по любому из параграфов [250] – [254].

[261] Способ по любому из параграфов от [255] – [260], где субъект представляет собой млекопитающее.

[262] Способ по параграфу [261], где субъект представляет собой человека.

[263] Способ по параграфу [261], где способ относится к млекопитающему, отличному от человека.

[264] Способ по параграфу [261], где млекопитающим, отличным от человека, является корова, овца, коза, свинья, собака, лошадь или кошка.

[265] Способ по любому из параграфов [255] – [264], где субъект представляет собой птицу.

[266] Способ по параграфу [265], где птицей является курица, петух, индейка или попугай.

[267] Способ по любому из параграфов [255] – [266], где способ дополнительно включает введение субъекту адъюванта.

[268] Способ по параграфу [267], где, где адъювант представляет собой неорганический адъювант, низкомолекулярный адъювант и эмульсию типа масло-в-воде, липид или полимер, пептид или пептидогликан, углевод или полисахарид, сапонин, адъювант на основе РНК, адъювант на основе ДНК, вирусную частицу, бактериальный адъювант, гибридную молекулу, ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, неорганическую наночастицу или многокомпонентный адъювант.

[269] Способ по параграфу [267], где адъювант представляет собой полипептидный адъювант.

[270] Способ по параграфу [269], где полипептидный адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

[271] Способ по параграфу [267], где адъювант представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

[272] Способ по параграфу [271], где стимулятор врожденной иммунной системы выбран из РНК, содержащей GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер.

[273] Способ по любому из параграфов [255] – [272], где кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [110], иммуногенную композицию по любому из параграфов [111] – [151], фармацевтический препарат по любому из параграфов [152] – [184], фармацевтическую композицию по любому из параграфов [185] – [245] или LNP по любому из параграфов [250] – [254] вводят субъекту в виде однократной дозы.

[274] Способ по любому из параграфов [255] – [272], где кольцевой полирибонуклеотид по любому из параграфов [1] – [108], иммуногенную композицию по любому из параграфов [109] – [147], фармацевтический препарат по любому из параграфов [148] – [180], фармацевтическую композицию по любому из параграфов [181] – [241] или LNP по любому из параграфов [250] – [254] вводят субъекту два или больше раз, три или больше раз, четыре или больше раз или пять или больше раз.

[275] Способ по параграфу [274], где введение кольцевого полирибонуклеотида по любому из параграфов [1] – [108], иммуногенной композиции по любому из параграфов [109] – [147], фармацевтического препарата по любому из параграфов [148] – [180], фармацевтической композиции по любому из параграфов [181] – [241], или LNP по любому из параграфов [250] – [254] осуществляют приблизительно раз в неделю, приблизительно раз в две недели, приблизительно раз в три недели, приблизительно раз в месяц, приблизительно раз в два месяца, приблизительно раз в три месяца, приблизительно раз в четыре месяца, приблизительно раз в пять месяцев, приблизительно раз в шесть месяцев, приблизительно раз в год, приблизительно раз в два года, приблизительно раз в три года, приблизительно раз в четыре года, приблизительно раз в пять лет или приблизительно раз в десять лет.

[276] Способ по любому из параграфов [255] – [275], где способ дополнительно включает введение субъекту полипептидного иммуногена (например, белковой субъединицы, содержащей полипептидный иммуноген).

[277] Способ по параграфу [276], где полипептидный иммуноген соответствует (например, характеризуется 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности) полипептидному иммуногену, кодируемому последовательностью кольцевого полирибонуклеотида.

[278] Способ по параграфу [276], где полипептидный иммуноген вводят субъекту после введения кольцевого полирибонуклеотида по любому из параграфов [1] – [108], иммуногенной композиции по любому из параграфов [109] – [147], фармацевтического препарата по любому из параграфов [148] – [180], фармацевтической композиции по любому из параграфов [181] – [241] или LNP по любому из параграфов [250] – [254].

[279] Способ по любому из параграфов [276] – [278], где полипептидный иммуноген обеспечивает поддержание или усиление иммунного ответа у субъекта в отношении полипептидного иммуногена.

[280] Способ поддержания или усиления иммунного ответа у субъекта, включающий: (i) введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида, кодирующего полипептидный иммуноген, и (ii) введение субъекту полипептидного иммуногена, где стадию (ii) осуществляют по прошествии периода продолжительностью от 1 недели до 6 месяцев после стадии (i), и где введение полипептидного иммуногена на стадии (ii) обеспечивает поддержание или усиление иммунного ответа у субъекта в отношении полипептидного иммуногена.

[281] Способ по параграфу [280], где полипептидный иммуноген содержит один или несколько эпитопов, которые идентифицируют мишень.

[282] Способ по параграфу [281], где мишень представляет собой патоген.

[283] Способ по параграфу [281], где мишень представляет собой раковую клетку, аллерген или токсин.

Определения

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

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

Используемый в данном документе термин "адъювант" относится к композиции (например, соединения, полипептида, нуклеиновой кислоты или липида), которая увеличивает иммунный ответ, например, увеличивает специфический иммунный ответ на

иммуноген. Увеличение иммунного ответа предусматривает усиление или расширение специфичности любого из опосредованного антителами иммунного ответа и клеточного иммунного ответа или как первого, так и второго.

Термин "спирт" означает любое органическое соединение, в котором гидроксильная функциональная группа (–OH) связана с атомом углерода. В некоторых вариантах осуществления спирт содержит гидроксил, связанный с насыщенным атомом углерода, который в свою очередь связан с другими атомами водорода или углерода. Описанный в данном документе спирт может включать без ограничения одноатомные спирты, многоатомные спирты, ненасыщенные алифатические спирты и алициклические спирты. В некоторых случаях спирт может относиться к этанолу. В некоторых случаях спирт может включать без ограничения метанол, этанол, изопропанол, феноксиэтанол, триэтаноламин, фенилэтиловый спирт, бутанол, пентанол, цетиловый спирт, этиленгликоль, пропиленгликоль, денатурированный спирт, бензиловый спирт, специально денатурированный спирт, гликоль, стеариловый спирт, цетеариловый спирт, ментол, полиэтиленгликоли (PEG)-400, этоксилированные жирные кислоты или гидроксиэтилцеллюлозу.

Используемый в данном документе термин "ассоциированный с" заболеванием, нарушением или состоянием относится к взаимосвязи, либо причинной, либо коррелятивной, между определенным объектом и возникновением или тяжестью заболевания, нарушения или состояния у субъекта. Например, если мишень ассоциирована с заболеванием, нарушением или состоянием, то мишень может представлять собой этиологический фактор заболевания, нарушения или состояния. Например, вирус может являться этиологическим фактором вирусной инфекции, бактерии могут являться возбудителями бактериальной инфекции, гриб может являться этиологическим фактором грибковой инфекции, или паразит может являться этиологическим фактором паразитарной инфекции, раковая клетка может являться этиологическим фактором рака, токсин может являться причиной интоксикации, и аллерген может являться этиологическим фактором аллергической реакции. Цель, ассоциированная с заболеванием, нарушением или состоянием, может также или альтернативно коррелировать с повышенной вероятностью возникновения или повышением тяжести заболевания, нарушения или состояния.

Используемый в данном документе термин "носитель" означает соединение, композицию, реагент или молекулу, которые облегчают транспортировку или доставку композиции (например, линейного или кольцевого полирибонуклеотида) в организм

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

Используемый в данном документе термин "средство, способствующее проникновению в клетку" означает средство, которое при контакте с клеткой облегчает проникновение в клетку. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, облегчает прямое проникновение через клеточную мембрану, например, посредством прямого электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточной мембраны или временного образования пор путем индуцирования конфигурационных изменений в мембранных белках или в фосфолипидном бислое. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, облегчает опосредованную эндоцитозом транслокацию в клетку. Например, в определенной ситуации средство, способствующее проникновению в клетку, может стимулировать в клетке процесс эндоцитоза, посредством которого клеточная мембрана может сворачиваться внутрь клетки. В определенных вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, помогает сформировать временную структуру, которая обеспечивает транспортировку через клеточную мембрану. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, средство, способствующее проникновению в клетку, представленное в данном документе, может обеспечивать повышение проницаемости клеточной мембраны или увеличение уровня интернализации молекулы в клетку, в результате чего доставка в клетку может быть более эффективной при одновременном контакте клетки со средством, способствующим проникновению в клетку, по сравнению с идентичной в остальном доставкой без средства, способствующего проникновению в клетку.

Используемые в данном документе термины "circRNA", или "кольцевой полирибонуклеотид", или "кольцевая РНК", или "кольцевая молекула полирибонуклеотида" применяются взаимозаменяемо и означают молекулу полирибонуклеотида, которая характеризуется структурой без свободных концов (т. е., без свободных 3'- и/или 5'-концов), например, молекулу полирибонуклеотида, которая

образует кольцевую или замкнутую структуру посредством ковалентных (например, ковалентно замкнутых) или нековалентных связей.

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

Используемые в данном документе термины "препарат на основе circRNA", или "препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида", или "препарат на основе кольцевой РНК" используются взаимозаменяемо и означают композицию, содержащую молекулы circRNA и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию.

Следует понимать, что выражение "соединение, композиция, продукт и т. д. для лечения, модулирования и т. д." относится к соединению, композиции, продукту и т. д. как таковым, которые являются подходящими для указанных целей лечения, модулирования и т. д. Выражение "соединение, композиция, продукт и т. д. для лечения, модулирования и т. д." дополнительно раскрывает, что, в качестве предпочтительного варианта осуществления, такие соединение, композиция, продукт и т. д. предназначены для применения в лечении, модулировании и т. д.

Выражение "соединение, композиция, продукт и т. д. для применения в..." или "применение соединения, композиции, продукта и т. д. в изготовлении лекарственного препарата, фармацевтической композиции, ветеринарной композиции, диагностической композиции и т. д. для..." указывает на то, что такие соединения, композиции, продукты и т. д. предназначены для применения в терапевтических способах, которые могут быть осуществлены на практике в отношении организма человека или животного. Они рассматриваются в качестве эквивалентного раскрытия вариантов осуществления и пунктов формулы изобретения, относящихся к способам лечения и т. д. Если вариант осуществления или пункт формулы изобретения, таким образом, относится к "соединению для применения в лечении человека или животного, которые предположительно страдают заболеванием", это также считается раскрытием "применения соединения в изготовлении лекарственного препарата для лечения человека или животного, которые предположительно страдают заболеванием" или "способа лечения путем введения соединения человеку или животному, которые предположительно страдают заболеванием".

Термин "разбавитель" означает среду-носитель, содержащую неактивный растворитель, в которой композиция, описанная в данном документе (например, композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид), может быть разбавлена или

растворена. Разбавитель может представлять собой средство для солюбилизации РНК, буфер, изотоническое средство или их смесь. Разбавитель может представлять собой жидкий разбавитель или твердый разбавитель. Неограничивающие примеры жидких разбавителей включают воду или другие растворители, солюбилизирующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, масло из семян хлопчатника, арахисовое масло, кукурузное масло, масло из зародышей пшеницы, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сорбитановые сложные эфиры жирных кислот и 1,3-бутандиол. Неограничивающие примеры твердых разбавителей включают карбонат кальция, карбонат натрия, фосфат кальция, дикальцийфосфат, сульфат кальция, гидрофосфат кальция, фосфат натрия, лактозу, сахарозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, сорбит, инозит, хлорид натрия, сухой крахмал, кукурузный крахмал или сахарную пудру.

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

Используемый в данном документе термин "эпитоп" относится к части или всему иммуногену, который распознается антителом или Т-клеточным рецептором, на который нацелены антитело или Т-клеточный рецептор или который связывается с антителом или Т-клеточным рецептором. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, например, непрерывную последовательность нуклеиновых кислот или аминокислот. Эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, например, эпитоп, который содержит аминокислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации белка. Конформационный эпитоп может содержать несмежные аминокислоты из первичной аминокислотной последовательности. В качестве другого примера конформационный эпитоп включает нуклеиновые кислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации иммуногенной последовательности на основе ее вторичной или третичной структуры.

Используемый в данном документе термин "инкриптоген" означает последовательность или структуру нуклеиновой кислоты в кольцевом полирибонуклеотиде, которая способствует снижению уровня выявления иммунной

клеткой, ускользанию от него и/или его избеганию и/или ослабляет индукцию иммунного ответа на кольцевой полирибонуклеотид.

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

Используемые в данном документе термины "идентифицировать" или "идентифицирует" относятся к указанию, определению или распознаванию идентичности объекта. Например, иммуноген или его эпитоп могут идентифицировать мишень, что означает, что мишень содержит иммуноген или его эпитоп, что иммуноген или его эпитоп происходят из мишени, и/или иммуноген или его эпитоп характеризуются высокой степенью сходства с частью мишени или всей мишенью. Распознавание или связывание антителом или Т-клеточным рецептором иммуногена или его эпитопа может идентифицировать мишень. Если иммуноген или его эпитоп идентифицируют мишень, иммуноген или его эпитоп обеспечивают отличие мишени от одной или нескольких других мишеней. Точно так же полипептидный иммуноген может идентифицировать белок. Другими словами, полипептидный иммуноген является компонентом, частью, производным или характеризуется высокой степенью сходства с белком или частью белка, в частности с эпитопом белка.

Используемый в данном документе термин «стимулятор врожденной иммунной системы» относится к веществу, которое индуцирует врожденный иммунологический ответ, частично путем индукции экспрессии одного или нескольких генов, участвующих во врожденном иммунитете, включая без ограничения интерферон типа I (например, IFNα, INFβ и/или IFNγ), провоспалительный цитокин (например, IL-1, IL-12, IL-18, TNF-α и/или GM-CSF), индуцируемый ретиноевой кислотой ген-I (RIG-I, также известный как DDX58), ген 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5, также известный как IFIH1), 2'-5'-олигоаденилатсинтазу 1 (OAS 1), OAS-подобный белок (OASL) и/или протеинкиназу R (PKR). Стимулятор врожденной иммунной системы может действовать как адъювант, например, при введении в комбинации с рибонуклеотидом, который кодирует иммуноген, или в составе с ним. Стимулятор врожденной иммунной системы может представлять собой отдельный молекулярный объект (например, не кодируемый полирибонуклеотидом или не включенный в его последовательность),

например, STING (например, caSTING), TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1 или их конститутивно активный мутант. Стимулятор врожденной иммунной системы может кодироваться (например, экспрессироваться с) полирибонуклеотидом. Полирибонуклеотид может альтернативно или дополнительно включать рибонуклеотидную последовательность, которая действует как стимулятор врожденной иммунной системы (например, GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированная область, содержащая dsRNA, или аптамер).

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

Используемый в данном документе термин "иммуноген" относится к любой молекуле или молекулярной структуре, которая содержит один или несколько эпитопов,

которые распознаются антителом или Т-клеточным рецептором, на которые нацелены антитело или Т-клеточный рецептор или которые связываются с антителом или Т-клеточным рецептором. В частности, иммуноген индуцирует иммунный ответ у субъекта (например, является иммуногенным, как определено в данном документе). Иммуноген способен индуцировать иммунный ответ у субъекта, где иммунный ответ относится к ряду молекулярных, клеточных и организменных событий, которые индуцируются, когда иммуноген сталкивается с иммунной системой. Иммунный ответ может представлять собой гуморальный и/или клеточный иммунный ответ. Они могут предусматривать выработку антител и размножение В- и Т-клеток. Чтобы определить, возник ли иммунный ответ, и проследить его течение, у иммунизированного субъекта можно осуществлять мониторинг появления иммунных реагентов, направленных на специфический иммуноген. При иммунном ответе на большинство иммуногенов индуцируется выработка как специфических антител, так и специфических эффекторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуноген является чужеродным для хозяина. В некоторых вариантах осуществления иммуноген не является чужеродным для хозяина. Иммуноген может предусматривать весь полипептид, полисахарид, полинуклеотид или липид или часть такового. Иммуноген также может представлять собой смешанный полипептид, полисахарид, полинуклеотид и/или липид. Например, иммуноген может представлять собой трансляционно модифицированный полипептид. "Полипептидный иммуноген" относится к иммуногену, который предусматривает полипептид. Полипептидный иммуноген может также предусматривать одну или несколько посттрансляционных модификаций, и/или может образовывать комплекс с одной или несколькими дополнительными молекулами, и/или может характеризоваться третичной или четвертичной структурой, каждая из которых может определять иммуногенность полипептида или влиять на таковую.

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

Иммуногенный ответ можно оценить, оценив количество антитела в плазме или сыворотке крови субъекта с применением анализа общих антител, подтверждающего теста, титрования и изотипирования антител и оценки нейтрализующих антител. При анализе общих антител измеряют содержание всех антител, образующихся как часть иммунного ответа в сыворотке или плазме крови субъекта, которому ввели иммуноген. Наиболее часто применяемым тестом для выявления антител является ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), с помощью которого выявляют антитела в тестируемой сыворотке крови, которые связываются с антителом, представляющим интерес, включая IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Иммуногенный ответ можно дополнительно оценить с помощью подтверждающего анализа. После оценки общих антител можно применять подтверждающий анализ для подтверждения результатов анализа общих антител. Конкурентный анализ можно применять для подтверждения того, что антитело специфически связывается с мишенью, и что положительный результат скринингового анализа не является результатом неспецифического взаимодействия тестируемой сыворотки крови или реагента для выявления с другими материалами в анализе.

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

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

хемилюминесценцию или проточную цитометрию. Анализ связывания лиганда также можно применять для измерения аффинности связывания иммуногена и антитела *in vitro* для оценки эффективности нейтрализации.

Дополнительно индукция клеточного иммунного ответа может быть оценена с помощью измерения активации Т-клеток у субъекта с применением клеточных маркеров на Т-клетках, полученных от субъекта. Образец крови, биоптат лимфатического узла или образец ткани может быть собран у субъекта, и Т-клетки из образца могут быть оценены на наличие одного или нескольких (например, 2, 3, 4 или больше) маркеров активации: CD25, CD71, CD26, CD27, CD28, CD30, CD154, CD40L, CD134, CD69, CD62L или CD44. Активация Т-клеток также может быть оценена с применением тех же способов в модели на животных *in vivo*. Этот анализ также может быть выполнен посредством добавления иммуногена к Т-клеткам in vitro (например, Т-клетки, полученные от субъекта, модели на животном, репозитория или коммерческого источника) и измерения вышеупомянутых маркеров для оценки активации Т-клеток. Аналогичные подходы можно применять для оценки влияния на активацию других иммунных клеток, таких как эозинофилы (маркеры: CD35, CD11b, CD66, CD69 и CD81), дендритные клетки (маркеры: IL-8, MHC класса II, CD40, CD80, CD83 и CD86), базофилы (CD63, CD13, CD4 и CD203c) и нейтрофилы (CD11b, CD35, CD66b и CD63). Данные маркеры можно оценить с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии, гибридизации *in situ* и других анализов, которые позволяют измерять клеточные маркеры. Сравнение результатов до и после введения иммуногена можно применять для определения его эффекта.

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

Используемый в данном документе термин "линейный аналог" означает полирибонуклеотидную молекулу (и ее фрагменты), характеризующуюся нуклеотидной последовательностью, являющейся такой же, что и у кольцевого полирибонуклеотида, или сходной с таковой (например, характеризующейся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение), и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованная версия (и ее фрагменты) кольцевого полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент

(например, версия, предшествующая циркуляризованной версии) представляет собой полирибонуклеотидную молекулу (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же или сходной нуклеотидной последовательностью (например, характеризующуюся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) и наличием таких же или сходных модификаций нуклеиновой кислоты, что и кольцевой полирибонуклеотид, и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованную версию (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент представляет собой полирибонуклеотидную молекулу (и ее фрагменты), характеризующуюся такой же или сходной нуклеотидной последовательностью (например, характеризующуюся идентичностью последовательностей, составляющей 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или любое промежуточное процентное значение) и наличием отличающихся модификаций нуклеиновой кислоты, что и кольцевой полирибонуклеотид, или их отсутствием и характеризующуюся наличием двух свободных концов (т. е. нециркуляризованную версию (и ее фрагменты) циркуляризованного полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления фрагмент полирибонуклеотидной молекулы, которая является линейным эквивалентом, представляет собой любую часть полирибонуклеотидной молекулы линейного эквивалента, которая является более короткой, чем полирибонуклеотидная молекула линейного эквивалента. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 5'-кэп. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит полиаденозиновый хвост. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления линейный эквивалент дополнительно содержит 5'-UTR.

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

или способов циркуляризации, катализируемых химически, ферментативно, с использованием рибозимов или сплайсинга.

Используемый в данном документе термин "смесь" означает материал, изготовленный из двух или больше отличающихся веществ, которые смешаны. В некоторых случаях смесь, описанная в данном документе, может быть гомогенной смесью двух или больше отличающихся веществ, например, смесь может характеризоваться одинаковыми пропорциями своих компонентов (например, двух или больше веществ) в любом заданном образце смеси. В некоторых случаях смесь, представленная в данном документе, может представлять собой гетерогенную смесь двух или больше отличающихся веществ, например, пропорции компонентов смеси (например, двух или больше веществ) могут варьировать во всей смеси. В некоторых случаях смесь представляет собой жидкий раствор, например смесь находится в жидкой фазе. В некоторых случаях жидкий раствор можно рассматривать как содержащий жидкий растворитель и растворенное вещество. Смешивание растворенного вещества с жидким растворителем можно назвать процессом "растворения". В некоторых случаях жидкий раствор представляет собой раствор жидкость-в-жидкости (например, жидкое растворенное вещество, растворенное в жидком растворителе), раствор твердого вещества в жидкости (например, твердое вещество, растворенное в жидком растворителе) или раствор газ-в-жидкости (например, твердое растворенное вещество, растворенное в жидком растворителе). В некоторых случаях существует более одного растворителя и/или более одного растворенного вещества. В некоторых случаях смесь представляет собой коллоид, жидкую суспензию или эмульсию. В некоторых случаях смесь представляет собой твердую смесь, например смесь находится в твердой фазе.

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

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

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

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

Термины "получаемый", "производимый" или т. п. применяют для указания того, что пункт формулы изобретения или вариант осуществления относится к соединению, композиции, продукту и т. д. как таковым, т. е. что соединение, композиция, продукт и т. д. могут быть получены или продуцированы с помощью способа, который описан для изготовления соединения, композиции, продукта и т. д., не считая того, что соединение, композиция, продукт и т. д. также могут быть получены или продуцированы с помощью других способов, кроме описанных. Термины "полученный", "произведенный" или т. п. указывают на то, что соединение, композиция, продукт получены или произведены указанным конкретным способом. Следует понимать, что термины "получаемый", "производимый" или т. п. также раскрывают термины "полученный", "произведенный" и т. п. в качестве предпочтительного варианта осуществления "получаемого", "производимого" и т. п.

Используемый в данном документе термин "патоген" относится к возбудителю инфекции, который вызывает заболевание или симптомы заболевания у субъекта, например, посредством непосредственного инфицирования субъекта, выработки средств, вызывающих заболевание или симптомы заболевания у субъекта, и/или вызывая иммунный ответ у субъекта. В контексте данного документа патогены включают без ограничения бактерии, простейшие, паразиты, грибы, нематоды, насекомые, вироиды и вирусы или любую их комбинацию, где каждый патоген сам по себе или совместно с другим патогеном способен вызывать заболевание или симптомы у субъекта.

Используемый в данном документе термин "полезная нагрузка" означает любую молекулу, доставляемую полирибонуклеотидом, раскрытым в данном документе. В некоторых случаях полезная нагрузка представляет собой нуклеиновую кислоту, белок, химическое вещество, рибонуклеопротеин или любую их комбинацию. В некоторых случаях полезная нагрузка представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, непосредственно содержащуюся в полирибонуклеотиде, раскрытым в данном документе.

В некоторых случаях полезная нагрузка присоединена к полирибонуклеотиду или ассоциирована с ним, как раскрыто в данном документе, например, посредством комплементарной гибридизации или посредством взаимодействий белок-нуклеиновая кислота. В определенных случаях полезная нагрузка представляет собой белок, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащейся внутри полирибонуклеотида, присоединенной к нему или ассоциированной с ним. В некоторых случаях "присоединение" означает ковалентную связь или нековалентное взаимодействие между двумя молекулами. В некоторых случаях термин "ассоциация", если он применяется в контексте взаимодействия между полезной нагрузкой и полирибонуклеотидом, означает, что полезная нагрузка косвенно соединена с полирибонуклеотидом посредством одной или нескольких других молекул между ними. В некоторых случаях присоединение или ассоциация могут являться временными. В некоторых случаях полезная нагрузка присоединяется к полирибонуклеотиду или ассоциируется с ним при одних условиях, но не при других условиях, например, в зависимости от условий, представляющих собой pH окружающей среды, или наличия или отсутствия стимула или партнера по связыванию.

Термин "фармацевтическая композиция" предназначен также для раскрытия того, что кольцевой или линейный полирибонуклеотид, содержащийся в фармацевтической композиции, можно применять для лечения организма человека или животного посредством терапии. Таким образом, предполагается, что он эквивалентен термину "кольцевой или линейный полирибонуклеотид для применения в терапии".

Термин "полинуклеотид", используемый в данном документе, означает молекулу, содержащую одну или несколько субъединиц нуклеиновой кислоты или нуклеотидов, и может применяться взаимозаменяемо с "нуклеиновой кислотой" или "олигонуклеотидом". Полинуклеотид может включать один или несколько нуклеотидов, выбранных из аденозина (A), цитозина (C), гуанина (G), тимина (T) и урацила (U) или их вариантов. Нуклеотид может включать нуклеозид и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше фосфатных (PO_3) групп. Нуклеотид может включать азотистое основание, пятиуглеродный сахар (либо рибозу, либо дезоксирибозу) и одну или несколько фосфатных групп. Рибонуклеотиды представляют собой нуклеотиды, в которых сахаром является рибоза. Полирибонуклеотиды, или рибонуклеиновые кислоты, или РНК могут относиться к макромолекулам, которые содержат несколько рибонуклеотидов, полимеризующихся посредством фосфодиэфирных связей. Дезоксирибонуклеотиды представляют собой нуклеотиды, в которых сахаром является дезоксирибоза.

Полидезоксирибонуклеотиды, или дезоксирибонуклеиновые кислоты, или ДНК означают макромолекулы, которые содержат несколько дезоксирибонуклеотидов, которые полимеризуются посредством фосфодиэфирных связей. Нуклеотид может представлять собой нуклеозидмонофосфат или нуклеозидполифосфат. Нуклеотид означает дезоксирибонуклеозидполифосфат, такой как, например, дезоксирибонуклеозидтрифосфат (dNTP), который может быть выбран из дезоксиаденозинтрифосфата (dATP), дезоксицитидинтрифосфата (dCTP), дезоксигуанозинтрифосфата (dGTP), уридинтрифосфата (dUTP) и дезокситимидинтрифосфата (dTTP), dNTP, которые содержат обнаруживаемые метки, такие как люминесцентные метки или маркеры (например, флуорофоры). Нуклеотид может содержать любую субъединицу, которая может быть включена в растущую нить нуклеиновой кислоты. Такая субъединица может представлять собой A, C, G, T или U или любую другую субъединицу, которая является специфичной для одного или нескольких комплементарных A, C, G, T или U, или комплементарной пурину (т. е. A или G, или их вариант) или пиримидину (т. е. C, T или U, или их вариант). В некоторых примерах полинуклеотид представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), рибонуклеиновую кислоту (РНК) или их производные или варианты. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой среди прочего короткую интерферирующую РНК (siRNA), микроРНК (miRNA), плазмидную ДНК (pDNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), малую ядерную РНК (snRNA), информационную РНК (мРНК), предшественник мРНК (пре-мРНК), антисмысловую РНК (asRNA) и охватывает как нуклеотидную последовательность, так и любые ее структурные варианты осуществления, такие как однонитевая, двухнитевая, трехнитевая, спиральная, шпилечная и т. д. В некоторых случаях молекула полинуклеотида является кольцевой. Полинуклеотид может характеризоваться различной длиной. Молекула нуклеиновой кислоты может характеризоваться длиной по меньшей мере приблизительно 10 оснований, 20 оснований, 30 оснований, 40 оснований, 50 оснований, 100 оснований, 200 оснований, 300 оснований, 400 оснований, 500 оснований, 1 тысячу оснований (т. о.), 2 т. о., 3 т. о., 4 т. о., 5 т. о., 10 т. о., 50 т. о. или больше. Полинуклеотид можно выделить из клетки или ткани. Как представлено в варианте осуществления в данном документе, полинуклеотидные последовательности могут предусматривать выделенные и очищенные молекулы ДНК/РНК, синтетические молекулы ДНК/РНК и синтетические аналоги ДНК/РНК.

Полинуклеотиды, например полирибонуклеотиды или полидезоксирибонуклеотиды, могут предусматривать один или несколько вариантов

нуклеотидов, включая нестандартный(нестандартные) нуклеотид(нуклеотиды), неприродный(неприродные) нуклеотид(нуклеотиды), аналог(аналоги) нуклеотида и/или модифицированные нуклеотиды. Примеры модифицированных нуклеотидов включают без ограничения диаминопурин, 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-D46-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый сложный эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил, (acp3)w, 2,6-диаминопурин и т. п. В некоторых случаях нуклеотиды могут предусматривать модификации в их фосфатных компонентах, включая модификации трифосфатного компонента. Неограничивающие примеры таких модификаций включают фосфатные цепи большей длины (например, фосфатная цепь, содержащая 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше фосфатных компонентов) и модификации с использованием тиоловых компонентов (например, альфа-тиотрифосфат и бета-тиотрифосфаты). Молекулы нуклеиновой кислоты также могут быть модифицированы по основному компоненту (например, по одному или нескольким атомам, которые, как правило, доступны для образования водородной связи с комплементарным нуклеотидом, и/или по одному или нескольким атомам, которые, как правило, не способны образовывать водородную связь с комплементарным нуклеотидом), сахарному компоненту или фосфатному остову. Молекулы нуклеиновой кислоты могут также содержать модифицированные амином группы, такие как аминоаллил-1-dUTP (aa-dUTP) и аминогексилакриламид-dCTP (aha-dCTP) для обеспечения возможности ковалентного присоединения компонентов, способных вступать в реакцию с аминами, таких как сложные эфиры N-гидроксисукцинимида (NHS). Альтернативы стандартным парам оснований ДНК или парам оснований РНК в олигонуклеотидах по настоящему изобретению могут обеспечить более высокую плотность в битах на кубический мм, более высокую безопасность (устойчивость к случайному или целенаправленному синтезу природных токсинов), более легкое распознавание для фотопрограммируемых полимераз

или более простую вторичную структуру. Такие альтернативные пары оснований, совместимые с природными и мутантными полимеразами для синтеза de novo и/или амплификации, описаны в работе Betz K, Malyshev DA, Lavergne T, Welte W, Diederichs K, Dwyer TJ, Ordoukhanian P, Romesberg FE, Marx A. Nat. Chem. Biol. 2012 Jul;8(7):612-4, которая включена в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Используемый в данном документе термин "полипептид" означает полимер из аминокислотных остатков (природных или неприродных), соединенных друг с другом чаще всего пептидными связями. Используемый в данном документе термин относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды могут включать генные продукты, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного. Полипептид может представлять собой одну молекулу или может представлять собой многомолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут включать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды, такие как антитела или инсулин, и могут быть ассоциированы или соединены. Чаще всего дисульфидные связи встречаются в многоцепочечных полипептидах. Термин полипептид может также применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты.

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

Используемое в данном документе выражение "псевдоспиральная структура" означает структуру высшего порядка кольцевого полирибонуклеотида, где по меньшей мере часть кольцевого полирибонуклеотида свернута в спиральную структуру.

Используемое в данном документе выражение "псевдодвухнитевая вторичная структура" означает структуру высшего порядка кольцевого полирибонуклеотида, где по

меньшей мере часть кольцевого полирибонуклеотида образует внутреннюю двойную нить.

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

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

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

Используемый в данном документе термин "участок поверхности" тела субъекта означает любой участок организма субъекта, который подвергается или может подвергнуться воздействию внешней среды. Участок поверхности тела субъекта, например тела млекопитающего, например тела человека, может предусматривать кожу, участки поверхности полости рта, полости носа, полости уха, желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, влагалища, шейки матки, внутриматочного пространства, мочевыводящего тракта и глаза. В некоторых случаях участок поверхности тела субъекта часто может относиться к внешнему участку, под которым располагаются эпителиальные клетки. Кожа, например, может представлять собой один тип участка поверхности, раскрытого в данном документе, и может состоять из эпидермиса и дермы, первый из которых образует самые наружные слои кожи и может включать организованное скопление эпителиальных клеток среди многих других типов клеток.

Используемый в данном документе термин "сдвигающий элемент" означает компонент, такой как нуклеотидная последовательность, который индуцирует рибосомальную паузу в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент представляет собой неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность -D(V/I)ExNPGP, где x = любая

аминокислота. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент может предусматривать химический компонент, такой как глицерин, линкерный компонент, отличный от нуклеиновой кислоты, химическую модификацию, модифицированную нуклеиновую кислоту или любую их комбинацию.

Используемый в данном документе термин "по сути свободный" представляет собой уровень содержания компонента в композиции, препарате или продукте или любом его промежуточном соединении, которое является ниже уровня содержания, необходимого для индукции биологического, химического, физического и/или фармакологического эффекта. В некоторых вариантах осуществления композиция, препарат или продукт являются по сути свободными от компонента, если уровень содержания компонента можно выявить только в следовых количествах, или уровень содержания является меньшим, чем уровень содержания, определяемый соответствующей методикой выявления (например, хроматографией (с применением колонки, с применением бумаги, с применением геля, с применением HPLC, с применением UHPLC и т. д., или с помощью IC, с помощью SEC, с помощью обращенной фазы, с помощью анионного обмена, с помощью смешанного режима и т. д.) или электрофореза (UREA PAGE, на основе чипа, полиакриламидного геля, РНК, капилляра, c-IEF и т. д.) с применением или без применения методологий дериватизации до или после разделения с применением методик выявления, основанных на масс-спектрометрии, спектрометрии в УФ-видимой области, флуоресценции, светорассеянии, показателе преломления или с применением окрашивания серебром или красителем, или радиоактивного распада для выявления. В качестве альтернативы, можно определить, является ли композиция, препарат или продукт по сути свободным от компонента, без использования технологий разделения с помощью масс-спектрометрии, микроскопии, спектроскопии кругового дихроизма (CD), спектрофотометрии в УФ- или УФ-видимой области, флуориметрии (например, Qubit), с помощью анализа с использованием РНКазы H, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или с помощью способов, в которых для выявления применяется окрашивание серебром или красителем, или радиоактивный распад).

Используемый в данном документе термин "в значительной степени устойчивый" означает что-либо, характеризующееся устойчивостью к эффектору, составляющей по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по сравнению с эталоном.

Используемый в данном документе термин "стерилизующее средство" означает любое средство, которое является бактериостатическим, бактерицидным и/или активно убивает микроорганизмы, инактивирует микроорганизмы или препятствует росту микроорганизмов. Стерилизующее средство, убивающее микроорганизмы, может быть антимикробным и/или антисептическим. В некоторых вариантах осуществления стерилизующее средство представляет собой жидкость, такую как спирт, йод или перекись водорода. В некоторых вариантах осуществления стерилизующим средством является УФ-излучение или лазерное излучение. В некоторых вариантах осуществления стерилизующее средство представляет собой нагревание, обеспечиваемое электричеством или с помощью других средств (например, пара, приведения в контакт).

Используемый в данном документе термин "стехиометрическая трансляция" означает по сути эквивалентную выработку продуктов экспрессии, образующихся в результате трансляции с кольцевого или линейного полирибонуклеотида. Например, для кольцевого или линейного полирибонуклеотида, содержащего две экспрессионные последовательности, стехиометрическая трансляция кольцевого или линейного полирибонуклеотида означает, что продукты экспрессии двух экспрессионных последовательностей представлены в по сути эквивалентных количествах, например разница между количествами двух экспрессионных последовательностей (например, молярная разница) может составлять приблизительно 0 или менее 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% или 20% или любого промежуточного процентного значения.

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

Используемый в данном документе термин "идентичность последовательностей" определяется с помощью выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с применением алгоритма глобального или локального выравнивания. Затем последовательности могут называться "по сути идентичными" или

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

"Сигнальная последовательность" относится к полипептидной последовательности, например, длиной от 10 до 30 аминокислот, которая присутствует на N-конце полипептидной последовательности растущего белка, который направляет полипептидную последовательность на секреторный путь.

Используемый в данном документе термин "мишень" относится к любому объекту, который содержит один или несколько эпитопов. Например, мишенью может являться химический компонент, компонент молекулы, молекула (например, аллерген или токсин), макромолекула (например, полипептид, нуклеиновая кислота или углевод), посттрансляционное состояние модификации макромолекулы (например, макромолекула, которая фосфорилирована, гликозилирована, ацилирована, алкилирована и т. п.), макромолекулярная структура более высокого порядка (например, комплекс двух или больше полипептидов), клетка (например, раковая клетка), часть клетки (например, опухолевый антиген), рецептор на поверхности клетки, патоген (например, вирус или часть вируса; бактерия или часть бактерии; гриб или часть грибка, или паразит или часть паразита), или тип ткани.

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

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

Используемый в данном документе термин "местная доставка" означает доставку вещества на кожу или в эпителиальный слой, доступный с помощью неинвазивных средств, например, в эпителий кишечника и другого эпителия желудочно-кишечного тракта (GI) или эпителий влагалища. Местная доставка фармацевтической композиции может оказывать местный фармакодинамический эффект на субъекта, например, местно доставляемая фармацевтическая композиция оказывает фармакодинамический эффект на конкретную часть организма (например, кожу) или вблизи нее, куда доставляется фармацевтическая композиция. В некоторых других вариантах осуществления описанная в данном документе местная доставка фармацевтической композиции применяется только для обозначения способа доставки (местно, например, на определенный участок поверхности тела), тогда как фармацевтическая композиция может оказывать местный или системный фармакодинамический эффект. Например, фармацевтическая композиция может либо оставаться локально в месте введения или вблизи него, либо может поступать в систему кровообращения (например, в кровь или лимфатическую систему) организма субъекта, по которой фармацевтическая композиция может транспортироваться в отдаленные части организма, которые обычно недоступны для фармацевтической композиции посредством других путей, кроме систем кровообращения.

Используемый в данном документе термин "общие рибонуклеотидные молекулы" означает общее количество любых рибонуклеотидных молекул, включая молекулы линейных полирибонуклеотидов, молекулы кольцевых полирибонуклеотидов,

мономерные рибонуклеотиды, другие полирибонуклеотидные молекулы, их фрагменты и их модифицированные варианты, согласно измерению общей массы рибонуклеотидных молекул.

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

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

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1A – 1B представляют собой схемы иллюстративных кольцевых РНК, которые содержат две экспрессионные последовательности, где каждая экспрессионная последовательность кодирует либо иммуноген, либо адъювант. **На фиг. 1A** изображен кольцевой полирибонуклеотид, который содержит две открытые рамки считывания (ORF), при этом каждая ORF кодирует экспрессионную последовательность, где каждая ORF функционально связана с IRES. **На фиг. 1B** изображен кольцевой полирибонуклеотид, который содержит две экспрессионные последовательности, отделенные последовательностью 2A, и при этом все они функционально связаны с IRES.

На фиг. 2 показана схема кольцевой РНК, которая содержит ORF, которая кодирует иммуноген, и полинуклеотидную адъювантную последовательность (например, нуклеотидную последовательность, которая стимулирует врожденную иммунную систему).

На фиг. 3 показана схема множества полирибонуклеотидов, где каждый полинуклеотид содержит ORF, который кодирует либо иммуноген, либо адъювант.

На фиг. 4 показано, что иммуноген, представляющий собой RBD, кодируемый кольцевой РНК, был выявлен в фибробластах BJ и клетках HeLa и не был выявлен в фибробластах BJ и клетках HeLa с контролем, представляющим собой среду-носитель.

На фиг. 5 показано, что устойчивый ответ в виде антител к RBD достигался после введения кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, составленной с катионным полимером (например, протамином), в мышиной модели.

На **фиг. 6** показано, что ответ в виде антител к шиповидному белку достигался после введения кольцевой РНК, кодирующей антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, составленной с катионным полимером (например, протамином), в мышиной модели.

На **фиг. 7** показаны уровни антител к RBD, относящихся к изотипам IgG2a и IgG1, которые были получены после введения кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, составленной с катионным полимером (например, протамином), в мышиной модели.

На фиг. 8 показана экспрессия белка из кольцевой РНК *in vivo* в течение продолжительных периодов времени после внутримышечной инъекции препаратов на основе кольцевой РНК (составленной с Trans-IT, составленной с протамином, не составленной), только среды-носителя в виде протамина и у контрольных мышей, не подвергавшихся инъекциям.

На фиг. 9 показана экспрессия белка из кольцевой РНК *in vivo* в течение продолжительных периодов времени после одновременной внутримышечной доставки адъюванта Addavax™ с (i) препаратами на основе несоставленной кольцевой РНК (левый график), (ii) кольцевой РНК, составленной с TransIT (средний график), и (iii) кольцевой РНК, составленной с протамином (правый график). В каждом случае адъювант Addavax™ доставляли в виде отдельной инъекции в моменты времени 0 и 24 ч.

На фиг. 10 показана экспрессия белка из кольцевой РНК *in vivo* в течение продолжительных периодов времени после внутрикожной доставки (i) кольцевой РНК, составленной с протамином, (ii) кольцевой РНК, составленной с протамином, с инъекцией адъюванта Addavax™ через 24 часа, (iii) только среды-носителя в виде протамина и (iv) у контрольных мышей, не подвергавшиеся инъекциям.

На фиг. 11 показано связывание зондов с кольцевой и линейной РНК и последующее разрушение РНК с помощью РНКазы H. Кольцевая РНК выявляется в виде одной полосы линейной РНК, полученной в результате расщепления, в отличие от линейной и конкатемерной РНК, которые выявляются в виде нескольких полос. Разрушение выявляли, помещая образцы полиакриламидный гель в денатурирующих условиях и сравнивая полосы разрушения с добавлением или без добавления РНКазы H.

На фиг. 12 показано содержание линейной РНК, определенное количественно в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях путем сравнения интенсивности полосы линейной РНК со стандартом линейной РНК.

На фиг. 13 показано количественное определение РНК, экстрагированной из разных полос полиакриламидного геля в денатурирующих условиях.

На фиг. 14 показана активность люциферазы Gaussia в клетках через 6, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после трансфекции в экспериментах с применением кольцевой РНК с чистотой 84%, кольцевой РНК с чистотой 71% и только среды-носителя.

На фиг. 15 показано, что клетки, трансфицированные очищенным в геле препаратом на основе кольцевой РНК, показали только минимальную экспрессию генов врожденного иммунитета, таких как RIG-I, MDA-5, OAS и IFN-B, по сравнению с клетками, трансфицированными как комбинированной кольцевой РНК, так и линейной эквивалентной РНК, которые продемонстрировали повышение уровня экспрессии этих генов врожденного иммунитета дозозависимым образом.

Фиг. 16 представляет собой изображение, на котором показан белковый блот продуктов экспрессии с кольцевой РНК или линейной РНК со сдвигающим элементом.

На фиг. 17 показано получение иллюстративной кольцевой РНК посредством самосплайсинга.

На фиг. 18 проиллюстрирован пример, в котором иллюстративные как линейные, так и кольцевые РНК доставляли местно на кожу уха мышей, и уровни их РНК в ткани уха исследовали на протяжении периода, составляющего от 6 часов до 3 дней, после периода доставки.

Фиг. 19A и 19B представляют собой графики, обобщающие результаты qPCR по образцам тканей, взятым с помощью перфорирования ушей мышей через 6 часов, 1 день, 3 дня или 12 дней после местной доставки линейных или кольцевых РНК с помощью Boost (этанол). **На фиг. 19A** показаны результаты анализов qPCR с применением праймеров для выявления как линейных, так и кольцевых РНК. **На фиг. 19B** показаны результаты анализов qPCR с применением праймеров для выявления кольцевой РНК, но не линейной РНК.

На фиг. 20 показаны флуоресцентные изображения (черно-белые) местного введения circRNA-Cy5, что приводит в результате к доставке РНК в ткань.

На фиг. 21 показана количественная оценка флуоресцентных изображений местного применения circRNA-Cy5, что приводит в результате к доставке РНК в ткань.

На фиг. 22 показано, что местное введение кольцевой РНК приводит в результате к доставке РНК в ткани в день 1 и день 4 после введения, если перед нанесением ткань обрабатывают салфеткой, пропитанной этанолом.

На фиг. 23 показано, что местное введение кольцевой РНК приводит в результате к доставке РНК в ткани в день 1 и день 4 после введения, если перед нанесением ткань обрабатывают салфеткой, пропитанной изопропиловым спиртом.

На фиг. 24 показано, что местное введение circRNA приводит в результате к доставке РНК в ткани, если circRNA вводят с 10% этанолом.

На фиг. 25 представляет собой изображение, на котором показан белковый блот продуктов экспрессии с кольцевой РНК или линейной РНК.

На фиг. 26 показаны экспериментальные данные, демонстрирующие повышенную устойчивость экспрессии люциферазы Gaussia у мышей после повторного введения доз кольцевого полирибонуклеотида ("замкнутого") по сравнению с аналогом, представляющим собой линейный полирибонуклеотид ("линейный").

На фиг. 27 показаны экспериментальные данные, демонстрирующие повышенную устойчивость экспрессии люциферазы Gaussia у мышей после введения доз в шахматном порядке кольцевого полирибонуклеотида ("3 дозы замкнутого полирибонуклеотида") по сравнению с введением доз в шахматном порядке аналога, представляющего собой линейный полирибонуклеотид ("3 дозы линейного полирибонуклеотида"), или однократной дозы кольцевого полирибонуклеотида ("замкнутый"), или однократной дозы аналога, представляющего собой линейный полирибонуклеотид ("линейный").

На фиг. 28 показаны экспериментальные данные, демонстрирующие повышенную устойчивость экспрессии люциферазы Gaussia у мышей после введения однократной дозы кольцевого полирибонуклеотида ("замкнутая РНК") по сравнению с введением однократной дозы аналога, представляющего собой линейный полирибонуклеотид ("линейная РНК"), после введения в шахматном порядке доз линейного аналога полирибонуклеотида ("3 дозы линейной РНК") по сравнению с введением однократной дозы ("линейная РНК"), или после введения доз в шахматном порядке кольцевого полирибонуклеотида ("3 дозы замкнутой РНК") по сравнению с введением однократной дозы ("замкнутая РНК").

На фиг. 29 показано, что кольцевой полирибонуклеотид при введении внутримышечно без носителя обеспечивал экспрессию белка *in vivo* в течение продолжительных периодов времени, при этом указаны уровни активности белка в плазме крови в разные дни после инъекции.

На фиг. 30 показано, что кольцевой полирибонуклеотид при введении внутривенно обеспечивал экспрессию белка *in vivo* в течение продолжительных периодов времени, при этом указаны уровни активности белка в плазме крови в разные дни после инъекции, и при этом его можно повторно вводить по меньшей мере 5 раз.

На фиг. 31A показана экспрессия множества иммуногенов с кольцевого полирибонуклеотида. Экспрессию иммуногена, представляющего собой RBD, выявляли из кольцевых РНК, кодирующих иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2 и полипептид GLuc.

На фиг. 31B показана экспрессия множества иммуногенов с кольцевого полирибонуклеотида. Активность GLuc была выявлена в случае кольцевых РНК, кодирующих иммуноген, представляющий собой RBD SARSs-CoV-2, и полипептид GLuc.

На фиг. 32A показана иммуногенность нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в мышиной модели. Мышей вакцинировали первой кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей полипептид GLuc. Антитела к RBD получали через 17 дней после инъекции.

На фиг. 32B показана иммуногенность нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в мышиной модели. Мышей вакцинировали первой кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей полипептид GLuc. Активность GLuc была выявлена через 2 дня после инъекции.

На фиг. 33A показана иммуногенность нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в мышиной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой гемагглютинин (HA) вируса гриппа. Антитела к RBD получали через 17 дней после инъекции.

На фиг. 33B показана иммуногенность нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в мышиной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой гемагглютинин (HA) вируса гриппа. Антитела к HA получали через 17 дней после инъекции.

На фиг. 34A показана иммуногенность нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в мышиной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой гемагглютинин

(HA) вируса гриппа. Антитела к RBD (домену шиповидного белка) получали через 17 дней после инъекции.

На фиг. 34B показана иммуногенность нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в мышиной модели. Мышей вакцинировали с помощью первой кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, и второй кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой гемагглютинин (HA) вируса гриппа. Антитела к HA получали через 17 дней после инъекции.

На фиг. 35 показан ответ в виде выработки антител к HA у мышей, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую несколько иммуногенов. Мышам вводили кольцевую РНК, кодирующую: иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа, иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа, иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и полипептид GLuc, или иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2. Анализ ингибирования гемагглютинации (HAI) применяли для измерения уровня антител к HA вируса гриппа. На фиг. 24 показан титр HAI в образцах, где вводили препараты на основе кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа, при их введении отдельно или при введении в комбинации с иммуногенами SARS-CoV-2, например RBD или шиповидным белком.

На фиг. 36 показана активность люциферазы Gaussia (Gluc) у мышей через 2 дня после примирования с помощью: (i) кольцевой РНК, кодирующей полипептид Gluc, или (ii) комбинации первой кольцевой РНК, кодирующей полипептид Gluc, и второй кольцевой РНК, кодирующей иммуноген RBD SARS-CoV-2, или (iii) кольцевой РНК, кодирующей как полипептид Gluc, так и иммуноген RBD SARS-CoV-2.

На фиг. 37A показан ответ антител к RBD у мышей через 14 дней после примирования с помощью: (i) кольцевой РНК, кодирующей иммуноген RBD SARS-CoV-2, или (ii) комбинации первой кольцевой РНК, кодирующей полипептид Gluc, и второй кольцевой РНК, кодирующей иммуноген RBD SARS-CoV-2, или (iii) кольцевой РНК, кодирующей как полипептид Gluc, так и иммуноген RBD SARS-CoV-2.

На фиг. 37B показаны нейтрализующие антитела к RBD, оцененные с помощью реакции нейтрализации бляшкообразования (PRNT) у мышей, которым вводили: (i) кольцевой РНК, кодирующей иммуноген RBD SARS-CoV-2, или (ii) комбинации первой

кольцевой РНК, кодирующей полипептид Gluc, и второй кольцевой РНК, кодирующей иммуноген RBD SARS-CoV-2, или (iii) кольцевой РНК, кодирующей как полипептид Gluc, так и иммуноген RBD SARS-CoV-2.

На фиг. 38 показано, что кольцевая РНК, кодирующая полипептид Gluc и иммуноген RBD SARS-CoV-2, инициирует RBD-специфические Т-клеточные ответы, как определено с помощью анализа ELISpot.

На фиг. 39 показано, что IL-12, измеренный с применением специфичного к IL-12 ELISA, экспрессировался из кольцевой РНК в клетках млекопитающих. Кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, включали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 40A показано, что экспрессия IL-12 была обнаружена в сыворотке крови через 2 дня после инъекции препарата на основе кольцевой РНК, содержащего первую кольцевую РНК, кодирующую IL-12, и вторую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, на мышиной модели. Инъекции PBS или препарата, содержащего только кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, включали в качестве контролей.

На фиг. 40B показано, что увеличение уровня IFN-γ в сыворотке крови (непосредственно после передачи сигнала IL12) было обнаружено в сыворотке крове через 2 дня после инъекции препарата на основе кольцевой РНК, содержащего первую кольцевую РНК, кодирующую IL-12, и вторую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, на мышиной модели. Инъекции PBS или препарата, содержащего только кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, включали в качестве контролей.

На фиг. 41A показано, что введение препарата на основе кольцевой РНК, содержащего первую кольцевую РНК, кодирующую IL-12, и вторую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, увеличивало число CD4 Т-клеток, специфических к RBD SARS-CoV-2. Введение PBS или препарата, содержащего только кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, включали в качестве контролей. Звездочки обозначают статистическую значимость, определенную с помощью двустороннего RM ANOVA, защищенного апостериорным тестом Тьюки.

На фиг. 41B показано, что введение препарата на основе кольцевой РНК, содержащего первую кольцевую РНК, кодирующую IL-12, и вторую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, не приводило к изменению числа CD8 Т-клеток, специфических к RBD. Введение PBS или препарата, содержащего только

кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, включали в качестве контролей.

На фиг. 41C показано, что введение препарата на основе кольцевой РНК, содержащего первую кольцевую РНК, кодирующую IL-12, и вторую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, увеличивало величину выработки IFN-γ CD4 Т-клетками. Введение PBS или препарата, содержащего только кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, включали в качестве контролей. Звездочки обозначают статистическую значимость, определенную с помощью непарного t-критерия.

На фиг. 41D показано, что введение препарата на основе кольцевой РНК, содержащего первую кольцевую РНК, кодирующую IL-12, и вторую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, увеличивало величину выработки IFN-γ CD8 Т-клетками. Введение PBS или препарата, содержащего только кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, включали в качестве контролей. Звездочки обозначают статистическую значимость, определенную с помощью непарного t-критерия.

На фиг. 42 показано, что кольцевая РНК, экспрессирующая овальбумин (OVA), в комбинации с кольцевой РНК, экспрессирующей IL12, индуцирует более сильный ответ CD8 Т-клеток по сравнению с контролем (кольцевая РНК, экспрессирующая только OVA). Это демонстрирует, что кольцевая РНК, экспрессирующая IL12, действует как адъювант.

Подробное описание

В настоящем изобретении представлены композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых или линейных полирибонуклеотидов, кодирующих один или несколько полипептидных иммуногенов, и пути их применения. В частности, в изобретении представлены кольцевые или линейные полирибонуклеотиды, кодирующие несколько иммуногенов, кольцевые или линейные полирибонуклеотиды, кодирующие по меньшей мере один иммуноген и дополнительно кодирующие по меньшей мере один адъювант, и иммуногенные композиции, содержащие несколько кольцевых или линейных полирибонуклеотидов. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции и препараты, содержащие один или несколько кольцевых или линейных полирибонуклеотидов, кодирующих один или несколько иммуногенов. Композиции и фармацевтические препараты на основе кольцевых или линейных полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, могут индуцировать иммунный ответ у субъекта при введении. Композиции и фармацевтические препараты на основе

кольцевых или линейных полирибонуклеотидов, описанные в данном документе, можно применять для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

Полирибонуклеотиды

Полирибонуклеотид предусматривает элементы, которые описаны ниже, а также в дополнение к одному или нескольким иммуногенам, которые описаны в данном документе. В конкретных вариантах осуществления полирибонуклеотид представляет собой кольцевой полирибонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид) содержит по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 75 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 200 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 300 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 400 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 1000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 2000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 5000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 6000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 7000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 8000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 9000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 10000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 12000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 14000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 15000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 16000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 17000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 18000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 19000 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 20000 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид) может иметь размер, достаточный для размещения сайта связывания с рибосомой. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида может быть настолько большим, насколько позволяют технические ограничения получения кольцевого полирибонуклеотида и/или применения кольцевого полирибонуклеотида. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают возможным, что из ДНК могут быть получены несколько сегментов РНК, и их свободные

5'- и 3'-концы могут быть отожжены с образованием "нити" РНК, которая в конечном итоге может подвергаться циркуляризации, когда остается только один свободный 5'- и один свободный 3'-конец. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида может быть ограничен способностью к упаковке и доставке РНК к мишени. В некоторых вариантах осуществления размер кольцевого полирибонуклеотида представляет собой длину, достаточную для кодирования полезных полипептидов, таких как иммуногены или их эпитопы по настоящему изобретению, и, таким образом, значения длины, составляющие по меньшей мере 20000 нуклеотидов, по меньшей мере 15000 нуклеотидов, по меньшей мере 10000 нуклеотидов, по меньшей мере 7500 нуклеотидов, или по меньшей мере 5000 нуклеотидов, по меньшей мере 4000 нуклеотидов, по меньшей мере 3000 нуклеотидов, по меньшей мере 2000 нуклеотидов, по меньшей мере 1000 нуклеотидов, по меньшей мере 500 нуклеотидов, по меньшей мере 400 нуклеотидов, по меньшей мере 300 нуклеотидов, по меньшей мере 200 нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов или по меньшей мере 70 нуклеотидов, могут быть применимыми. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида представляет собой длину, достаточную для кодирования одного или нескольких иммуногенов (например, двух или больше, трех или больше, четырех или больше и пяти или больше). В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида представляет собой длину, достаточную для кодирования от двух до пяти (например, трех, четырех и пяти) иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида представляет собой длину, достаточную для кодирования иммуногена и адъюванта. В некоторых вариантах осуществления максимальный размер кольцевого полирибонуклеотида представляет собой длину, достаточную для кодирования одного или нескольких иммуногенов (например, двух или больше, трех или больше и четырех или больше) и одного или нескольких адъювантов (например, двух или больше, трех или больше и четырех или больше).

Элементы кольцевого полирибонуклеотида

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько элементов, описанных в данном документе, в дополнение к содержанию последовательности, кодирующей иммуноген. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(А), отсутствует свободный 3'-конец, отсутствует мотив распознавания РНК-

полимеразой или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид предусматривает любой признак или любую комбинацию признаков, описанных в международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Иммуногены

Кольцевые или линейные полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере одну последовательность, кодирующую иммуноген, и необязательно дополнительно содержат по меньшей мере одну последовательность, кодирующую адъювант. Иммуноген содержит один или несколько эпитопов, которые распознаются антителом или Т-клеточным рецептором, на которые нацелены антитело или Т-клеточный рецептор или которые связываются с антителом или Т-клеточным рецептором. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, например, непрерывную последовательность нуклеиновых кислот или аминокислот. Эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, например, эпитоп, который содержит аминокислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации белка. Конформационный эпитоп может содержать несмежные аминокислоты из первичной аминокислотной последовательности. В качестве другого примера конформационный эпитоп включает нуклеиновые кислоты, которые образуют эпитоп в свернутой конформации иммуногенной последовательности на основе ее вторичной или третичной структуры.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген предусматривает целый белок, пептид, гликопротеин, липопротеин, фосфопротеин, рибонуклеопротеин, углевод (например, полисахарид), липид (например, фосфолипид или триглицерид) или нуклеиновую кислоту (например, ДНК, РНК) или их часть.

В других вариантах осуществления иммуноген предусматривает белковый иммуноген или эпитоп (например, пептидный иммуноген или пептидный эпитоп из белка, гликопротеина, липопротеина, фосфопротеина или рибонуклеопротеина). Иммуноген может предусматривать аминокислоту, сахар, липид, фосфорильную или сульфонильную группу или их комбинацию.

В конкретном варианте осуществления иммуноген представляет собой полипептидный иммуноген.

Полипептидный иммуноген может предусматривать посттрансляционную модификацию, например гликозилирование, убиквитинирование, фосфорилирование,

нитрозилирование, метилирование, ацетилирование, амидирование, гидроксилирование, сульфатирование или липидизацию.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген предусматривает эпитоп, содержащий по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30 аминокислот или больше. В некоторых вариантах осуществления эпитоп предусматривает или содержит по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30 аминокислот или меньше. В некоторых вариантах осуществления эпитоп предусматривает или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит 5 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может представлять собой от приблизительно 8 до приблизительно 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может представлять собой от приблизительно 9 до приблизительно 22 аминокислот.

Иммуногены могут предусматривать иммуногены, распознаваемые В-клетками, иммуногены, распознаваемые Т-клетками, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления иммуногены предусматривают иммуногены, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления иммуногены представляют собой иммуногены, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления иммуногены предусматривают иммуногены, распознаваемые Т-клетками. В некоторых вариантах

осуществления иммуногены представляют собой иммуногены, распознаваемые Т-клетками.

Эпитопы могут предусматривать эпитопы, распознаваемые В-клетками, эпитопы, распознаваемые Т-клетками, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления эпитопы предусматривают эпитопы, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления эпитопы представляют собой эпитопы, распознаваемые В-клетками. В некоторых вариантах осуществления эпитопы предусматривают эпитопы, распознаваемые Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления эпитопы представляют собой эпитопы, распознаваемые Т-клетками.

Методы идентификации иммуногенов и эпитопов *in silico* были раскрыты, например, в работе Sanchez-Trincado JL, et al. (Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction, J. Immunol. Res., 2017:2680160. doi: 10.1155/2017/2680160 (2017)); Grifoni, A, et al. (A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2, Cell Host Microbe, 27(4):671-680 (2020)); Russi RC et al. (In silico prediction of epitopes recognized by T cells and B cells in PmpD: First step towards to the design of a Chlamydia trachomatis vaccine, Biomedical J., 41(2):109-117 (2018)); Baruah V, et al. (Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV, J. Med. Virol., 92(5), doi: 10.1002/jmv.25698 (2020)); каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген предусматривает полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления иммуноген предусматривает РНК. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления иммуноген предусматривает ДНК. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодируется кольцевым или линейным полирибонуклеотидом.

Кольцевой или линейный полирибонуклеотид по настоящему изобретению предусматривает или кодирует любое количество иммуногенов. В конкретном варианте осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по

меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120, по меньшей мере 140, по меньшей мере 160, по меньшей мере 180, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500 или больше иммуногенов.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует, например, не более 1, не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не более 10, не более 15, не более 20, не более 25, не более 30, не более 40, не более 50, не более 60, не более 70, не более 80, не более 90, не более 100, не более 120, не более 140, не более 160, не более 180, не более 200, не более 250, не более 300, не более 350, не более 400, не более 450, не более 500 или меньше иммуногенов.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 , 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 иммуногенов.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодируют множество иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует от 1 до 100 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует от 1 до 50 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует от 1 до 10 иммуногенов; например, кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодирует 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует 2 иммуногена. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует 3 иммуногена. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует 4 иммуногена. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид предусматривает или кодирует 5 иммуногенов.

В некоторых вариантах осуществления каждый из множества иммуногенов идентифицирует одну и ту же мишень. Другими словами, одна мишень может

предусматривать каждый из множества иммуногенов, каждый из множества иммуногенов может быть получен из одной и той же мишени, и/или каждый из множества иммуногенов может характеризоваться высокой степенью сходства со всей мишенью или ее частью. Например, мишенью может быть клетка, и каждый из иммуногенов может соответствовать белку этой клетки. Например, мишенью может быть конкретная раковая клетка, и каждый из иммуногенов может соответствовать опухолевому антигену, ассоциированному с этим типом рака. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления каждый из множества иммуногенов происходит из отличающихся белков одной и той же мишени.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов происходит из отличающихся мишеней. В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов может происходить из различных капсидных белков данного вируса. Например, один иммуноген может происходить из рода Orthopoxvirus, другой иммуноген может происходить из рода Hepadnavirus, и третий иммуноген может происходить из рода Flavivirus. Например, полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый иммуноген происходит из вируса желтой лихорадки, вируса Чикунгунья, Зика, гепатита А или гепатита В. Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген из каждого из вирусов желтой лихорадки, вируса Чикунгунья, Зика, гепатита А и гепатита В. Полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый иммуноген происходит из вируса японского энцефалита, вируса Чикунгунья, Зика, гепатита А или гепатита В. Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген из каждого из вируса японского энцефалита, вируса Чикунгунья, Зика, гепатита А и гепатита В. Полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый иммуноген происходит из SARS-CoV2, поксвируса, респираторно-синцитиального вируса или вируса папилломы человека. Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген от каждого из SARS-CoV2, поксвируса, респираторно-синцитиального вируса и вируса папилломы человека. Полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый из иммуногенов происходит от вируса герпеса (CMV, EBV или VZV). Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген из каждого из следующих вирусов герпеса: CMV, EBV или VZV. Полирибонуклеотид может кодировать несколько иммуногенов, где каждый иммуноген происходит из вируса опоясывающего лишая или вируса лихорадки Западного Нила. Полирибонуклеотид может кодировать иммуноген каждого из вирусов опоясывающего лишая и вируса лихорадки Западного Нила.

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов характеризуются по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности. В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов также характеризуются менее чем 100% идентичностью последовательности. Это может указывать на иммуногены, связанные друг с другом генетическим дрейфом, таким образом, одна циклическая или линейная композиция на основе полирибонуклеотида или иммуногенная композиция могут быть способны индуцировать иммунный ответ на мишень, которая существует в популяции в различных мутационных состояниях, или может индуцировать иммунный ответ на несколько мишеней, содержащих один и тот же иммуноген, если иммуноген связан с генетическим дрейфом. Например, иммуногены могут быть связаны друг с другом генетическим дрейфом вируса-мишени. В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов может быть получено из рецептор-связывающих доменов (RBD) уникальных, но родственных вирусов.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодирует варианты иммуногена. Варианты могут представлять собой встречающиеся в природе варианты (например, варианты, идентифицированные в данных о последовательностях, полученных от разных родов, видов, изолятов или квазивидов вируса) или могут представлять собой производные последовательности, раскрытые в данном документе, которые были образованы *in silico* (например, иммуногены или эпитопы с одной или несколькими аминокислотными вставками, делециями, заменами или их комбинациями по сравнению с иммуногеном или эпитопом дикого типа).

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

В некоторых вариантах осуществления иммуноген происходит из одного из следующих вирусов.

Ортомиксовирус. Пригодные иммуногены могут представлять собой белки из вируса гриппа A, B или C, такие как гемагглютинин, нейраминидаза или белки матрикса M2. Если иммуноген представляет собой гемагглютинин вируса гриппа A, он может представлять собой гемагглютинин из любого подтипа, например, HI, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 или H16.

Вирусы семейства Paramyxoviridae. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из пневмовирусов (например, респираторно-синцитиального вируса (RSV)), рубулавирусов (например, вируса эпидемического паротита), парамиксовирусов (например, вируса парагриппа), метапневмовирусов и морбилливирусов (например, вируса кори), генипавирусов (например, вируса Нипах).

Семейство Poxviridae. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из вируса рода Orthopoxvirus, такого как Variola vera, включая без ограничения Variola major и Variola minor.

Пикорнавирусы. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из пикорнавирусов, таких как энтеровирусы, риновирусы, гепарнавирусы, кардиовирусы и афтовирусы. В одном варианте осуществления энтеровирус представляет собой полиовирус, например полиовирус типа 1, типа 2 и/или типа 3. В другом варианте осуществления энтеровирус представляет собой энтеровирус EV71. В другом варианте осуществления энтеровирус представляет собой вирус Коксаки A или B.

Буньявирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из ортобуньявируса, такого как вирус калифорнийского энцефалита, флебовируса, такого как вирус лихорадки долины Рифт, или найровируса, такого как вирус конго-крымской геморрагической лихорадки.

Гепарнавирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из гепарнавируса, такого как вирус гепатита A (HAV).

Филовирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из филовируса, такого как вирус Эбола (включая эболавирус Заир, Кот-д'Ивуар, Рестон или Судан) или вирус Марбург.

Тогавирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из тогавируса, такого как рубивирус, альфавирус или артеривирус. К ним относится вирус краснухи.

Флавивирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из флавивирусов, таких как вирус клещевого энцефалита

(TBE), вирус денге (типы 1, 2, 3 или 4), вирус желтой лихорадки, вирус японского энцефалита, вирус Кьясанурского леса, вирус энцефалита Западного Нила, вирус энцефалита Сент-Луис, вирус русского весенне-летнего энцефалита, вирус энцефалита Повассан, вирус Зика.

Пестивирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из пестивирусов, таких как вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV), вирус классической чумы свиней (CSFV) или вирус пограничной болезни овец (BDV).

Гепаднавирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из гепаднавируса, такого как вирус гепатита B. Иммуноген вируса гепатита B может представлять собой поверхностный иммуноген вируса гепатита B (HBsAg).

Другие вирусы гепатита. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из вируса гепатита C, вируса гепатита дельта, вируса гепатита E или вируса гепатита G.

Рабдовирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из рабдовируса, такого как лиссавирус (например, вирус бешенства) и везикуловирус (VSV).

Семейство Caliciviridae. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из вирусов семейства Caliciviridae, таких как вирус Норуолк (норовирус), и вирусы, подобные вирусу Норуолк, такие как вирус Гавайи и вирус Снежных гор.

Ретровирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из онковируса, лентивируса (например, HIV-1 или HIV-2) или спумавируса.

Реовирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из ортореовируса, ротавируса, орбивируса или колтивируса.

Парвовирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из парвовируса B19.

Бокавирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из бокавируса.

Герпесвирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из вируса герпеса человека, такие как, только в качестве примера, вирусы простого герпеса (HSV) (например, HSV типов 1 и 2), вирус ветряной

оспы (VZV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV), вирус герпеса человека 6 (HHV6), вирус герпеса человека 7 (HHV7) и вирус герпеса человека 8 (HHV8).

Паповавирусы. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из папилломавирусов и полиомавирусов. Папилломавирус (человека) может представлять собой папилломавирус серотипа 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 или 65, например, одного или нескольких серотипов 6, 11, 16 и/или 18.

Ортохантавирусы. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из хантавирусов.

Аренавирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из вируса Гуанарито, вируса Хунин, вируса Ласса, вируса Лухо, вируса Мачупо, вируса Сабиа или вируса Уайтуотер-Арройо.

Аденовирус. Вирусные иммуногены включают иммуногены, происходящие из аденовируса серотипа 36 (Ad-36).

Внебольничные респираторные вирусы. Вирусные иммуногены предусматривают иммуногены, происходящие из внебольничных респираторных вирусов.

Коронавирус. Вирусные иммуногены предусматривают без ограничения иммуногены, происходящие из коронавируса SARS (например, SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2), коронавируса MERS, инфекционного бронхита птиц (IBV), вируса гепатита мышей (MHV) и вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (TGEV). Иммуноген коронавируса может представлять собой шиповидный полипептид или рецептор-связывающий домен (RBD) шиповидного белка. Иммуноген коронавируса может также представлять собой полипептид оболочки, мембранный полипептид или нуклеокапсидный полипептид.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген получен из вируса, который инфицирует рыбу. В некоторых вариантах осуществления иммуноген вызывает иммунный ответ в отношении вируса, который инфицирует рыбу. Например, вирус, который инфицирует рыбу, выбран из вируса инфекционной анемии лосося (ISAV), вируса болезни поджелудочной железы лосося (SPDV), вируса инфекционного панкреонекроза (IPNV), вируса американского проточного сома (CCV), вируса лимфоцистоза рыб (FLDV), вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV), герпесвируса кои, пикорнаподобного вируса лососевых (также известного как пикорнаподобный вирус атлантического лосося), вируса пресноводного лосося (LSV), ротавируса атлантического лосося (ASR), вируса земляничного заболевания форели

(TSD), вируса опухоли кижуча (CSTV) или вируса вирусной геморрагической септицемии (VHSV).

В некоторых вариантах осуществления иммуноген получен из клетки субъекта-хозяина. Например, антитела, которые блокируют проникновение вируса, могут быть получены с применением иммуногена или эпитопа из компонента клетки-хозяина, который вирус использует в качестве фактора проникновения.

Иммуноген получен, например, из бактерий, например бактериальный поверхностный белок, бактериальный мембранный белок, бактериальный белок оболочки, бактериальный белок внутренней мембраны, бактериальный белок наружной мембраны, бактериальный периплазматический белок, бактериальный белок проникновения, бактериальный белок слияния с мембраной, бактериальный структурный белок, бактериальный неструктурный белок, секретируемый бактериальный белок, белок, представляющий собой бактериальную полимеразу, бактериальная ДНК-полимераза, бактериальная РНК-полимераза, бактериальная протеаза, бактериальный гликопротеин, бактериальный фактор транскрипции, бактериальный фермент или бактериальный токсин.

В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ вызывает иммуноген из одной из следующих бактерий: *Streptococcus agalactiae* (также известная как стрептококк группы B или GBS)); *Streptococcus pyogenes* (также известная как стрептококк группы A (GAS)); *Staphylococcus aureus*; метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA); *Staphylococcus epidermis*; *Treponema pallidum*; *Francisella tularensis*; Rickettsia species; *Yersinia pestis*; *Neisseria meningitidis*. Иммуногены включают без ограничения мембранные белки, такие как адгезины, аутотранспортеры, токсины, белки усвоения железа и белок, связывающий фактор H; *Streptococcus pneumoniae*; *Moraxella catarrhalis*; *Bordetella pertussis*. Иммуногены включают без ограничения коклюшный токсин или анатоксин (PT), филаментозный гемагглютинин (FHA), пертактин и агглютиногены 2 и 3; Clostridium tetani: типичным иммуногеном является столбнячный анатоксин; *Cornynebacterium diphtheriae*: типичным иммуногеном является дифтерийный анатоксин; *Haemophilus influenzae*; *Pseudomonas aeruginosa*; Chlamydia trachomatis; Chlamydia pneumoniae; Helicobacter pylori; Escherichia coli (иммуногены включают без ограничения иммуногены, происходящие из энтеротоксигенной *E. coli* (ETEC), энтероагрегационной *E. coli* (EAggEC), диффузно адгезирующей *E. coli* (DAEC), энтеропатогенной *E. coli* (EPEC), внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC) и/или энтерогеморрагической *E. coli* (EHEC)). Штаммы ExPEC включают уропатогенную *E. coli* (UPEC) и *E. coli*, ассоциированную с менингитом/сепсисом (MNEC). Также включены *Bacillus anthracis*; Clostridium perfringens

или *Clostridium botulinums*; *Legionella pneumophila*; *Coxiella burnetiid*; виды *Brucella*, такие как *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis* и *B. pinnipediae*, виды Francisella, такие как *F. novicida*, *F. philomiragia* и *F. tularensis*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Haemophilus ducreyi*; *Enterococcus faecalis* или *Enterococcus faecium*; *Staphylococcus saprophyticus*; *Yersinia enterocolitica*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Listeria monocytogenes*; *Vibrio cholerae*; *Salmonella typhi*; *Borrelia burgdorferi*; *Porphyromonas gingivalis* и виды Klebsiella.

Иммуноген получен, например, из гриба, например поверхностный белок гриба, мембранный белок гриба, белок оболочки гриба, белок внутренней мембраны гриба, белок наружной мембраны гриба, периплазматический белок гриба, белок проникновения гриба, белок слияния с мембраной гриба, структурный белок гриба, неструктурный белок гриба, секретируемый белок гриба, белок, представляющий собой полимеразу гриба, ДНК-полимераза гриба, РНК-полимераза гриба, протеаза гриба, гликопротеин гриба, фактор транскрипции гриба, фермент гриба или токсин гриба.

В некоторых вариантах осуществления грибковый иммуноген получают из дерматофитов, включая: *Epidermophyton floccusum*, *Microsporum audouini, Microsporum canis, Microsporum distortum, Microsporum equinum, Microsporum gypsum, Microsporum nanum, Trichophyton concentricum, Trichophyton equinum, Trichophyton gallinae, Trichophyton gypseum, Trichophyton megnini, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton quinckeanum, Trichophyton rubrum, Trichophyton schoenleini, Trichophyton tonsurans, Trichophyton verrucosum, T. verrucosum var. album, var. discoides, var. ochraceum, Trichophyton violaceum,* и/или *Trichophyton faviforme;* или from *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus sydowi, Aspergillus flavatus, Aspergillus glaucus, Blastoschizomyces capitatus, Candida albicans, Candida enolase, Candida tropicalis, Candida glabrata, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida stellatoidea, Candida kusei, Candida parakwsei, Candida lusitaniae, Candida pseudotropicalis, Candida guilliermondi, Cladosporium carrionii, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatidis, Cryptococcus neoformans, Geotrichum clavatum, Histoplasma capsulatum, Klebsiella pneumoniae, Microsporidia, Encephalitozoon spp., Septata intestinalis* и *Enterocytozoon bieneusi;* менее распространены *Brachiola spp, Microsporidium spp., Nosema spp., Pleistophora spp., Trachipleistophora spp., Vittaforma spp Paracoccidioides brasiliensis, Pneumocystis carinii, Pythiumn insidiosum, Pityrosporum ovale, Sacharomyces cerevisae, Saccharomyces boulardii, Saccharomyces pombe, Scedosporium apiosperum, Sporothrix schenckii, Trichosporon beigelii, Toxoplasma gondii, Penicillium marneffei, Malassezia spp.,*

Fonsecaea spp., Wangiella spp., Sporothrix spp., Basidiobolus spp., Conidiobolus spp., Rhizopus spp, Mucor spp, Absidia spp, Mortierella spp, Cunninghamella spp, Saksenaea spp., Alternaria spp, Curvularia spp, Helminthosporium spp, Fusarium spp, Aspergillus spp, Penicillium spp, Monolinia spp, Rhizoctonia spp, Paecilomyces spp, Pithomyces spp, и *Cladosporium spp.*

Иммуноген получен, например, из поверхностного белка эукариотического паразита, мембранного белка эукариотического паразита, белка оболочки эукариотического паразита, белка проникновения эукариотического паразита, белок слияния с мембраной эукариотического паразита, структурного белка эукариотического паразита, неструктурного белка эукариотического паразита, секретируемого белка эукариотического паразита, белка полимеразы эукариотического паразита, ДНК-полимеразы эукариотического паразита, РНК-полимеразы эукариотического паразита, протеазы эукариотического паразита, гликопротеина эукариотического паразита, фактора транскрипции эукариотического паразита, фермента эукариотического паразита или токсина эукариотического паразита.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген вызывает иммунный ответ в отношении паразита из рода Plasmodium, такого как *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. Malariae* или *P. ovale*. В некоторых вариантах осуществления иммуноген вызывает иммунный ответ в отношении паразита из семейства Caligidae, в частности в отношении паразитов из родов Lepeophtheirus и Caligus, например морских вшей, таких как *Lepeophtheirus salmonis* или *Caligus rogercresseyi*. В некоторых вариантах осуществления иммуноген вызывает иммунный ответ в отношении паразита *Toxoplasma gondii*.

В некоторых вариантах осуществления иммуногены представляют собой иммуногены рака (например, неоэпитопы). Например, иммуноген представляет собой неоантиген и/или неоэпитоп, ассоциированные с острым лейкозом, астроцитомой, раком желчевыводящих путей (холангиокарциномой), раком костей, раком молочной железы, глиомой ствола головного мозга, бронхиолоальвеолярно-клеточного рака легкого, рака надпочечника, рака анальной области, рака мочевого пузыря, рака эндокринной системы, рака пищевода, рака головы или шеи, рака почки, рака паращитовидной железы, рака полового члена, рака плевральной/брюшинной оболочки, рака слюнной железы, рака тонкой кишки, рака щитовидной железы, рака мочеточника, рака уретры, карциномы шейки матки, рака эндометрия, рака маточных труб, рака почечной лоханки, рака влагалища, рака вульвы, рака шейки матки, хронического лейкоза, рака толстой кишки, колоректального рака, меланомы кожи, эпендимомы, эпидермоидных опухолей, саркомы Юинга, рака желудка, глиобластомы, глиобластомы мультиформной, глиомы,

гемобластозов, гепатоцеллюлярной карциномы (печени), гепатомы, болезни Ходжкина, внутриглазной меланомы, саркомы Капоши, рака легкого, лимфомы, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, мезотелиомы, множественной миеломы, рака мышц, новообразований центральной нервной системы (ЦНС), рака нейронов, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, детских злокачественных новообразований, аденомы гипофиза, рака предстательной железы, рака прямой кишки, почечноклеточной карциномы, саркомы мягких тканей, шваномы, рака кожи, опухолей оси позвоночника, типов плоскоклеточной карциномы, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, рака матки или опухолей и их метастазов, включая рефрактерные варианты любого из вышеуказанных типов рака или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой опухолевый антиген, выбранный из следующего: (a) антигенов рака яичек, таких как NY-ESO-1, SSX2, SCP1, а также полипептидов семейства RAGE, BAGE, GAGE и MAGE, например GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 и MAGE-12 (которые можно применять, например, для лечения меланомы, опухолей легкого, головы и шеи, NSCLC, молочной железы, желудочно-кишечного тракта и мочевого пузыря; (b) мутантных антигенов, например p53 (ассоциированного с различными солидными опухолями, например колоректальным раком, раком легкого, головы и шеи), p21/Ras (ассоциированного, например, с меланомой, раком поджелудочной железы и колоректальным раком), CDK4 (ассоциированного, например, с меланомой), MUM1 (ассоциированного, например, с меланомой), каспазы-8 (ассоциированной, например, с раком головы и шеи), CIA 0205 (ассоциированного, например, с раком мочевого пузыря), HLA-A2-R1701, бета катенина (ассоциированного, например, с меланомой), TCR (ассоциированного, например, с Т-клеточной неходжкинской лимфомой), BCR-abl (ассоциированного, например, с хроническим миелогенным лейкозом), триозофосфатизомеразы, KIA 0205, CDC-27, и LDLR-FUT; (c) сверхэкспрессированных антигенов, например галектина 4 (ассоциированного, например, с колоректальным раком), галектина 9 (ассоциированного, например, с болезнью Ходжкина), протеиназы 3 (ассоциированной, например, с хроническим миелогенным лейкозом), WT 1 (ассоциированного, например, с различными лейкозами), углеродной ангидразы (ассоциированной, например, с раком почки), альдолазы A (ассоциированной, например, с раком легких), PRAME (ассоциированного, например, с меланомой), HER-2/neu (ассоциированного, например, с раком молочной железы, толстой кишки, легкого и

яичника), маммаглобина, альфа-фетопротеина (ассоциированного, например, с гепатомой), KSA (ассоциированного, например, с колоректальным раком), гастрина (ассоциированного, например, с раком поджелудочной железы и желудка), каталитического белка теломеразы, MUC-1 (ассоциированного, например, с раком молочной железы и яичника), G-250 (ассоциированного, например, с почечноклеточным раком), p53 (ассоциированного, например, с раком молочной железы, толстой кишки) и карциноэмбрионального антигена (ассоциированного, например, с раком молочной железы, раком легкого и типами рака желудочно-кишечного тракта, такими как колоректальный рак); (d) общих антигенов, например антигенов дифференцировки меланомы-меланоцита, таких как MART-1/Melan A, gpl00, MC1R, рецептора меланоцитстимулирующего гормона, тирозиназы, родственного тирозиназе белка-1/TRP1 и родственного тирозиназе белка-2/TRP2 (ассоциированного, например, с меланомой); (e) ассоциированных с предстательной железой антигенов, таких как PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, ассоциированных, например, с раком предстательной железы; (f) иммуноглобулиновых идиотипов (например, ассоциированных с миеломой и B-клеточной лимфомой); (g) неоантигенов. В определенных вариантах осуществления опухолевые иммуногены включают без ограничения pi 5, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, антигены вируса Эпштейна-Барр, EBNA, антигены вируса папилломы человека (HPV), включая E6 и E7, антигены вирусов гепатита B и C, антигены T-клеточного лимфотропного вируса человека, TSP-180, pl85erbB2, pl80erbB-3, c-met, mn-23Hl, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, pl6, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29YBCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (белок, ассоциированный с циклофилином C, связывающим Mac-2), TAAL6, TAG72, TLP, TPS и т. п.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген вызывает иммунный ответ в отношении следующего: аллергенов пыльцы (аллергенов пыльцы деревьев, травянистых растений, сорняков и травы); аллергенов насекомых или паукообразных (ингаляционных аллергенов, аллергенов слюны и яда, например аллергенов клещей, аллергенов тараканов и мошек, аллергенов яда перепончатокрылых); аллергенов шерсти и перхоти животных (например, собак, кошек, лошадей, крыс, мышей и т. д.); и пищевых аллергенов (например, глиадина). Важными аллергенами пыльцы деревьев, трав и травянистых растений являются таковые, происходящие из таксономических порядков Fagales, Oleales,

Pinales и Platanaceae, включая без ограничения, березу (Betula), ольху (Alnus), лещину (Corylus), граб (Carpinus) и оливковое дерево (Olea), кедр (Cryptomeria и Juniperus), платан (Platanus), порядка Poales, включая травы родов Lolium, Phleum, Poa, Cynodon, Dactylis, Holcus, Phalaris, Secale и Sorghum, порядки Asterales и Urticales, включая травянистые растения родов Ambrosia, Artemisia и Perietaria. Другими важными ингаляционными аллергенами являются аллергены клещей домашней пыли рода Dermatophagoides и Euroglyphus, складских клещей, например Lepidoglyphys, Glycyphagus и Tyrophagus, аллергены тараканов, мошек и блох, например Blatella, Periplaneta, Chironomus и Ctenocepphalides, а также аллергены таких млекопитающих, как кошка, собака и лошадь, аллергены ядов, в том числе ядов, происходящих от жалящих или кусающих насекомых, таких как представители таксономического порядка перепончатокрылых, включая пчел (Apidae), ос (Vespidea) и муравьев (Formicoidae).

В некоторых вариантах осуществления иммуноген происходит из, например, токсина в яде, таком как яд змеи (например, большинства видов гремучих змей (например, восточной ромбовидной гремучей змеи), видов коричневых змей (например, королевской коричневой змеи и восточной коричневой змеи), гадюки Рассела, кобр (например, индийской кобры, королевской кобры), определенных видов крайтов (например, обыкновенного крайта), мамб (например, черной мамбы), чешуйчатой гадюки, бумсланга, морской змеи дюбуа, видов тайпанов (например, прибрежного тайпана и внутриматериковой тайпановой змеи), видов ланцетоголовых (например, лобария и кайсака), бушмейстеров, медноголовых, щитомордников, коралловых змей, смертельных змей, морских змей Белчера, тигровых змей, австралийских черных змей), пауков (например, коричневого отшельника, паука черная вдова, бразильского странствующего паука, воронкового паука, пуговичного паука, австралийского красноспинного паука, катипо, ложной черной вдовы, чилийского паука-отшельника, мышиного паука, видов рода Macrotele, видов рода Sicarius, видов рода Hexpthalma, определенных видов тарантулов), скорпионов и других арахнидов (например, толстохвостого скорпиона, скорпиона-смертоносца, индийского красного скорпиона, видов Centruroides, видов Tityus, таких как бразильский желтый скорпион), насекомых (например, видов пчел, видов ос, определенных муравьев, таких как огненные муравьи, некоторых видов гусениц чешуекрылых, определенных видов многоножек, представителя ремипедий Xibalbanus tulumensis), рыб (например, определенных видов сомов (например, полосатый угорь и другие угрехвостые сомы), определенных видов скатов (например, синепятнистый скат), крылаток, рыб-камней, скорпенов, рыб-жаб, рыб-кроликов, рыб-гоблинов, рыб ос-какаду,

полосатых морских собачек, звездочетов, химер, морских дракончиков, акул-собак), книдарий (например, определенных видов медуз (например, медуз Ируканджи и кубомедузы), гидроидных (например, португальского кораблика), морских анемонов, определенных видов кораллов), ящериц (например, ядозуба, мексиканской бородатой ящерицы, определенных видов варанов (например, комодского варана), перенти и пестрого варана), млекопитающего (например, южной короткохвостой бурозубки, утконоса, европейского крота, обыкновенной куторы, малой куторы, обыкновенной короткохвостой бурозубки, короткохвостой бурозубки Эллиота, определенных видов щелезубых (например, кубинского щелезуба, гаитянского щелезуба), толстого лори), моллюсков (например, определенных видов улитки-конуса), головоногих моллюсков (например, определенных видов осьминога (например, синекольчатого осьминога), кальмаров и каракатиц), земноводных (например, лягушек, таких как ядовитые лягушки-древолазы, бразильский гребнистоголов, лягушка Гринингa, саламандр (например, огненной саламандры, иберийского ребристого тритона).

В некоторых вариантах осуществления токсин получают из растения или гриба (например, мухомора).

В некоторых вариантах осуществления иммуноген токсина происходит из токсина, такого как цианотоксины, динотоксины, миотоксины, цитотоксины (например, рицин, апитоксин, микотоксины (например, афлатоксин), охратоксин, цитринин, алкалоид спорыньи, патулин, токсин возбудителя фузариоз, фумонизины, трихотецены, кардиотоксин), тетродотоксин, батрахотоксин, ботулинический токсин А, столбнячный токсин А, дифтерийный токсин, диоксин, мускарин, буфортоксин, зарин, гемотоксины, фототоксины, некротоксины, нефротоксины и нейротоксины (например, кальцисептин, кобротоксин, кальциклудин, фасцикулин-I, каллиотоксин).

Иммуногены из любого количества микроорганизмов или типов рака могут применяться в кольцевых или линейных полирибонуклеотидах. В некоторых случаях иммуногены ассоциированы с одним микроорганизмом, раскрытым выше, или экспрессируются им. В некоторых вариантах осуществления иммуногены ассоциированы с двумя или больше микроорганизмами, раскрытыми выше, или экспрессируются ими. В некоторых случаях иммуногены ассоциированы с одним типом рака, раскрытым выше, или экспрессируются им. В некоторых вариантах осуществления иммуногены ассоциированы с двумя или больше типами рака, раскрытыми выше, или экспрессируются ими. В некоторых вариантах осуществления иммуногены происходят из токсинов,

раскрытых выше. В некоторых вариантах осуществления иммуногены получены из двух или больше токсинов, раскрытых выше.

Два или больше микроорганизмов являются родственными или неродственными. В некоторых случаях два или больше микроорганизмов являются филогенетически родственными. Например, кольцевые или линейные полирибонуклеотиды по настоящему изобретению предусматривают или кодируют иммуногены двух или больше вирусов, двух или больше представителей вирусного семейства, двух или больше представителей вирусного класса, двух или больше представителей вирусного порядка, двух или больше представителей вирусного рода, двух или больше представителей вирусного вида, двух или больше бактериальных патогенов. В некоторых вариантах осуществления два или больше микроорганизмов не являются филогенетически родственными.

В некоторых случаях два или больше микроорганизмов являются фенотипически родственными. Например, кольцевые или линейные полирибонуклеотиды по настоящему изобретению предусматривают или кодируют иммуногены двух или больше респираторных патогенов, двух или больше выбранных агентов, двух или больше микроорганизмов, ассоциированных с тяжелым заболеванием, двух или больше микроорганизмов, ассоциированных с неблагоприятными исходами у субъектов с ослабленным иммунитетом, двух или больше микроорганизмов, ассоциированных с неблагоприятными исходами, связанными с беременностью, двух или больше микроорганизмов, ассоциированных с геморрагической лихорадкой.

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

При описании иммуногена термины "производный" и "происходящий из" относятся к последовательности (например, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности), которая отличается от последовательности дикого типа одной или несколькими нуклеиновыми кислотами или аминокислотами,

например, содержащей одну или несколько вставок, делеций и/или замен нуклеиновой кислоты или аминокислоты относительно последовательности дикого типа.

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

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

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

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

фосфорилирования, нитрозилирования, метилирования, ацетилирования, амидирования, гидроксилирования, сульфатирования или липидизации, или расщепления).

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

аминокислоты могут включать Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I). В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена представляет собой изменение аминокислоты с одной аминокислоты на другую аминокислоту в пределах одной из следующих групп: группа I: ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr; группа II: cys, ser, tyr, thr; группа III: val, ile, leu, met, ala, phe; группа IV: lys, arg, his; группа V: phe, tyr, trp, his; и группа VI: asp, glu.

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению предусматривают по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислотных делеций относительно последовательности, раскрытой в данном документе (например, последовательности дикого типа).

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

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

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению предусматривают 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40,10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных замен относительно последовательности, раскрытой в данном документе (например, последовательности дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению предусматривают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен относительно последовательности, раскрытой в данном документе (например, последовательности дикого типа).

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

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению предусматривают не более 1, не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не больше 10, не более 11, не более 12, не более 13, не более 14, не более 15, не более 16, не более 17, не более 18, не более 19, не более 20, не более 25, не более 30, не более 35, не более 40, не более 45, не более 50, не более 60, не более 70, не более 80, не более 90, не более 100, не более 120, не более 140, не более 160, не более 180 или не более 200 делеций аминокислот относительно последовательности, раскрытой в данном документе (например, последовательности дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению предусматривают 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 10-15, 15-20, 20-25, 20-30, 30-50, 50-100, или 100-200 аминокислотных делеций относительно последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению предусматривают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных делеций относительно последовательности дикого типа.

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

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуются наличием по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 вставок аминокислот относительно последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуются наличием не более 1, не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не больше 10, не более 11, не более 12, не более 13, не более 14, не более 15, не более 16, не более 17, не более 18, не более 19, не более 20, не более 25, не более 30, не более 35, не более 40, не более 45 или не более 50 аминокислотных вставок относительно последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуются наличием 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-30, 1-40, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-15, 2-20, 2-30, 2-40, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-15, 3-20, 3-30, 3-40, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40,10-15, 15-20, или 20-25 аминокислотных вставок относительно последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления производное иммуногена или производное эпитопа по настоящему изобретению характеризуются наличием 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных вставок относительно последовательности дикого типа.

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

В некоторых вариантах осуществления иммуноген экспрессируется кольцевым или линейным полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления иммуноген представляет собой продукт амплификации кольцевого или линейного полирибонуклеотида по типу катящегося кольца.

Иммуноген может вырабатываться в значительных количествах. Таким образом, иммуноген может представлять собой любую белковую молекулу, которая может вырабатываться. Иммуноген может представлять собой полипептид, который может секретироваться из клетки или локализоваться в цитоплазматическом, ядерном или мембранном компартменте клетки. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым или линейным полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше иммуногенов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым или линейным полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает эпитоп. В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый кольцевым или линейным полирибонуклеотидом по настоящему изобретению, предусматривает слитый белок, содержащий два или больше эпитопов, раскрытых в данном документе, например искусственную пептидную последовательность, содержащую множество предсказанных эпитопов из одного или нескольких микроорганизмов, описанных в данном изобретении.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген, который может быть экспрессирован из кольцевого или линейного полирибонуклеотида, представляет собой мембранный белок, например, содержащий полипептидную последовательность, которая обычно обнаруживается в качестве мембранного белка, или полипептидную последовательность, которая модифицирована таким образом, чтобы являться мембранным белком. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные иммуногены, которые могут экспрессироваться с кольцевого или линейного полирибонуклеотида, раскрытых в данном документе, предусматривают внутриклеточный иммуноген или цитозольный иммуноген.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген имеет длину менее приблизительно 40000 аминокислот, менее приблизительно 35000 аминокислот, менее приблизительно 30000 аминокислот, менее приблизительно 25000 аминокислот, менее приблизительно 20000 аминокислот, менее приблизительно 15000 аминокислот, менее приблизительно 10000 аминокислот, менее приблизительно 9000 аминокислот, менее приблизительно 8000 аминокислот, менее приблизительно 7000 аминокислот, менее

приблизительно 6000 аминокислот, менее приблизительно 5000 аминокислот, менее приблизительно 4000 аминокислот, менее приблизительно 3000 аминокислот, менее приблизительно 2500 аминокислот, менее приблизительно 2000 аминокислот, менее приблизительно 1500 аминокислот, менее приблизительно 1000 аминокислот, менее приблизительно 900 аминокислот, менее приблизительно 800 аминокислот, менее приблизительно 700 аминокислот, менее приблизительно 600 аминокислот, менее приблизительно 500 аминокислот, менее приблизительно 400 аминокислот, менее приблизительно 300 аминокислот, менее приблизительно 250 аминокислот, менее приблизительно 200 аминокислот, менее приблизительно 150 аминокислот, менее приблизительно 140 аминокислот, менее приблизительно 130 аминокислот, менее приблизительно 120 аминокислот, менее приблизительно 110 аминокислот, менее приблизительно 100 аминокислот, менее приблизительно 90 аминокислот, менее приблизительно 80 аминокислот, менее приблизительно 70 аминокислот, менее приблизительно 60 аминокислот, менее приблизительно 50 аминокислот, менее приблизительно 40 аминокислот, менее приблизительно 30 аминокислот, менее приблизительно 25 аминокислот, менее приблизительно 20 аминокислот кислот, менее приблизительно 15 аминокислот, менее приблизительно 10 аминокислот, менее приблизительно 5 аминокислот, при этом длина, предусматривающая любое количество аминокислот, находящееся между указанными значениями или являющееся меньшим, может являться пригодной.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления способы обеспечения экспрессии иммуногена включают обеспечение трансляции по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей

мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или, по меньшей мере 95% от общей длины кольцевого или линейного полирибонуклеотида с образованием полипептидов. В некоторых вариантах осуществления способы обеспечения экспрессии иммуногена включают обеспечение трансляции кольцевого или линейного полирибонуклеотида с образованием полипептидов из по меньшей мере 5 аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, по меньшей мере 150 аминокислот, по меньшей мере 200 аминокислот, по меньшей мере 250 аминокислот, по меньшей мере 300 аминокислот, по меньшей мере 400 аминокислот, по меньшей мере 500 аминокислот, по меньшей мере 600 аминокислот, по меньшей мере 700 аминокислот, по меньшей мере 800 аминокислот, по меньшей мере 900 аминокислот или по меньшей мере 1000 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления способы обеспечения экспрессии белка включают обеспечение трансляции кольцевого или линейного полирибонуклеотида с образованием полипептидов из приблизительно 5 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, приблизительно 15 аминокислот, приблизительно 20 аминокислот, приблизительно 50 аминокислот, приблизительно 100 аминокислот, приблизительно 150 аминокислот, приблизительно 200 аминокислот, приблизительно 250 аминокислот, приблизительно 300 аминокислот, приблизительно 400 аминокислот, приблизительно 500 аминокислот, приблизительно 600 аминокислот, приблизительно 700 аминокислот, приблизительно 800 аминокислот, приблизительно 900 аминокислот или приблизительно 1000 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления способы включают обеспечение трансляции кольцевого или линейного полирибонуклеотида с образованием непрерывных полипептидов, представленных в данном документе, дискретных полипептидов, представленных в данном документе, или и тех, и других.

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

Сигнальная последовательность

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные иммуногены, которые могут экспрессироваться кольцевым или линейным полирибонуклеотидом, описанным в

данном документе, включают секретируемый белок, например белок (например, иммуноген), который в естественных условиях содержит сигнальную последовательность, или белок, который обычно не кодирует сигнальную последовательность, но модифицирован таким образом, что содержит одну сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления иммуноген(иммуногены), кодируемый(кодируемые) кольцевым или линейным полирибонуклеотидом, содержит сигнал секреции. Например, сигнал секреции может представлять собой кодируемый в естественных условиях сигнал секреции для секретируемого белка. В другом примере, сигнал секреции может представлять собой модифицированный сигнал секреции для секретируемого белка. В других вариантах осуществления иммуноген(иммуногены), кодируемый(кодируемые) кольцевым или линейным полирибонуклеотидом, не содержит(содержат) сигнал секреции.

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

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

Кольцевой или линейный полирибонуклеотид может дополнительно предусматривать один или несколько адъювантов, каждый с сигнальной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодирует по меньшей мере один адъювант и по меньшей мере один иммуноген. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген не предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один кодируемый адъювант не предусматривает сигнальную последовательность, и по меньшей мере один кодируемый иммуноген предусматривает сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления ни кодируемый адъювант, ни кодируемый иммуноген не предусматривают сигнальную последовательность.

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

Полипептид, кодируемый полирибонуклеотидом (например, иммуноген или адъювант, кодируемый полирибонуклеотидом), может содержать сигнальную последовательность, которая направляет иммуноген или адъювант по секреторному пути. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность может направлять иммуноген или адъювант для постоянного расположения в определенные органеллы (например, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи или эндосомы). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность направляет иммуноген или адъювант на секрецию из клетки. Для секретируемых белков сигнальная последовательность может быть расщеплена после секреции, в результате чего образуется

зрелый белок. В других вариантах осуществления сигнальная последовательность может быть встроена в мембрану клетки или определенных органелл, создавая трансмембранный сегмент, который закрепляет белок в мембране клетки, эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи. В определенных вариантах осуществления сигнальная последовательность трансмембранного белка представляет собой короткую последовательность на N-конце полипептида. В других вариантах осуществления первый трансмембранный домен действует как первая сигнальная последовательность, которая направляет белок к мембране.

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

Регуляторный элемент

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат регуляторный элемент, например последовательность, которая модифицирует экспрессию экспрессионной последовательности в кольцевом или линейном полирибонуклеотиде. Регуляторный элемент может предусматривать последовательность, которая расположена рядом с экспрессионной последовательностью, кодирующей продукт экспрессии. Регуляторный элемент может быть функционально связан с расположенной рядом последовательностью. Регуляторный элемент может обеспечивать повышение количества экспрессируемого продукта по сравнению с количеством экспрессируемого продукта в отсутствие регуляторного элемента. Регуляторный элемент может применяться для увеличения уровня экспрессии одного или нескольких иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым или линейным полирибонуклеотидом. Аналогичным образом регуляторный элемент может применяться для уменьшения экспрессии одного или нескольких иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым или линейным полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может применяться для увеличения уровня экспрессии иммуногена и/или адъюванта, и другой регуляторный элемент может применяться для уменьшения экспрессии другого иммуногена и/или адъюванта в одном и том же кольцевом или линейном полирибонуклеотиде. Кроме того, один регуляторный элемент может обеспечивать увеличение количества продуктов (например, иммуногена

или адъювантов), экспрессируемых с нескольких экспрессионных последовательностей, соединенных в тандем. Таким образом, один регуляторный элемент может обеспечивать усиление экспрессии одной или нескольких экспрессионных последовательностей (например, иммуногенов или адъювантов). Также может применяться несколько регуляторных элементов, например, для дифференциальной регуляции экспрессии отличающихся экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент, представленный в данном документе, может предусматривать последовательность для избирательной трансляции. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательной трансляции" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая избирательно инициирует или активирует трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом или линейном полирибонуклеотиде, например, к определенным аптазимам рибопереключателя. Регуляторный элемент также может предусматривать последовательность для избирательного разрушения. Используемый в данном документе термин "последовательность для избирательного разрушения" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая инициирует разрушение кольцевого или линейного полирибонуклеотида или продукта экспрессии кольцевого или линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент является модулятором трансляции. Модулятор трансляции может модулировать трансляцию экспрессионной последовательности в кольцевом или линейном полирибонуклеотиде. Модулятор трансляции может являться энхансером или супрессором трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции может функционировать в качестве регуляторного элемента. Дополнительные примеры регулирующих элементов описаны в параграфах [0154] – [0161] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Известно, что нуклеотиды, фланкирующие кодон, который инициирует трансляцию, как, например, без ограничения, старт-кодон или альтернативный старт-кодон, влияют на эффективность трансляции, длину и/или структуру кольцевого или линейного полирибонуклеотида (см., например, работу Matsuda and Mauro PLoS ONE, 2010 5: 11; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Маскирование любого из нуклеотидов, фланкирующих кодон, который инициирует трансляцию, можно использовать для изменения положения инициации

трансляции, эффективности трансляции, длины и/или структуры кольцевого или линейного полирибонуклеотида.

В одном варианте осуществления маскирующее средство можно использовать вблизи старт-кодона или альтернативного старт-кодона, чтобы маскировать или скрывать кодон с целью снижения вероятности инициации трансляции в маскированном старт-кодоне или альтернативном старт-кодоне. В другом варианте осуществления маскирующее средство можно использовать для маскирования старт-кодона кольцевого или линейного полирибонуклеотида с целью повышения вероятности того, что трансляция будет инициироваться в альтернативном старт-кодоне.

Последовательность инициации трансляции

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодирует иммуноген и включает последовательность инициации трансляции, например старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции предусматривает последовательность Козак или Шайна-Дальгарно. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции предусматривает последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат последовательность инициации трансляции, например последовательность Козак, расположенную рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции представляет собой некодирующий старт-кодон. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козак, присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат по меньшей мере одну последовательность инициации трансляции, расположенную рядом с экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции обеспечивает конформационную гибкость кольцевого или линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления последовательность инициации трансляции расположена в пределах по сути однонитевой области кольцевого или линейного полирибонуклеотида. Дополнительные примеры последовательностей инициации трансляции описаны в параграфах [0163] – [0165] международной публикации заявки на

патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

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

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

IRES

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид, описанные в данном документе, содержат элемент, представляющий собой участок внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид, описанные в данном документе, содержат более одного (например, 2, 3, 4 и 5) элемента, представляющего собой участок внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат одну или

несколько последовательностей IRES с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к отделению образующихся в результате пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов). В некоторых вариантах осуществления IRES фланкирует по меньшей мере одну экспрессионную последовательность (например, 2, 3, 4, 5 или больше) с обеих сторон. Элемент IRES, подходящий для включения в кольцевой или линейный полирибонуклеотид, может содержать последовательность РНК, способную соединяться с эукариотической рибосомой. В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV). В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой IRES вируса Коксаки (CVB3). Дополнительные примеры IRES описаны в параграфах [0166] – [0168] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Домены расщепления

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

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат по меньшей мере один сдвигающий элемент рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат сдвигающий элемент рядом с каждой экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент присутствует с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной

последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии, например, иммуногена(иммуногенов) и/или адъюванта(адъювантов). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент является частью одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат одну или несколько экспрессионных последовательностей (например, иммуногена(иммуногенов) и/или адъюванта(адъювантов)), и каждая из одной или нескольких экспрессионных последовательностей отделена от следующей экспрессионной последовательности (например, иммуногена(иммуногенов) и/или адъюванта(адъювантов)) посредством сдвигающего элемента в кольцевом или линейном полирибонуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент предупреждает образование одного полипептида (a) после двух циклов трансляции одной экспрессионной последовательности или (b) после одного или нескольких циклов трансляции двух или больше экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент представляет собой последовательность, отдельную от одной или нескольких экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент содержит часть экспрессионной последовательности из одной или нескольких экспрессионных последовательностей.

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

В некоторых вариантах осуществления множество иммуногенов, кодируемых кольцевым или линейным рибонуклеотидом, может быть отделено с помощью IRES между каждым иммуногеном. IRES может быть одним и тем же IRES для всех иммуногенов. IRES может отличаться для отличающихся иммуногенов. В других вариантах осуществления множество иммуногенов и/или адъювантов может быть отделено посредством саморасщепляющегося пептида 2A. Более того, множество иммуногенов и/или адъювантов, кодируемых кольцевым или линейным рибонуклеотидом, могут быть отделены как последовательностями IRES, так и последовательностями 2A. Например, IRES может находиться между одним иммуногеном и/или адъювантом и вторым иммуногеном и/или адъювантом, тогда как пептид 2A может находиться между вторым иммуногеном и/или адъювантом и третьим иммуногеном и/или адъювантом. Выбор конкретного IRES или саморасщепляющегося пептида 2A можно применять для контроля уровня экспрессии иммуногена и/или адъюванта под контролем

последовательности IRES или последовательности 2A. Например, в зависимости от выбранного IRES и/или пептида 2A уровень экспрессии полипептида может быть выше или ниже.

Во избежание выработки непрерывного продукта экспрессии, например, иммуногена и/или адъюванта, при сохранении трансляции по типу "катящегося кольца" можно включить сдвигающий элемент для индукции рибосомальной паузы в ходе трансляции. В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент расположен на 3'-конце по меньшей мере одной из одной или нескольких экспрессионных последовательностей. Сдвигающий элемент может иметь конфигурацию, позволяющую ему задерживать рибосому в ходе трансляции по типу "катящегося кольца" кольцевого или линейного полирибонуклеотида. Сдвигающий элемент может включать без ограничения 2A-подобную последовательность или последовательность CHYSEL (SEQ ID NO: 8) (элемент, представляющий собой цис-действующую гидролазу). В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент кодирует последовательность с C-концевой консенсусной последовательностью, которая представляет собой $X_1X_2X_3EX_5NPGP$, где X_1 отсутствует или представляет собой G или H, X_2 отсутствует или представляет собой D или G, X_3 представляет собой D, или V, или I, или S, или M, и X_5 представляет собой любую аминокислоту (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления данная последовательность содержит неконсервативную последовательность аминокислот с сильной склонностью к образованию альфа-спирали, за которой расположена консенсусная последовательность -D(V/I)ExNPGP, где x = любая аминокислота (SEQ ID NO: 7). Некоторые неограничивающие примеры сдвигающих элементов включают GDVESNPGP (SEQ ID NO: 10), GDIEENPGP (SEQ ID NO: 11), VEPNPGP (SEQ ID NO: 12), IETNPGP (SEQ ID NO: 13), GDIESNPGP (SEQ ID NO: 14), GDVELNPGP (SEQ ID NO: 15), GDIETNPGP (SEQ ID NO: 16), GDVENPGP (SEQ ID NO: 17), GDVEENPGP (SEQ ID NO: 18), GDVEQNPGP (SEQ ID NO: 19), IESNPGP (SEQ ID NO: 20), GDIELNPGP (SEQ ID NO: 21), HDIETNPGP (SEQ ID NO: 22), HDVETNPGP (SEQ ID NO: 23), HDVEMNPGP (SEQ ID NO: 24), GDMESNPGP (SEQ ID NO: 25), GDVETNPGP (SEQ ID NO: 26), GDIEQNPGP (SEQ ID NO: 27) и DSEFNPGP (SEQ ID NO: 28).

В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент, описанный в данном документе, расщепляет продукт экспрессии, как, например, между G и P в консенсусной последовательности, описанной в данном документе. В качестве одного неограничивающего примера, кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат по

меньшей мере один сдвигающий элемент для расщепления продукта экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат сдвигающий элемент рядом с по меньшей мере одной экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат сдвигающий элемент после каждой экспрессионной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат сдвигающий элемент, присутствующий с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к трансляции отдельных пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов) с каждой экспрессионной последовательности.

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

В некоторых вариантах осуществления сдвигающий элемент присутствует в кольцевом или линейном полирибонуклеотиде в других формах. Например, в некоторых иллюстративных кольцевых или линейных полирибонуклеотидах сдвигающий элемент содержит терминирующий элемент первой экспрессионной последовательности в кольцевом или линейном полирибонуклеотиде и нуклеотидную спейсерную последовательность, которая отделяет терминирующий элемент от первой последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, следующей за первой экспрессионной последовательностью. В некоторых примерах первый сдвигающий элемент первой экспрессионной последовательности расположен выше (в 5'-направлении от нее) первой последовательности инициации трансляции экспрессионной последовательности, следующей за первой экспрессионной

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

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат по меньшей мере одну последовательность расщепления. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления расположена рядом с экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления расположена между двумя экспрессионными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления последовательность

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

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

В некоторых вариантах осуществления последовательность расщепления кодирует расщепляемый полипептидный линкер. Например, полирибонуклеотид может кодировать два или больше иммуногенов, например, при этом два или больше иммуногенов

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид, описанные в данном документе, представляют собой разлагающийся кольцевой или линейный полирибонуклеотид, расщепляемый кольцевой или линейный полирибонуклеотид или саморасщепляющийся кольцевой или линейный полирибонуклеотид. Кольцевой или линейный полирибонуклеотид может осуществлять доставку клеточных компонентов, включая, например, РНК, lncRNA, lincRNA, miRNA, тРНК, рРНК, snoRNA, ncRNA, siRNA или shRNA. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат miRNA, отделенную (i) саморасщепляющимися элементами; (ii) сайтами привлечения факторов расщепления; (iii) разрушаемыми линкерами; (iv) химическими линкерами и/или (v) спейсерными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления circRNA содержит siRNA,

отделенную (i) саморасщепляющимися элементами; (ii) сайтами привлечения факторов расщепления (например, ADAR); (iii) разрушаемыми линкерами (например, глицериновыми); (iv) химическими линкерами и/или (v) спейсерными последовательностями. Неограничивающие примеры саморасщепляющихся элементов включают рибозимы типа "головки молотка", сплайсинговые элементы, рибозимы, содержащие шпильку, рибозимы вируса гепатита дельта (HDV), сателлита Варкуд (VS) и *glmS*.

Регуляторные элементы и соотношение продуктов экспрессии

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид содержат одну или несколько последовательностей регуляторной нуклеиновой кислоты или содержат одну или несколько экспрессионных последовательностей, которые кодируют регуляторную нуклеиновую кислоту, например нуклеиновую кислоту, которая модифицирует экспрессию эндогенного гена и/или экзогенного гена. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность кольцевого или линейного полирибонуклеотида, представленного в данном документе, может содержать последовательность, которая является антисмысловой по отношению к регуляторной нуклеиновой кислоте, такой как некодирующая РНК, как, например, без ограничения, тРНК, lncRNA, miRNA, рРНК, snRNA, микроРНК, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA, exRNA, scaRNA, Y-РНК и hnRNA.

Иллюстративные регуляторные нуклеиновые кислоты описаны в параграфах [0177] – [0194] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления эффективность трансляции кольцевого полирибонуклеотида, представленного в данном документе, является более высокой, чем у эталона, например, его линейного эквивалента, линейной экспрессионной последовательности или линейного полирибонуклеотида для циркуляризации. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, представленный в данном документе, характеризуется эффективностью трансляции, которая на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 70%, 800%, 900%, 1000%, 2000%, 5000%, 10000%, 100000%, или больше выше, чем таковая для эталона. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется эффективностью трансляции, на 10%

более высокой, чем у его линейного эквивалента. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется эффективностью трансляции, на 300% более высокой, чем у его линейного эквивалента.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид обеспечивают выработку продуктов экспрессии в стехиометрических соотношениях. Трансляция по типу "катящегося кольца" приводит к непрерывной выработке продуктов экспрессии в по сути эквивалентных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции, так что продукты экспрессии вырабатываются в по сути эквивалентных соотношениях. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид характеризуется стехиометрической эффективностью трансляции нескольких продуктов экспрессии, например продуктов с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид обеспечивают выработку отличающихся соотношений продуктов экспрессии. Например, эффективность трансляции нескольких продуктов экспрессии может иметь соотношение, составляющее 1:10,000; 1:7000, 1:5000, 1:1000, 1:700, 1:500, 1:100, 1:50, 1:10, 1:5, 1:4, 1:3 или 1:2.. В некоторых вариантах осуществления соотношение нескольких продуктов экспрессии может быть изменено с применением регуляторного элемента.

Трансляция

В некоторых вариантах осуществления после инициации трансляции кольцевого полирибонуклеотида рибосома, связанная с кольцевым полирибонуклеотидом, не отсоединяется от кольцевого полирибонуклеотида до завершения по меньшей мере одного цикла трансляции кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, является компетентным в отношении трансляции по типу "катящегося кольца". В некоторых вариантах осуществления в ходе трансляции по типу "катящегося кольца" после инициации трансляции кольцевого полирибонуклеотида рибосома, связанная с кольцевым полирибонуклеотидом, не отсоединяется от кольцевого полирибонуклеотида до завершения по меньшей мере 2 циклов, по меньшей мере 3 циклов, по меньшей мере 4 циклов, по меньшей мере 5 циклов, по меньшей мере 6 циклов, по меньшей мере 7 циклов, по меньшей мере 8 циклов, по меньшей мере 9 циклов, по меньшей мере 10

циклов, по меньшей мере 11 циклов, по меньшей мере 12 циклов, по меньшей мере 13 циклов, по меньшей мере 14 циклов, по меньшей мере 15 циклов, по меньшей мере 20 циклов, по меньшей мере 30 циклов, по меньшей мере 40 циклов, по меньшей мере 50 циклов, по меньшей мере 60 циклов, по меньшей мере 70 циклов, по меньшей мере 80 циклов, по меньшей мере 90 циклов, по меньшей мере 100 циклов, по меньшей мере 150 циклов, по меньшей мере 200 циклов, по меньшей мере 250 циклов, по меньшей мере 500 циклов, по меньшей мере 1000 циклов, по меньшей мере 1500 циклов, по меньшей мере 2000 циклов, по меньшей мере 5000 циклов, по меньшей мере 10000 циклов, по меньшей мере 10^5 циклов или по меньшей мере 10^6 циклов трансляции кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления трансляция по типу "катящегося кольца" кольцевого полирибонуклеотида приводит к образованию полипептидного продукта, который образуется в результате трансляции в ходе более чем одного цикла трансляции кольцевого полирибонуклеотида ("непрерывного" продукта экспрессии). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сдвигающий элемент, и трансляция по типу "катящегося кольца" кольцевого полирибонуклеотида приводит к образованию полипептидного продукта, который образуется в ходе одного цикла трансляции или менее чем одного цикла трансляции кольцевого полирибонуклеотида ("дискретного" продукта экспрессии). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет такую конфигурацию, что по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% от общего количества полипептидов (моль/моль), образующихся в ходе трансляции по типу "катящегося кольца" кольцевого полирибонуклеотида, представляют собой дискретные полипептиды. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется такой конфигурацией, что по меньшей мере 99% всех полипептидов представляют собой дискретные полипептиды. В некоторых вариантах осуществления соотношение количества дискретных продуктов и общего количества полипептидов тестируют в системе трансляции in vitro. В некоторых вариантах осуществления система трансляции in vitro, используемая для тестирования соотношения количества, содержит лизат ретикулоцитов кролика. В некоторых вариантах осуществления соотношение количества тестируют в системе трансляции in vivo, такой как эукариотическая клетка или прокариотическая клетка, культивируемая клетка или клетка в организме.

Нетранслируемые области

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

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

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

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

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

встроены в кольцевой полирибонуклеотид для модулирования внутриклеточной стабильности и, таким образом, влияния на трансляцию и выработку получаемого в результате белка.

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

В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 5'-UTR, и он является компетентным в отношении экспрессии белка с одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует 3'-UTR, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность поли(A), и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует терминирующий элемент, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует участок внутренней посадки рибосомы, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует кэп, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствуют 5'-UTR, 3'-UTR и IRES, и он является компетентным в отношении экспрессии белка из одной или нескольких его экспрессионных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит одну или несколько из следующих последовательностей: последовательность, которая кодирует одну или несколько miRNA, последовательность, которая кодирует один или несколько репликативных белков, последовательность, которая кодирует экзогенный ген, последовательность, которая кодирует терапевтическое средство, регуляторный элемент (например, модулятор трансляции, например энхансер или супрессор трансляции), последовательность инициации трансляции, одну или несколько регуляторных нуклеиновых кислот, которые

нацеливаются на эндогенные гены (siRNA, lncRNA, shRNA), и последовательность, которая кодирует терапевтические мРНК или белок.

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

Последовательность терминации

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько экспрессионных последовательностей (например, кодирующих иммуноген и/или кодирующих адъювант), и при этом каждая экспрессионная последовательность может содержать или не содержать терминирующий элемент. Дополнительные примеры терминирующих элементов описаны в параграфах [0169] – [0170] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность поли(А). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности поли(А) составляет более 10 нуклеотидов. В одном варианте осуществления длина последовательности поли(А) составляет более чем 15 нуклеотидов

(например, по меньшей мере или более чем приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, и 3,000 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(А) сконструирована в соответствии с описаниями последовательности поли(А) в [0202] – [0204] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

Регуляторные нуклеиновые кислоты

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей, которые кодируют регуляторную нуклеиновую кислоту, например, которая модифицирует экспрессию эндогенного гена и/или экзогенного гена. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность кольцевого полирибонуклеотида, представленного в данном документе, может содержать последовательность, которая является антисмысловой по отношению к регуляторной нуклеиновой кислоте, такой как некодирующая РНК, как, например, без ограничения, тРНК, lncRNA, miRNA, рРНК, snRNA, микроРНК, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA, exRNA, scaRNA, Y-РНК и hnRNA.

В одном варианте осуществления регуляторная нуклеиновая кислота нацеливается на ген, такой как ген хозяина. Такие регуляторные нуклеиновые кислоты могут предусматривать любую из регуляторных нуклеиновых кислот, описанных в [0177] и [0181] – [0189] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная последовательность содержит один или несколько признаков, описанных в данном документе, например последовательность, кодирующую один или несколько пептидов или белков, один или

несколько регуляторных элементов, одну или несколько регуляторных нуклеиновых кислот, например одну или несколько некодирующих РНК, другие экспрессионные последовательности и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания РНК. МикроРНК (или miRNA) представляют собой короткие некодирующие РНК, которые связываются с 3'-UTR молекул нуклеиновой кислоты и подавляют экспрессию генов путем снижения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты или путем ингибирования трансляции. Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько последовательностей-мишеней для микроРНК, последовательностей микроРНК или затравочных областей микроРНК. Такие последовательности могут соответствовать любым известным микроРНК, таким как изложенные в публикации заявки на патент США US 2005/0261218 и публикации заявки на патент США US 2005/0059005, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Последовательность микроРНК содержит "затравочную" область, т. е. последовательность в области положений 2-8 зрелой микроРНК, причем эта последовательность обладает абсолютной уотсон-криковской комплементарностью по отношению к последовательности-мишени для микроРНК. Затравочная область микроРНК может содержать положения 2-8 или 2-7 зрелой микроРНК. В некоторых вариантах осуществления затравочная область микроРНК может содержать 7 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-8 зрелой микроРНК), где сайт, комплементарный затравочной области, в соответствующей мишени miRNA фланкирован аденином (A), расположенным напротив положения 1 микроРНК. В некоторых вариантах осуществления затравочная область микроРНК может содержать 6 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-7 зрелой микроРНК), где сайт, комплементарный затравочной области, в соответствующей мишени miRNA фланкирован аденином (A), расположенным напротив положения 1 микроРНК. См., например, работу Grimson et al; Mol Cell. 2007 6;27:91-105; включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Связывание белка

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит один или несколько сайтов связывания белка, которые обеспечивают возможность связывания белка, например, рибосомы, с внутренним сайтом в последовательности РНК. Благодаря встраиванию сайтов связывания белков, например, сайтов связывания рибосом, в кольцевой полирибонуклеотид кольцевой полирибонуклеотид может ускользать от

выявления или характеризоваться пониженным выявлением иммунной системой хозяина, характеризоваться модулированным разрушением или модулированной трансляцией, посредством маскирования кольцевого полирибонуклеотида от компонентов иммунной системы хозяина.

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

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

Природные 5'-UTR обладают признаками, которые играют роль в инициации трансляции. Они содержат такие сигнатуры, как последовательности Козак, которые, как широко известно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома инициирует трансляцию многих генов. Последовательности Козак содержат консенсусную последовательность CCR(A/G)CCAUGG (SEQ ID NO: 29), где R представляет собой пурин (аденин или гуанин), расположенный на три основания выше старт-кодона (AUG), за которым расположен еще один "G". Также известно, что 5'-UTR образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид кодирует последовательность связывания белка, которая связывается с белком. В некоторых

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

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

Инкриптоген

Как описано в данном документе, кольцевой полирибонуклеотид содержит инкриптоген для ослабления врожденного иммунного ответа клетки, ускользания от него или его избегания. В одном аспекте в данном документе представлен кольцевой полирибонуклеотид, который при доставке в клетки приводит к ослаблению иммунного ответа хозяина по сравнению с ответом, запускаемым эталонным соединением, например, линейным полинуклеотидом, соответствующим описанному кольцевому полирибонуклеотиду, или кольцевым полирибонуклеотидом, в котором отсутствует инкриптоген. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид обладает меньшей иммуногенностью (например, более низким уровнем одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа), чем аналог, не содержащий инкриптогена.

В некоторых вариантах осуществления инкриптоген повышает стабильность. Появляется все больше доказательств того, что UTR играют регуляторную роль в отношении стабильности молекулы нуклеиновой кислоты и трансляции. Регуляторные

признаки UTR могут быть включены в инкриптоген для повышения стабильности кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'-UTR могут составлять инкриптогены в кольцевом полирибонуклеотиде. Например, удаление или модификация AU-богатых элементов UTR (ARE) могут являться полезными для модулирования стабильности или иммуногенности (например, для модулирования уровня одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа) кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления удаление или модификация AU-богатых элементов (ARE) в экспрессионной последовательности, например транслируемых областях, могут быть применимыми для модулирования стабильности или иммуногенности (например, для модулирования уровня одного или нескольких маркеров иммунного или воспалительного ответа) кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит сайт связывания miRNA или сайт связывания с любыми другими некодирующими РНК. Например, посредством включения сайтов для miR-142 в состав кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, можно не только модулировать экспрессию в гемопоэтических клетках, но также ослаблять или устранять иммунные ответы на белок, кодируемый кольцевым полирибонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит один или несколько сайтов связывания белка, которые обеспечивают возможность связывания белка, например иммунного белка, с последовательностью РНК. Благодаря встраиванию сайтов связывания белков в кольцевой полирибонуклеотид кольцевой полирибонуклеотид может ускользать от выявления или характеризоваться сниженным уровнем выявления иммунной системой хозяина, характеризоваться модулированным разрушением или модулированной трансляцией, посредством маскирования кольцевого полирибонуклеотида от компонентов иммунной системы хозяина. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сайт связывания иммунного белка, например, для ускользания от иммунных ответов, например ответов с участием CTL. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания иммунного белка представляет собой нуклеотидную последовательность, которая связывается с иммунным белком и способствует маскированию кольцевого полирибонуклеотида, который является экзогенным.

В некоторых вариантах осуществления инкриптоген содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов. Иллюстративные модификации могут включать любую модификацию сахарного фрагмента, нуклеинового основания, межнуклеозидной связи (например, фосфатного остатка, образующего связь/фосфодиэфирной связи/фосфодиэфирного остова) и любую их комбинацию, которая может предотвращать или ослаблять иммунный ответ на кольцевой полирибонуклеотид. Некоторые из иллюстративных модификаций представлены в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько модификаций, описанных в другом месте в данном документе, для ослабления иммунного ответа хозяина по сравнению с ответом, запускаемым эталонным соединением, например, кольцевым полирибонуклеотидом, в котором отсутствуют модификации. В частности, было показано, что добавление одного или нескольких инозиновых остатков обеспечивает распознавание РНК как эндогенной по сравнению с вирусной. См., например, работу Yu, Z. et al. (2015) RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as "self". Cell Res. 25, 1283–1284, включенную посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько экспрессионных последовательностей для shRNA или последовательности РНК, которая может быть процессирована до siRNA, и эта shRNA или siRNA нацеливается на RIG-1 и снижает экспрессию RIG-1. RIG-1 может демонстрировать чувствительность к чужеродной кольцевой РНК и обеспечивать разрушение чужеродной кольцевой РНК. Следовательно, кольцевые полинуклеотиды, несущие последовательности для shRNA, siRNA или любых других регуляторных нуклеиновых кислот, нацеливающихся на RIG-1, могут ослаблять иммунитет, например, иммунитет клеток-хозяев, в отношении кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует последовательность, элемент или структура, которые способствуют ослаблению врожденного иммунного ответа клетки на кольцевой полирибонуклеотид, ускользанию от него или его избеганию. В некоторых таких вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде может отсутствовать последовательность поли(A), 5’-конец, 3’-конец, фосфатная группа, гидроксильная группа или любая их комбинация.

Нуклеотидные спейсерные последовательности

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления кольцевой

полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или больше спейсерных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления элементы полирибонуклеотида могут быть отделены друг от друга посредством спейсерной последовательности или линкера. Иллюстративные спейсерные последовательности описаны в параграфах [0293] – [0302] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Линкеры, отличные от нуклеиновой кислоты

Кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может содержать линкер, отличный от нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, между одной или несколькими последовательностями или элементами, описанными в данном документе. В одном варианте осуществления одна или несколько последовательностей или элементов, описанных в данном документе, соединены линкером. Линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, может представлять собой химическую связь, например одну или несколько ковалентных связей или нековалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер, отличный от нуклеиновой кислоты, представляет собой пептидный или белковый линкер. Такой линкер может иметь длину 2-30 аминокислот или больше. Кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, может также содержать линкер, отличный от нуклеиновой кислоты. Иллюстративные линкеры, отличные от нуклеиновой последовательности описаны в параграфах [0303] – [0307] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит другую последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать другие последовательности, которые включают ДНК, РНК или искусственные нуклеиновые кислоты. Другие последовательности могут включать без ограничения геномную ДНК, кДНК или последовательности, которые кодируют тРНК, мРНК, рРНК, miRNA, gRNA,

siRNA или другие молекулы для RNAi. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит siRNA для нацеливания на отличающийся локус того же продукта экспрессии гена, что и в кольцевом полирибонуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит siRNA для нацеливания на продукт экспрессии гена, отличающийся от продукта экспрессии гена, который присутствует в кольцевом полирибонуклеотиде.

Стабильность и период полужизни

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет определенные характеристики последовательности. Например, кольцевой полирибонуклеотид может иметь конкретный нуклеотидный состав. В некоторых таких вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько областей, богатых пуринами (аденином и/или гуанозином). В некоторых таких вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько областей, бедных пуринами. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько AU-богатых областей или элементов (ARE). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько областей, богатых аденином.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать один или несколько повторяющихся элементов, описанных в другом месте в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько модификаций, описанных в другом месте в данном документе.

Кольцевой полирибонуклеотид может содержать одну или несколько замен, вставок и/или добавлений, делеций и ковалентных модификаций по сравнению с эталонными последовательностями. Например, кольцевые полирибонуклеотиды с одной или несколькими вставками, добавлениями, делециями и/или ковалентными модификациями по сравнению с исходным полирибонуклеотидом включены в объем настоящего изобретения. Иллюстративные модификации описаны в параграфах [0310] – [0325] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит структуру высшего порядка, например вторичную или третичную структуру. В некоторых вариантах осуществления комплементарные сегменты кольцевого полирибонуклеотида

сворачиваются в двухнитевой сегмент, удерживаясь вместе посредством водородных связей в парах, например A-U и C-G. В некоторых вариантах осуществления спирали, также известные как стебли, образуются внутри молекулы и имеют двухнитевой сегмент, соединенный с концевой петлей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет по меньшей мере один сегмент с псевдодвухнитевой вторичной структурой.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида содержат по сути однонитевые области в противоположность двухнитевым областям. В некоторых вариантах осуществления соотношение однонитевых и двухнитевых областей может влиять на функциональные свойства кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида являются по сути однонитевыми. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути однонитевыми, могут содержать сайт связывания белка или РНК. В некоторых вариантах осуществления последовательности кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути однонитевыми, могут быть конформационно гибкими для обеспечения возможности повышенной интенсивности взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления последовательность кольцевого полирибонуклеотида специально сконструирована для включения таких вторичных структур для связывания или повышения уровня связывания белка или нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является по сути двухнитевыми. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути двухнитевыми, могут включать в себя конформационный сайт распознавания, например, рибопереключатель или аптазим. В некоторых вариантах осуществления последовательности кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути двухнитевыми, могут быть конформационно жесткими. В некоторых таких случаях конформационно жесткая последовательность может приводить к стерическому затруднению связывания кольцевого полирибонуклеотида с белком или нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления последовательность кольцевого полирибонуклеотида специально сконструирована для включения таких вторичных структур для избегания или снижения уровня связывания белка или нуклеиновой кислоты.

Существует 16 возможных пар оснований, однако фактические пары оснований могут образовывать шесть из них (AU, GU, GC, UA, UG, CG). Остальные называются ошибками спаривания и встречаются в спиралях с очень низкой частотой. В некоторых вариантах осуществления структура кольцевого полирибонуклеотида не может быть легко нарушена без воздействия на его функцию и летальных последствий, что обеспечивает выбор для поддержания вторичной структуры. В некоторых вариантах осуществления первичная структура стеблей (т. е. их нуклеотидная последовательность) по-прежнему может варьироваться при сохранении спиральных областей. Природа оснований является вторичной по отношению к высшей структуре, и замены возможны при условии, что они сохраняют вторичную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет по меньшей мере один сегмент с псевдоспиральной структурой. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну из U-богатой или A-богатой последовательности или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления U-богатые и/или A-богатые последовательности расположены таким образом, что образуется тройная псевдоспиральная структура. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет двойную псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) сегментов, имеющих двойную псевдоспиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну из C-богатой и/или G-богатой последовательности. В некоторых вариантах осуществления C-богатые и/или G-богатые последовательности расположены таким образом, что образуется тройная псевдоспиральная структура. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет внутримолекулярную тройную псевдоспиральную структуру, которая способствует стабилизации.

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит третичную структуру с одним или несколькими мотивами, например псевдоузлом, G-квадруплексом, спиралью и коаксиальным стэкингом.

Дополнительные примеры структур кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, описаны в параграфах [0326] – [0333] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В результате циркуляризации кольцевой полирибонуклеотид может обладать определенными характеристиками, которые отличают его от линейной РНК. Например, кольцевой полирибонуклеотид является менее восприимчивым к разрушению под действием экзонуклеазы по сравнению с линейной РНК. Таким образом, кольцевой полирибонуклеотид может являться более стабильным, чем линейная РНК, в частности при инкубировании в присутствии экзонуклеазы. Повышенная стабильность кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с линейной РНК может делать кольцевой полирибонуклеотид более применимым в качестве реагента для трансформации клеток для получения полипептидов (например, иммуногенов и/или адъювантов). Повышенная стабильность кольцевого полирибонуклеотида по сравнению с линейной РНК может облегчать хранение кольцевого полирибонуклеотида в течение более длительного времени по сравнению с линейной РНК. Стабильность кольцевого полирибонуклеотида, обработанного экзонуклеазой, можно тестировать с помощью способов, стандартных в данной области техники, посредством которых определяют, произошло ли разрушение РНК (например, с помощью гель-электрофореза).

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

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида, представленный в данном документе, характеризуется периодом полужизни, повышенным по сравнению с эталоном, например линейным полирибонуклеотидом, имеющим такую же нуклеотидную последовательность, но являющимся не циркуляризованным (например, линейным эквивалентом). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является устойчивым к разрушению, например, под действием экзонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является устойчивым к саморазрушению. В некоторых вариантах осуществления в кольцевом полирибонуклеотиде отсутствует сайт

ферментативного расщепления, например, сайт расщепления для дайсера. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид характеризуется периодом полужизни, на по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 100%, по меньшей мере приблизительно 120%, по меньшей мере приблизительно 140%, по меньшей мере приблизительно 150%, по меньшей мере приблизительно 160%, по меньшей мере приблизительно 180%, по меньшей мере приблизительно 200%, по меньшей мере приблизительно 300%, по меньшей мере приблизительно 400%, по меньшей мере приблизительно 500%, по меньшей мере приблизительно 600%, по меньшей мере приблизительно 700%, по меньшей мере приблизительно 800%, по меньшей мере приблизительно 900%, по меньшей мере приблизительно 1000% или по меньшей мере приблизительно 10000% большим, чем у эталона, например линейного эквивалента.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид сохраняется в клетке во время деления клетки. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид сохраняется в дочерних клетках после митоза. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид реплицируется в клетке и передается дочерним клеткам. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит репликативный элемент, который опосредует саморепликацию кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления репликативный элемент опосредует транскрипцию кольцевого полирибонуклеотида с образованием линейного полирибонуклеотида, который является комплементарным кольцевому полирибонуклеотиду (линейным комплементарным). В некоторых вариантах осуществления линейный комплементарный полирибонуклеотид может подвергаться циркуляризации *in vivo* в клетках с образованием кольцевого комплементарного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления комплементарный полирибонуклеотид может дополнительно самореплицироваться с образованием другого кольцевого полирибонуклеотида, который имеет такую же или сходную нуклеотидную последовательность по сравнению с исходным кольцевым полирибонуклеотидом. Один иллюстративный саморепликативный элемент предусматривает репликативный домен HDV (описанный в работе Beeharry et al, *Virol*, 2014, 450-451:165-173). В некоторых

вариантах осуществления клетка передает по меньшей мере один кольцевой полирибонуклеотид дочерним клеткам с эффективностью, составляющей по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%. В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергающаяся мейозу, передает кольцевой полирибонуклеотид дочерним клеткам с эффективностью, составляющей по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%. В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергающаяся митозу, передает кольцевой полирибонуклеотид дочерним клеткам с эффективностью, составляющей по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

Дополнительные примеры стабильности и периода полужизни кольцевых полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, описаны в параграфах [0308] – [0309] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Модификации

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит одну или несколько посттранскрипционных модификаций (например, кэпирование, расщепление, полиаденилирование, сплайсинг, последовательность поли(A), метилирование, ацилирование, фосфорилирование, метилирование лизиновых и аргининовых остатков, ацетилирование и нитрозилирование тиольных групп и тирозиновых остатков и т. д.). Одна или несколько посттранскрипционных модификаций могут представлять собой любую посттранскрипционную модификацию, такую как любая из более чем ста отличающихся модификаций нуклеозидов, которые были идентифицированы в РНК (Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J. (1999). *The RNA Modification Database: 1999 update*. *Nucl Acids Res* 27: 196-197). В некоторых вариантах осуществления первая выделенная нуклеиновая кислота содержит матричную РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере один нуклеозид, выбранный из группы нуклеозидов, такой как нуклеозиды, описанные в [0311] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

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

В некоторых вариантах осуществления модификация может включать модификацию, индуцированную химическим путем или в клетке. Например, некоторые неограничивающие примеры модификаций внутриклеточной РНК описаны Lewis и Pan в "RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions" в Nat Reviews Mol Cell Biol, 2017, 18:202-210.

В некоторых вариантах осуществления химические модификации рибонуклеотидов кольцевого полирибонуклеотида могут приводить к усилению ускользания от иммунологического надзора. Кольцевой полирибонуклеотид может быть синтезирован и/или модифицирован с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, таких как описанные в работе "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование (моно-, ди- и три-), конъюгирование, инвертированные связи и т. д.), 3'-концевые модификации

(конъюгирование, ДНК-нуклеотиды, инвертированные связи и т. д.), модификации оснований (например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары оснований с расширенным спектром партнеров), удаление оснований (нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями) или конъюгированные основания. Модифицированные рибонуклеотидные основания также могут включать 5-метилцитидин и псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модификации оснований могут приводить к модулированию экспрессии, иммунного ответа, стабильности, субклеточной локализации в числе прочих функциональных эффектов в отношении кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления модификация включает биортогональный нуклеотид, например неприродное основание. См., например, работу Kimoto et al, Chem Commun (Camb), 2017, 53:12309, DOI: 10.1039/c7cc06661a, которая включена в данный документ посредством ссылки.

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

Модифицированные остовы кольцевых полирибонуклеотидов могут включать, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, как, например, 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, такие как 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их аналоги, содержащие 2'-5'-связи, а также те, которые

характеризуются инвертированной полярностью, где расположенные рядом пары нуклеозидных звеньев связаны в направлении от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть отрицательно или положительно заряжен.

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

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

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

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

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

Кольцевой полирибонуклеотид может быть или не быть однородно модифицированным по всей длине молекулы. Например, один или несколько или все типы нуклеотидов (например, встречающиеся в природе нуклеотиды, пурины или пиримидины или любые один или несколько или все из A, G, U, C, I, pU) могут быть или не быть однородно модифицированными в кольцевом полирибонуклеотиде или в заданной предварительно определенной области его последовательности. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит инозин, который может способствовать определению иммунной системой кольцевого полирибонуклеотида как эндогенного по сравнению с вирусными РНК. Включение инозина также может опосредовать улучшение стабильности/снижение уровня разрушения РНК. См., например, работу Yu, Z. et al. (2015) RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as "self". Cell Res. 25, 1283–1284, включенную посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в кольцевом полирибонуклеотиде (или в указанной области его последовательности) являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления модификация может

включать m6A, который может усиливать экспрессию; инозин, который может ослаблять иммунный ответ; псевдоуридин, который может повышать стабильность РНК или обеспечивать сквозное прочитывание при трансляции (сдвигающий элемент), m5C, который может обеспечивать повышение стабильности; а также 2,2,7-триметилгуанозин, который способствует субклеточной транслокации (например, ядерной локализации).

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

Структура

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит структуру высшего порядка, например вторичную или третичную структуру. В некоторых вариантах осуществления комплементарные сегменты кольцевого полирибонуклеотида сворачиваются в двухнитевой сегмент, удерживаясь вместе посредством водородных связей в парах, например A-U и C-G. В некоторых вариантах осуществления спирали, также известные как стебли, образуются внутри молекулы и имеют двухнитевой сегмент, соединенный с концевой петлей. В некоторых вариантах осуществления кольцевой

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

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида содержат по сути однонитевые области в противоположность двухнитевым областям. В некоторых вариантах осуществления соотношение однонитевых и двухнитевых областей может влиять на функциональные свойства кольцевого полирибонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида являются по сути однонитевыми. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько последовательностей кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути однонитевыми, могут содержать сайт связывания белка или РНК. В некоторых вариантах осуществления последовательности кольцевого полирибонуклеотида, которые являются по сути однонитевыми, могут быть конформационно гибкими для обеспечения возможности повышенной интенсивности взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления последовательность кольцевого полирибонуклеотида специально сконструирована для включения таких вторичных структур для связывания или повышения уровня связывания белка или нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сайт связывания, например по меньшей мере один сайт связывания белка, по меньшей мере один сайт связывания miRNA, по меньшей мере один сайт связывания lncRNA, по меньшей мере один сайт связывания тРНК, по меньшей мере один сайт связывания рРНК, по меньшей мере один сайт связывания snRNA, по меньшей мере один сайт связывания siRNA, по меньшей мере один сайт связывания piRNA, по меньшей мере один сайт связывания snoRNA, по меньшей мере один сайт связывания snRNA, по меньшей мере один сайт связывания exRNA, по меньшей мере один сайт связывания

scaRNA, по меньшей мере один сайт связывания Y-РНК, по меньшей мере один сайт связывания hnRNA и/или по меньшей мере один мотив тРНК.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид имеет структуру более высокого порядка, которая описана в международной публикации заявки на патент № WO2019/118919A1, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Способы получения

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе и может быть получена с использованием рекомбинантной технологии (например, получена in vitro с применением ДНК-плазмиды), химического синтеза или их комбинации.

В объем настоящего изобретения входит то, что молекула ДНК, используемая для образования кольцевой РНК, может содержать последовательность ДНК из встречающейся в природе исходной последовательности нуклеиновой кислоты, ее модифицированный вариант или последовательность ДНК, кодирующую синтетический полипептид, обычно не обнаруживаемый в природе (например, химерные молекулы или слитые белки, такие как слитые белки, содержащие несколько иммуногенов). Молекулы ДНК и РНК могут быть модифицированы с использованием различных методик, в том числе без ограничения классических методик мутагенеза и рекомбинантных методик, таких как сайт-направленный мутагенез, химическая обработка молекулы нуклеиновой кислоты с целью индукции мутаций, расщепление фрагмента нуклеиновой кислоты ферментом рестрикции, лигирование фрагментов нуклеиновой кислоты, амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или мутагенез выбранных областей последовательности нуклеиновой кислоты, синтез смесей олигонуклеотидов и лигирование групп смесей для "создания" смеси молекул нуклеиновой кислоты и их комбинаций.

Кольцевой полирибонуклеотид может быть получен в соответствии с любой доступной методикой, в том числе без ограничения с помощью химического синтеза и ферментативного синтеза. В некоторых вариантах осуществления линейную первичную конструкцию или линейную мРНК можно подвергнуть циклизации или конкатемеризации для создания кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе. Механизм циклизации или конкатемеризации можно осуществлять с помощью таких

способов, как, без ограничения, химические, ферментативные способы, способы лигирования с помощью шунта или рибозимного катализа. Новообразовавшаяся 5'-/3'-связь может представлять собой внутримолекулярную связь или межмолекулярную связь.

Способы получения кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, описаны, например, в работе Khudyakov & Fields, Artificial DNA: Methods and Applications, CRC Press (2002); в Zhao, Synthetic Biology: Tools and Applications, (первое издание), Academic Press (2013); и Egli & Herdewijn, Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids, (первое издание), Wiley-VCH (2012).

В уровне техники также описаны различные способы синтеза кольцевых полирибонуклеотидов (см., например, патент США № US6210931, патент США № US5773244, патент США № US5766903, патент США № US5712128, патент США № US5426180, публикацию заявки на патент США № US20100137407, международную публикацию № WO1992001813 и международную публикацию № WO2010/084371; содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Циркуляризация

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации может быть подвергнут циклизации или конкатемеризации. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации может быть подвергнут циклизации in vitro перед составлением и/или доставкой. В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации может быть подвергнут циклизации внутри клетки.

Внеклеточная циркуляризация

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

нуклеотид с 3'-концевой аминогруппой на 3'-конце линейной молекулы РНК будет вступать в нуклеофильную атаку на 5'-концевой сложноэфирный NHS-компонент с образованием новой 5'-/3'-амидной связи.

В некоторых вариантах осуществления применяют ДНК- или РНК-лигазу для ферментативного связывания 5'-фосфорилированной молекулы нуклеиновой кислоты (например, линейного полирибонуклеотида для циркуляризации) с 3'-гидроксильной группой нуклеиновой кислоты (например, линейной нуклеиновой кислоты) с образованием новой фосфодиэфирной связи. В приводимой в качестве примера реакции линейный полирибонуклеотид для циркуляризации инкубируют при 37°C в течение 1 часа с 1-10 единицами РНК-лигазы T4 (New England Biolabs, Ипсвич, штат Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя. Реакция лигирования может происходить в присутствии линейной нуклеиновой кислоты, способной к образованию пар оснований как с 5'-, так и с 3'-областями, расположенными рядом друг с другом, для содействия реакции ферментативного лигирования. В некоторых вариантах осуществления лигирование представляет собой лигирование с помощью шунта. Например, для лигирования с помощью шунта может использоваться лигаза для шунта, такая как лигаза SplintR®. Для лигирования с помощью шунта можно сконструировать однонитевой полинуклеотид (шунт), такой как однонитевая РНК, для гибридизации с обоими концами линейного полирибонуклеотида, так что эти два конца могут быть расположены рядом друг с другом при гибридизации с однонитевым шунтом. Таким образом, лигаза для шунта может катализировать лигирование двух концов линейного полирибонуклеотида, расположенных рядом друг с другом, с образованием кольцевого полирибонуклеотида.

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления линейный полирибонуклеотид для циркуляризации может содержать 5'-трифосфат нуклеиновой кислоты, превращенный в 5'-монофосфат, например, путем приведения 5'-трифосфата в контакт с РНК-5'-пирофосфогидролазой (RppH) или АТР-дифосфогидролазой (апиразой). В качестве альтернативы, превращение 5'-трифосфата линейного полирибонуклеотида для циркуляризации в 5'-монофосфат может происходить посредством двухстадийной реакции, включающей: (a) приведение 5'-нуклеотида линейного полирибонуклеотида для циркуляризации в контакт с фосфатазой (например, антарктической фосфатазой, щелочной фосфатазой креветки или кишечной фосфатазой теленка) для удаления всех трех фосфатных остатков; и (b) приведение 5'-нуклеотида после стадии (a) в контакт с киназой (например, полинуклеотидкиназой), которая обеспечивает добавление одного фосфатного остатка.

В некоторых вариантах осуществления эффективность циркуляризации в способах циркуляризации, представленных в данном документе, составляет по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере

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

Сплайсинговый элемент

В некотором варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сплайсинговый элемент. Иллюстративные сплайсинговые элементы описаны в параграфах [0270] – [0275] международной публикации заявки на патент № WO2019/118919, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере один сплайсинговый элемент. В кольцевом полирибонуклеотиде, представленном в данном документе, сплайсинговый элемент может представлять собой полный сплайсинговый элемент, который может опосредовать сплайсинг кольцевого полирибонуклеотида. В качестве альтернативы, сплайсинговый элемент может также представлять собой остаточный сплайсинговый элемент после завершенного события сплайсинга. Например, в некоторых случаях сплайсинговый элемент линейного полирибонуклеотида может опосредовать событие сплайсинга, которое приводит к циркуляризации линейного полирибонуклеотида, в результате чего полученный кольцевой полирибонуклеотид содержит остаточный сплайсинговый элемент после

такого события циркуляризации, опосредованной сплайсингом. В некоторых случаях остаточный сплайсинговый элемент не способен опосредовать сплайсинг. В других случаях остаточный сплайсинговый элемент по-прежнему может опосредовать сплайсинг при определенных обстоятельствах. В некоторых вариантах осуществления сплайсинговый элемент расположен рядом с по меньшей мере одной экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит сплайсинговый элемент рядом с каждой экспрессионной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления сплайсинговый элемент расположен с одной или обеих сторон от каждой экспрессионной последовательности, что приводит к разделению продуктов экспрессии, например, пептида(пептидов) и/или полипептида(полипептидов).

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать самосплайсирующийся элемент. Например, кольцевой полирибонуклеотид может содержать интрон из цианобактерии рода Anabaena.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность, которая опосредует самолигирование. В одном варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность HDV (например, последовательность консервативного репликативного домена HDV, GGCUCAUCUCGACAAGAGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUUCUGUAAAG AGGAGACUGCUGGACUCGCCGCCCAAGUUCGAGCAUGAGCC (SEQ ID NO: 5) или GGCUAGAGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUUCUGUAAAGAGGAGACUG CUGGACUCGCCGCCCGAGCC (SEQ ID NO: 6), для самолигирования. В одном варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать последовательность петли E (например, в PSTVd) для самолигирования. В другом варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид может содержать самоциркуляризующийся интрон, например 5'- и 3'-границы сплайсинга, или самоциркуляризующийся каталитический интрон, такой как интроны группы I, группы II или группы III. Неограничивающие примеры последовательностей самосплайсирующихся интронов группы I могут включать самосплайсирующиеся последовательности с циклическими перестановками интронов и экзонов, полученные из гена td бактериофага T4, и вставочные последовательности (IVS) рРНК Tetrahymena.

Другие способы циркуляризации

В некоторых вариантах осуществления линейные полирибонуклеотиды для циркуляризации могут содержать комплементарные последовательности, в том числе повторяющиеся либо неповторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты в отдельных интронах или среди фланкирующих интронов. Повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты представляют собой последовательности, которые встречаются в сегменте кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления повторяющаяся нуклеотидная последовательность включает последовательности поли(CA) или поли(UG). В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере одну повторяющуюся последовательность нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит от 1 до 10 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10) повторяющихся последовательностей нуклеиновой кислоты, которые гибридизируются с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид содержит 2 повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты, которые гибридизируются с комплементарной повторяющейся последовательностью нуклеиновой кислоты в другом сегменте кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированный сегмент образует внутреннюю двойную нить. В некоторых вариантах осуществления повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты и комплементарные повторяющиеся последовательности нуклеиновой кислоты из двух отдельных кольцевых полирибонуклеотидов гибридизируются с образованием одного кольцевого полирибонуклеотида, при этом гибридизированные сегменты образуют внутренние двойные нити. В некоторых вариантах осуществления комплементарные последовательности находятся на 5'- и 3'-концах линейных полирибонуклеотидов для циркуляризации. В некоторых вариантах осуществления комплементарные

последовательности содержат приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, или больше пар нуклеотидов.

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

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

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

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

Очистка кольцевых полирибонуклеотидов

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид подвергают очистке, например удаляют свободные рибонуклеиновые кислоты, линейную РНК или РНК с однонитевым разрывом, ДНК, белки и т. д. В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут быть очищены посредством любого известного способа, обычно используемого в данной области техники. Неограничивающие примеры

способов очистки включают колоночную хроматографию, вырезание из геля, исключение по размеру и т. д.

Выявление линейной и кольцевой РНК

Присутствие линейной РНК в фармацевтических препаратах на основе кольцевой РНК может иметь неожиданные и иногда нежелательные эффекты. Таким образом, кольцевые РНК могут быть обогащены, отделены и/или очищены по сравнению с линейными РНК; способы (например, способы изготовления препаратов на основе кольцевой РНК), с помощью которых линейные РНК можно подвергать мониторингу, оценивать и/или контролировать, и способы применения таких фармацевтических композиций и препаратов, например, для доставки эффектора, такого как терапевтический эффектор или каркас (например, последовательность аптамера), в клетку, ткань или субъекту. В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевой РНК характеризуется не более пороговым уровнем линейной РНК, например, препарат на основе кольцевой РНК обогащен линейной РНК или очищен для снижения количества линейной РНК.

Обычно выявление и количественное определение элемента в фармацевтическом препарате включает применение эталонного стандарта, который представляет собой либо представляющий интерес компонент (например, кольцевую РНК, линейную РНК, фрагмент, примесь и т. п.), либо аналогичный материал (например, с применением линейной структуры РНК той же последовательности, что и кольцевая структура РНК, в качестве стандарта для кольцевой РНК), или включает применение внутреннего стандарта или сигнала от тестируемого образца. В некоторых вариантах осуществления стандарт применяется для определения отклика детектора на известное или относительное количество материала (коэффициент отклика). В некоторых вариантах осуществления коэффициент отклика определяется по стандарту при одной или нескольких концентрациях (например, с применением линейного регрессионного анализа). В некоторых вариантах осуществления коэффициент отклика затем применяется для определения количества представляющего интерес материала по сигналу, обусловленному этим компонентом. В некоторых вариантах осуществления коэффициент отклика имеет значение, равное единице, или предполагается, что оно имеет значение, равное единице.

В некоторых вариантах осуществления выявление и количественное определение линейной РНК и кольцевой РНК в фармацевтической композиции осуществляют с помощью сравнения с линейной версией кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых

вариантах осуществления общую массу рибонуклеотида в фармацевтической композиции определяют с применением стандартной кривой, построенной с применением линейной версии кольцевого полирибонуклеотида и исходя из предположения, что коэффициент отклика равен единице. В некоторых вариантах осуществления процент вес./вес. кольцевого полирибонуклеотида в фармацевтическом препарате определяют путем сравнения стандартной кривой, построенной по интенсивностям полос нескольких известных количеств линейной версии кольцевого полирибонуклеотида, с интенсивностью полос кольцевого полирибонуклеотида в фармацевтическом препарате. В некоторых вариантах осуществления полосы получают во время электрофореза на основе геля, и интенсивность полос измеряют с помощью устройства для визуализации геля (например, E-gel Imager). В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида содержит меньше порогового количества (например, где пороговое количество является эталонным критерием, например, фармацевтической спецификацией для выпуска для препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) молекул линейных полирибонуклеотидов при оценке, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления выявление и количественное определение РНК с однонитевым разрывом по сравнению с общим количеством РНК в фармацевтической композиции осуществляют путем секвенирования после экстракции из геля препарата, содержащего кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления выявление и количественное определение РНК с однонитевым разрывом по сравнению с линейной РНК в фармацевтической композиции осуществляют путем секвенирования после экстракции из геля препарата, содержащего кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида содержит меньше порогового количества (например, где пороговое количество является эталонным критерием, например, фармацевтической спецификацией выпуска для препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) РНК с однонитевым разрывом, линейной РНК или комбинированной линейной и РНК с однонитевым разрывом при оценке, как описано в настоящем документе. Например, эталонный критерий количества молекул линейных полирибонуклеотидов, присутствующих в препарате, составляет не более 30%, 20%, 15%, 10%, 1%, 0,5% или 0,1% молекул линейных полирибонуклеотидов или любое промежуточное процентное значение относительно общего количества молекул рибонуклеотидов в препарате. В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом,

присутствующих в препарате, составляет не более 30%, 20%, 15%, 10%, 1%, 0,5% или 0,1% или любое промежуточное процентное значение молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом относительно общего количества молекул рибонуклеотидов в препарате. В некоторых вариантах осуществления эталонный критерий количества молекул линейных полирибонуклеотидов и молекул полирибонуклеотидов с однонитевым разрывом, присутствующих в препарате, составляет не более 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 1%, 0,5% или 0,1% или любое промежуточное процентное значение комбинированных молекул линейного полирибонуклеотида и полирибонуклеотида с однонитевым разрывом относительно общего количества молекул рибонуклеотидов в препарате.

В некоторых вариантах осуществления стандарт анализируют в тех же условиях, что и образец. Например, стандарт анализируют с использованием геля того же типа, того же буфера и с той же экспозиции, что и образец. В дополнительных вариантах осуществления стандарт анализируют параллельно с образцом. В некоторых вариантах осуществления количественное определение элемента повторяют (например, дважды или трижды) во множестве образцов из исследуемого препарата для получения среднего результата. В некоторых вариантах осуществления количественное определение линейной РНК проводят с применением параллельного капиллярного электрофореза (например, с применением Fragment Analyzer или аналитической HPLC с УФ-детекцией).

Способы очистки

Кольцевые полирибонуклеотиды могут быть отделены, обогащены или очищены от нежелательных веществ (таких как нежелательные (например, линейные) РНК, ферменты, ДНК). В некоторых вариантах осуществления нежелательные вещества присутствуют или возникают в процессе получения и/или изготовления кольцевых полирибонуклеотидов. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть обогащены и/или очищены перед введением в состав фармацевтического препарата, фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта. Кольцевые полирибонуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть обогащены и/или очищены во время или после введения в состав фармацевтического препарата, фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть очищен во время или после получения с удалением нежелательных элементов, например,

линейной РНК или РНК с однонитевым разрывом, а также обнаруженных примесей, например, свободных рибонуклеиновых кислот (например, монорибонуклеиновых кислот, дирибонуклеиновых кислот или тририбонуклеиновых кислот), ДНК (например, ДНК клетки, такой как ДНК клетки-хозяина), клеточных или технологических белковых примесей, (например, клеточных или технологических белковых примесей) и т. п. В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой технологическую примесь. В некоторых вариантах осуществления технологическая примесь представляет собой белок (например, клеточный белок), нуклеиновую кислоту (например, нуклеиновую кислоту клетки), буфер или буферный реагент, фермент, компонент среды/реагента (например, среду, добавку к среде, переходный металл или витамин), компонент препаративного или аналитического геля (например, остатки акриламида), ДНК или хроматографический материал. Буферный реагент может представлять собой $MgCl_2$, DTT, АТФ, SDS, Na, гликоген, Tris-HCL или EtOH. Буферный реагент может включать без ограничения ацетат, Tris, бикарбонат, фосфат, лимонную кислоту, лактат или ТЭА. Фермент может представлять собой лигазу. Лигаза может представлять собой РНК-лигазу 2 Т4. В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой буферный реагент, компонент среды/реагента, соль, лигазу, нуклеазу, ингибитор РНКазы, РНКазу R, молекулы линейных полирибонуклеотидов, молекулы дезоксирибонуклеотидов, остатки акриламида или молекулы мононуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления кольцевые полирибонуклеотиды могут быть обогащены или очищены посредством любого известного способа, обычно используемого в данной области техники. Неограничивающие примеры способов очистки включают колоночную хроматографию, вырезание из геля, исключение по размеру и т. д.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид очищают с помощью геля. Например, кольцевая РНК может быть отделена на денатурирующем PAGE, и полосы, соответствующие кольцевым РНК, могут быть вырезаны, и кольцевая РНК может быть элюирована из полосы с применением известных способов. Затем можно проанализировать элюированную кольцевую РНК.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид очищают с помощью хроматографии, например, хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), смешанной хроматографии, жидкостной хроматографии, например, ионно-парной хроматографии с обращенной фазой (IP-RP), ионообменной хроматографии (IE), аффинной хроматографии (АС) и эксклюзионной хроматографии (ЭХ) и любых их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид очищают, используя структурную особенность кольцевого полирибонуклеотида для его отделения от линейной РНК или примеси. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид очищают, используя структурную особенность (например, отсутствие свободных концов). Например, кольцевую РНК обогащают из препарата, содержащего смешанный пул кольцевой РНК и эквивалента в форме линейной РНК, содержащих одинаковые нуклеотидные последовательности, с применением полиаденилирования эквивалента в форме линейной РНК или его фрагментов. 3'-конец эквивалента в форме линейной РНК или его фрагментов можно подвергать полиаденилированию с применением поли(А)-полимеразы, что приводит в результате к добавлению 3'-полиаденинового хвоста. В некоторых вариантах осуществления 3'-полиадениновый хвост позволяет проводить соосаждение линейной РНК и ее фрагментов с применением колонки, такой как аффинная колонка, для обогащения кольцевой РНК. Поли(А)-полимераза также может содержать модифицированные аденины, такие как биотинилированный аналог N6-АТФ. Данное добавление биотинилированного аналога N6-АТФ в 3'-полиадениновый хвост делает возможным соосаждение линейной РНК и ее фрагментов в такой системе, как система связывания биотин-стрептавидин. В отличие от этого, кольцевая РНК не имеет 3'-конца и, следовательно, не подвергается полиаденилированию с помощью поли(А)-полимеразы, не имеет полиаденилированного хвоста для конъюгации и не захватывается при соосаждении. Следовательно, кольцевая РНК в препарате после соосаждения обогащается.

В некоторых вариантах осуществления циклический полирибонуклеотид очищают, используя структурную особенность линейной РНК (например, наличие свободных концов). Например, кольцевую РНК обогащают из препарата, содержащего смешанный пул кольцевой РНК и эквивалента в форме линейной РНК, содержащих одинаковые нуклеотидные последовательности, с применением полиаденилирования эквивалента в форме линейной РНК. Экзонуклеазы можно добавить к смешанному пулу для гидролиза линейной РНК. В некоторых вариантах осуществления экзонуклеаза может представлять собой 3'-экзонуклеазу или 5'-экзонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления можно применять 3'-экзонуклеазу и 5'-экзонуклеазу.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) составляет по меньшей мере 25%

(вес./вес.), 30% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 50% (вес./вес.), 60% (вес./вес.), 70% (вес./вес.), 80% (вес./вес.), 85% (вес./вес.), 90% (вес./вес.), 91% (вес./вес.), 92% (вес./вес.), 93% (вес./вес.), 94% (вес./вес.), 95% (вес./вес.), 96% (вес./вес.), 97% (вес./вес.), 98% (вес./вес.), 99% (вес./вес.) или 100% (вес./вес.) чистоты в расчете на массу. Чистота может быть измерена любым из ряда аналитических методов, известных специалистам в данной области техники, таких как, без ограничения, применение технологий разделения, таких как хроматография (с применением колонки, с применением бумаги, с применением геля, с применением HPLC, с применением UHPLC и т. д., или с помощью IC, с помощью SEC, с помощью обращенной фазы, с помощью анионного обмена, с помощью смешанного режима и т. д.) или электрофореза (UREA PAGE, на основе чипа, полиакриламидного геля, РНК, капилляра, c-IEF и т. д.) с применением или без применения методологий дериватизации до или после разделения с применением методик выявления, основанных на масс-спектрометрии, спектрометрии в УФ-видимой области, флуоресценции, светорассеянии, показателе преломления или с применением окрашивания серебром или красителем, или радиоактивного распада для выявления. В качестве альтернативы, чистоту можно определить без применения технологии разделения с помощью масс-спектрометрии, микроскопии, спектроскопии кругового дихроизма (CD), спектрофотометрии в УФ- или УФ-видимой области, флуориметрии (например, Qubit), с помощью анализа с использованием РНКазы H, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или с помощью способов, в которых для выявления используется окрашивание серебром или красителем, или радиоактивный распад.

В некоторых вариантах осуществления чистота может быть измерена с помощью методологий биологических испытаний (например, испытаний на основе клеток или рецепторов). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 25% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 50% (вес./вес.), 60% (вес./вес.), 70% (вес./вес.), 80% (вес./вес.), 85% (вес./вес.), 90% (вес./вес.), 91% (вес./вес.), 92% (вес./вес.), 93% (вес./вес.), 94% (вес./вес.), 95% (вес./вес.), 96% (вес./вес.), 97% (вес./вес.), 98% (вес./вес.), 99% (вес./вес.) или 100% (вес./вес.) общей массы рибонуклеотида в препарате, описанном в данном документе, содержится в молекулах кольцевых полирибонуклеотидов. Процентное содержание может быть измерено любым из ряда аналитических методов, известных специалистам в данной области техники, таких как, без ограничения, применение технологии разделения, такой как хроматография (с применением колонки, с применением бумаги, с применением геля, с применением HPLC, с применением UHPLC и т. д., или с помощью IC, с помощью SEC, с помощью обращенной фазы, с помощью

анионного обмена, с помощью смешанного режима и т. д.) или электрофореза (UREA PAGE, на основе чипа, полиакриламидного геля, РНК, капилляра, c-IEF и т. д.) с применением или без применения методологий дериватизации до или после разделения с применением методик выявления, основанных на масс-спектрометрии, спектрометрии в УФ-видимой области, флуоресценции, светорассеянии, показателе преломления или с применением окрашивания серебром или красителем, или радиоактивного распада для выявления. В качестве альтернативы, чистоту можно определить без применения технологий разделения с помощью масс-спектрометрии, микроскопии, спектроскопии кругового дихроизма (CD), спектрофотометрии в УФ- или УФ-видимой области, флуориметрии (например, Qubit), с помощью анализа с использованием РНКазы H, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или с помощью способов, в которых для выявления используется окрашивание серебром или красителем, или радиоактивный распад.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется концентрацией кольцевого полирибонуклеотида, составляющей по меньшей мере 0,1 нг/мл, 0,5 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 50 нг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1000 мкг/мл, 5000 мкг/мл, 10000 мкг/мл, 100000 мкг/мл, 200 мг/мл, 300 мг/мл, 400 мг/мл, 500 мг/мл, 600 мг/мл, 650 мг/мл, 700 мг/мл или 750 мг/мл. В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) является по сути свободным от мононуклеотида или характеризуется содержанием мононуклеотида, составляющим не более 1 пг/мл, 10 пг/мл, 0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 мкг/мл, 5000 мкг/мл, 10000 мкг/мл или 100000 мкг/мл. В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется содержанием

мононуклеотида, составляющим от предела обнаружения до 1 пг/мл, 10 пг/мл, 0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 мкг/мл, 5000 мкг/мл, 10000 мкг/мл или 100000 мкг/мл.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется содержанием мононуклеотида, составляющим не более 0,1% (вес./вес.), 0,2% (вес./вес.), 0,3% (вес./вес.), 0,4% (вес./вес.), 0,5% (вес./вес.), 0,6% (вес./вес.), 0,7% (вес./вес.), 0,8% (вес./вес.), 0,9% (вес./вес.), 1% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 25% (вес./вес.), 30% (вес./вес.) или любое промежуточное процентное значение от общего количества нуклеотидов в расчете на массу, где общее содержание нуклеотида представляет собой общую массу молекул дезоксирибонуклеотидов и молекул рибонуклеотидов.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется содержанием линейной РНК, например, эквивалента в форме линейной РНК или фрагментов РНК, составляющим не более 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл, 1 мкг/ мл, 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 г/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл, 600 мкг/мл, 700 мкг/мл, 800 мкг /мл, 900 мкг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл, 300 мг/мл, 400 мг/мл, 500 мг/мл, 600 мг/мл, 650 мг/мл, 700 мг/мл или 750 мг/мл. В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется содержанием линейной РНК, например, эквивалента в форме линейной РНК или фрагментов РНК, составляющим от предела обнаружения до 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл,

400 нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 г/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл, 600 мкг/мл, 700 мкг/мл, 800 мкг/мл, 900 мкг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл, 300 мг/мл, 400 мг/мл, 500 мг/мл, 600 мг/мл, 650 мг/мл, 700 мг/мл или 750 мг/мл.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется содержанием РНК с однонитевым разрывом, составляющим не более 10% (вес./вес.), 9,9% (вес./вес.), 9,8% (вес./вес.), 9,7% (вес./вес.), 9,6% (вес./вес.), 9,5% (вес./вес.), 9,4% (вес./вес.), 9,3% (вес./вес.), 9,2% (вес./вес.), 9,1% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.), 0,5% (вес./вес.) или 0,1% (вес./вес.) или промежуточное процентное значение. В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется минимальным содержанием РНК с однонитевым разрывом, которое составляет вплоть до нуля, или является по сути свободным от РНК с однонитевым разрывом.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется содержанием комбинированной линейной РНК и РНК с однонитевым разрывом, составляющим не более 70% (вес./вес.), 60% (вес./вес.), 50% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 25% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.), 0,5% (вес./вес.) или 0,1% (вес./вес.) или промежуточное процентное значение. В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется содержанием комбинированной линейной РНК и РНК с однонитевым разрывом, которое составляет вплоть до нуля, или является по сути свободным от РНК с однонитевым разрывом или линейной РНК.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется содержанием линейной РНК, например, эквивалента в форме линейной РНК или фрагментов РНК, равным не более предела обнаружения аналитических методологий, таких как способы, использующие масс-спектрометрию, УФ-спектроскопические или флуоресцентные детекторы, методики светорассеяния, поверхностный плазмонный резонанс (SPR) с применением или без применения способов разделения, включая HPLC, с помощью HPLC, чип- или гель-электрофорез с или без методологий дериватизации до или после разделения, методов обнаружения, в которых применяется окрашивание серебром или красителем или радиоактивный распад, или микроскопии, способов визуализации или спектрофотометра.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) содержит не более 0,1% (вес./вес.), 1% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 25% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 35% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 45% (вес./вес.), 50% (вес./вес.) линейной РНК, например, как измерено с помощью способов в примере 2.

В некоторых вариантах осуществления молекулы линейных полирибонуклеотидов препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида предусматривают линейный эквивалент молекулы кольцевого полирибонуклеотида или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекулы линейных полирибонуклеотидов препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида предусматривают линейный эквивалент (например, версию, предшествующую циркуляризованной версии). В некоторых вариантах осуществления молекулы линейных полирибонуклеотидов препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида предусматривают неэквивалент кольцевого полирибонуклеотида или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекулы линейных полирибонуклеотидов препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида предусматривают неэквивалент кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления молекулы линейного полирибонуклеотида предусматривают комбинацию эквивалента кольцевого полирибонуклеотида и неэквивалента кольцевого

полирибонуклеотида или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления молекулы линейного полирибонуклеотида предусматривают комбинацию эквивалента кольцевого полирибонуклеотида и неэквивалента кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления фрагмент молекулы линейного полирибонуклеотида представляет собой фрагмент, который составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000 или более нуклеотидов в длину или любое промежуточное значение числа нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется значением соотношения поглощения A260/A280, составляющим от приблизительно 1,6 до приблизительно 2,3, например, измеренным с помощью спектрофотометра. В некоторых вариантах осуществления значение соотношения поглощения A260/A280 составляет приблизительно 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 или любое промежуточное значение числа. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется значением соотношения поглощения A260/A280, составляющим больше приблизительно 1,8, например, измеренным с помощью спектрофотометра. В некоторых вариантах осуществления значение соотношения поглощения A260/A280 составляет приблизительно 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или больше.

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) является по сути свободным от примеси. В различных вариантах осуществления уровень по меньшей мере одной примеси в композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, снижается на по меньшей мере 30% (вес./вес.), по меньшей мере 40% (вес./вес.), по меньшей мере 50 % (вес./вес.), по меньшей мере 60% (вес./вес.), по меньшей мере 70% (вес./вес.), по меньшей мере 80% (вес./вес.), по меньшей мере 90% (вес./вес.) или по меньшей мере 95% (вес./вес.) по сравнению с композицией до очистки или обработки для удаления примеси. В некоторых

вариантах осуществления уровень по меньшей мере одной технологической примеси снижается на по меньшей мере 30% (вес./вес.), по меньшей мере 40% (вес./вес.), по меньшей мере 50 % (вес./вес.), по меньшей мере 60% (вес./вес.), по меньшей мере 70% (вес./вес.), по меньшей мере 80% (вес./вес.), по меньшей мере 90% (вес./вес.) или по меньшей мере 95% (вес./вес.) по сравнению с композицией до очистки или обработки для удаления примеси. В некоторых вариантах осуществления уровень по меньшей мере одного родственного продукту вещества снижается на по меньшей мере 30% (вес./вес.), по меньшей мере 40% (вес./вес.), по меньшей мере 50 % (вес./вес.), по меньшей мере 60% (вес./вес.), по меньшей мере 70% (вес./вес.), по меньшей мере 80% (вес./вес.), по меньшей мере 90% (вес./вес.) или по меньшей мере 95% (вес./вес.) по сравнению с таковым для композиции до очистки или обработки для удаления примеси. В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) далее является по сути свободным от технологической примеси. В некоторых вариантах осуществления технологическая примесь предусматривает белок (например, белок клетки, такой как белок клетки-хозяина), дезоксирибонуклеиновую кислоту (например, дезоксирибонуклеиновую кислоту клетки, такую как дезоксирибонуклеиновая кислота клетки-хозяина), молекулы монодезоксирибонуклеотида или дидезоксирибонуклеотида, фермент (например, нуклеазу, такую как эндонуклеаза или экзонуклеаза, или лигаза), компонент реагента, компонент геля или хроматографический материал. В некоторых вариантах осуществления примесь выбрана из буферного реагента, лигазы, нуклеазы, ингибитора РНКазы, РНКазы R, молекул дезоксирибонуклеотидов, остатков акриламидного геля и молекул монодезоксирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат содержит белковое загрязнение (например, клеточный белок, такой как белок клетки-хозяина), составляющее менее 0,1 нг, 1 нг, 5 нг, 10 нг, 15 нг, 20 нг, 25 нг, 30 нг, 35 нг, 40 нг, 50 нг, 60 нг, 70 нг, 80 нг, 90 нг, 100 нг, 200 нг, 300 нг, 400 нг или 500 нг белкового загрязнения на миллиграмм (мг) молекул кольцевых полирибонуклеотидов.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) является по сути свободным от содержания ДНК, например, ДНК-матрицы или ДНК клетки (например, ДНК клетки-

хозяина), характеризуется содержанием ДНК, составляющим вплоть до нуля, или характеризуется содержанием ДНК, составляющим не более 1 пг/мл, 10 пг/мл, 0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 мкг/мл, 5000 мкг/мл, 10000 мкг/мл или 100000 мкг/мл.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) является по сути свободным от содержания ДНК, характеризуется содержанием ДНК, составляющим вплоть до нуля, или характеризуется содержанием ДНК, составляющим не более 0,001% (вес./вес.), 0,01% (вес./вес.), 0,1% (вес./вес.), 1% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 25% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 35% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 45% (вес./вес.), 50% (вес./вес.) от общего количества нуклеотидов в расчете на массу, где общее содержание молекул нуклеотидов представляет собой содержание общей массы молекул дезоксирибонуклеотидов и молекул рибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) является по сути свободным от содержания ДНК, характеризуется содержанием ДНК, составляющим вплоть до нуля, или характеризуется содержанием ДНК, составляющим не более 0,001% (вес./вес.), 0,01% (вес./вес.), 0,1% (вес./вес.), 1% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 25% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 35% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 45% (вес./вес.), 50% (вес./вес.) от общего количества нуклеотидов в расчете на массу, измеренным после полного расщепления ДНК ферментами, которые расщепляют нуклеозиды, с помощью количественной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS), в которой содержание ДНК получают обратным пересчётом с использованием стандартной кривой каждого основания (т. е. A, C, G, T), измеренной с помощью LC-MS.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве

препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) содержит белковое загрязнение (например, клеточный белок (CP), например, фермент, технологический белок, например, белок-носитель), составляющее не более 0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл или 500 нг/мл. В одном варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве кольцевого полирибонуклеотида) содержит белковое загрязнение (например, технологический белок, такой как клеточный белок (CP), например, фермент), составляющее от предела обнаружения до 0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 15 нг/мл, 20 нг/мл, 25 нг/мл, 30 нг/мл, 35 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл или 500 нг/мл.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) содержит белковое загрязнение (например, технологический белок, такой как клеточный белок (CP), например, фермент), составляющее менее 0,1 нг, 1 нг, 5 нг, 10 нг, 15 нг, 20 нг, 25 нг, 30 нг, 35 нг, 40 нг, 50 нг, 60 нг, 70 нг, 80 нг, 90 нг, 100 нг, 200 нг, 300 нг, 400 нг или 500 нг на миллиграмм (мг) кольцевого полирибонуклеотида. В одном варианте осуществления кольцевой полирибонуклеотид (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве кольцевого полирибонуклеотида) содержит белковое загрязнение (например, технологический белок, такой как клеточный белок (CP), например, фермент), составляющее от предела обнаружения до 0,1 нг/мл, 1 нг, 5 нг, 10 нг, 15 нг, 20 нг, 25 нг, 30 нг, 35 нг, 40 нг, 50 нг, 60 нг, 70 нг, 80 нг, 90 нг, 100 нг, 200 нг, 300 нг, 400 нг или 500 нг на миллиграмм (мг) кольцевого полирибонуклеотида.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) характеризуется низкими уровнями эндотоксинов или по сути не содержит эндотоксинов, например, при измерении в тесте с лизатом амебоцитов *Limulus*. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат, или композиция, или промежуточное соединение в производстве кольцевого

полирибонуклеотида содержат менее 20 ЕЭ/кг (вес), 10 ЕЭ/кг, 5 ЕЭ/кг, 1 ЕЭ/кг эндотоксина или не содержат эндотоксин при измерении в тесте с лизатом амебоцитов *Limulus*. В одном варианте осуществления композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида характеризуется низкими уровнями или отсутствием нуклеазы или лигазы.

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) содержит не более приблизительно 50% (вес./вес.), 45% (вес./вес.), 40% (вес./вес.), 35% (вес./вес.), 30% (вес./вес.), 25% (вес./вес.), 20% (вес./вес.), 19% (вес./вес.), 18% (вес./вес.), 17% (вес./вес.), 16% (вес./вес.), 15% (вес./вес.), 14% (вес./вес.), 13% (вес./вес.), 12% (вес./вес.), 11% (вес./вес.), 10% (вес./вес.), 9% (вес./вес.), 8% (вес./вес.), 7% (вес./вес.), 6% (вес./вес.), 5% (вес./вес.), 4% (вес./вес.), 3% (вес./вес.), 2% (вес./вес.), 1% (вес./вес.) по меньшей мере одного фермента, например, полимеразы, например, РНК-полимеразы.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) является стерильным или по сути свободным от микроорганизмов, например, композиция или препарат поддерживает рост менее чем 100 жизнеспособных микроорганизмов при тестировании в асептических условиях, композиция или препарат соответствует стандарту USP <71> и/или композиция или препарат соответствует стандарту USP <85>. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический препарат характеризуется биологической нагрузкой, составляющей менее 100 КОЕ/100 мл, 50 КОЕ/100 мл, 40 КОЕ/100 мл, 30 КОЕ/100 мл, 200 КОЕ/100 мл, 10 КОЕ/100 мл или 10 КОЕ/100 мл перед стерилизацией.

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида может быть дополнительно очищен с применением известных в данной области техники методов удаления примесей, таких как колоночная хроматография или инактивация pH/флакона.

В некоторых вариантах осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида обеспечивает пониженный уровень еще одного маркера иммунного или воспалительного ответа после введения субъекту, когда препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида прошел стадию очистки (или множество стадий очистки)

по сравнению с предшествующей(предшествующими) стадией(стадиями) очистки. В некоторых вариантах осуществления один или несколько маркеров иммунного или воспалительного ответа представляют собой цитокин или ген, связанный с иммунным ответом. В некоторых вариантах осуществления один или несколько маркеров иммунного или воспалительного ответа представляют собой экспрессию гена, такого как RIG-I, MDA5, PKR, IFN-бета, OAS и OASL.

В одном варианте осуществления препарат на основе кольцевого полирибонуклеотида (например, фармацевтический препарат или композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида или промежуточное соединение в производстве препарата на основе кольцевого полирибонуклеотида) обеспечивает экспрессию продукта экспрессии, например белка, например, трансляционную активность *in vitro*.

Доставка

Кольцевой или линейный полирибонуклеотид, описанные в данном документе, могут быть включены в фармацевтические композиции с носителем или без него.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены, например, таким образом, чтобы они содержали носитель, например фармацевтический носитель и/или полимерный носитель, например липосому, и доставляться посредством известных способов нуждающемуся в этом субъекту (например, человеку или отличному от человека сельскохозяйственному или домашнему животному, например крупному рогатому скоту, собаке, кошке, лошади, домашней птице). Такие способы включают без ограничения трансфекцию (например, опосредованную липидами, катионными полимерами, фосфатом кальция, дендримерами); электропорацию или другие способы разрушения мембран (например, нуклеофекцию), вирусную доставку (например, с помощью лентивируса, ретровируса, аденовируса, AAV), микроинъекцию, бомбардировку микрочастицами ("генную пушку"), использование FuGENE, прямую ультразвуковую нагрузку, сдавливание клеток, оптическую трансфекцию, слияние протопластов, импалефекцию, магнитофекцию, перенос, опосредованный экзосомами, перенос, опосредованный липидными наночастицами, и любую их комбинацию. Способы доставки также описаны, например, в работе Gori et al., Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. Human Gene Therapy. July 2015, 26(7): 443-451. doi:10.1089/hum.2015.074; и Zuris et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. Nat Biotechnol. 2014 Oct 30;33(1):73–80.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде может не содержать некоторых или всех реагентов из следующих: реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. Например, состав для доставки в "голом" виде может не содержать фитогликогена октенилсукцината, фитогликогена бета-декстрина, модифицированного ангидридом фитогликогена бета-декстрина, липофектамина, полиэтиленимина, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимина, аминогликозид-полиамина, дидезоксидиамино-b-циклодекстрина, спермина, спермидина, поли(2-диметиламино)этилметакрилата, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин),

катионизированного желатина, дендримеров, хитозана, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), хлорида N-[1 -(2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорида l-[2-(олеоилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолиния (DOTIM), трифторацетата 2,3-диолеоилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорида 3B-[N-(N\N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HCl), дигептадециламидоглицилспермидина (DOGS), бромида N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромида N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопротеина низкой плотности (LDL), липопротеина высокой плотности (HDL) или глобулина.

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

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде может содержать разбавитель, такой как разбавитель, приемлемый для парентерального введения. Разбавитель (например, разбавитель, приемлемый для парентерального введения) может представлять собой жидкий разбавитель или твердый разбавитель. В некоторых вариантах осуществления разбавитель (например, разбавитель, приемлемый для парентерального введения) может представлять собой средство для солюбилизации РНК, буфер или изотоническое средство. Примеры средства для солюбилизации РНК включают воду, этанол, метанол, ацетон, формамид и 2-пропанол. Примеры буфера включают 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), бис-Tris, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)-(карбоксиметил)амино]уксусную кислоту (ADA), N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфоновую кислоту (ACES), пиперазин-N,N′-бис(2-этансульфоновая кислота)

(PIPES), 2-[[1,3-дигидрокси-2-(гидроксиметил)пропан-2-ил]амино]этансульфоновую кислоту (TES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновую кислоту (MOPS), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), Tris, трицин, Gly-Gly, бицин или фосфат. Примеры изотонического средства включают глицерин, маннит, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, трегалозу или сахарозу.

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

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид вызывает уменьшенный нежелательный ответ иммунной системы хозяина или неспособен его вызывать по сравнению с ответом, запускаемым эталонным соединением, например, линейным полинуклеотидом, соответствующим описанному кольцевому полирибонуклеотиду, или кольцевым полирибонуклеотидом, в котором отсутствует инкриптоген. В вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид является неиммуногенным в организме хозяина. Некоторые виды иммунного ответа включают без ограничения виды гуморального иммунного ответа (например, выработку

иммуногенспецифических антител) и виды клеточноопосредованного иммунного ответа (например, пролиферацию лимфоцитов).

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления способ доставки представляет собой способ *in vivo*. Например, способ доставки кольцевого полирибонуклеотида, описанного в данном документе, включает парентеральное введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного вещества или фармацевтического лекарственного продукта, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В качестве другого примера способ доставки кольцевого полирибонуклеотида в клетку или ткань субъекта включает парентеральное введение в клетку или ткань фармацевтической композиции, фармацевтического лекарственного

вещества или фармацевтического лекарственного продукта, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид присутствует в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать биологический ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид присутствует в количестве, эффективном для оказания биологического эффекта на клетку или ткань субъекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, содержат носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт, описанные в данном документе, содержат разбавитель и не содержат какого-либо носителя.

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

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

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, фармацевтическое лекарственное вещество или фармацевтический лекарственный продукт вводят с помощью инъекции. Введение может являться системным введением или местным введением. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в

данном документе способов доставки осуществляется с использованием носителя. В некоторых вариантах осуществления любые описанные в данном документе способы доставки осуществляются без использования носителя или средства, способствующего проникновению в клетку.

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

Составы

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

В настоящем изобретении представлены иммуногенные композиции, содержащие кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе. В настоящем изобретении представлены иммуногенные композиции, содержащие линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе. Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут содержать разбавитель или носитель, адъювант или

любую их комбинацию. Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут также содержать одно или несколько иммунорегуляторных средств, например один или несколько адъювантов. Адъюванты могут включать адъювант TH1 и/или адъювант TH2, дополнительно описанные ниже. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит разбавитель, не содержащий какого-либо носителя, и применяется для доставки в "голом" виде кольцевого полирибонуклеотида субъекту. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит разбавитель, не содержащий какого-либо носителя, и применяется для доставки в "голом" виде линейного полирибонуклеотида субъекту.

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению применяются для повышения иммунного ответа у субъекта. Иммунный ответ предпочтительно является защитным и предпочтительно включает ответ в виде антител (обычно включая IgG) и/или клеточноопосредованный иммунный ответ. Например, субъекта иммунизируют иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид по настоящему изобретению, для индуцирования иммунного ответа. В качестве другого примера субъекта иммунизируют иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, содержащий иммуноген, для стимуляции выработки антител, которые связываются с иммуногеном. Повышая уровень иммунного ответа у субъекта с помощью этих путей применения и способов, можно обеспечить защиту субъекта от различных заболеваний и/или инфекций, например от бактериальных и/или вирусных заболеваний, обсуждаемых выше. В определенных вариантах осуществления иммуногенные композиции представляют собой вакцинные композиции. Вакцины согласно настоящему изобретению могут являться либо профилактическими (т. е. для предупреждения инфекции), либо терапевтическими (т. е. для лечения инфекции), но, как правило, являются профилактическими. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, например человека. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека. В других вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, например, выбранное из коровы (например, молочного и мясного скота), овцы, козы, свиньи, лошади, собаки или кошки. В других вариантах осуществления субъект представляет собой птицу, например курицу или петуха, индейку, попугая. В некоторых вариантах осуществления животное не представляет собой мышь, кролика или корову. В конкретном варианте осуществления, где иммуногенная композиция предназначена для профилактического

применения, человек представляет собой ребенка (например, ребенка ясельного возраста или ребенка грудного возраста) или подростка. В другом варианте осуществления, где иммуногенная композиция предназначена для терапевтического применения, человек представляет собой подростка или взрослого. Иммуногенная композиция, предназначенная для детей, может также вводиться взрослым, например, для оценки безопасности, дозировки, иммуногенности и т. д.

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

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

Иммунизация

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают иммунизацию субъекта иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуноген экспрессируется из кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует у субъекта иммунный ответ в отношении иммуногена, экспрессируемого с кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует иммунный ответ у субъекта (например, индуцирует выработку антител, которые связываются с иммуногеном, экспрессируемым с кольцевого полирибонуклеотида). В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию в одной композиции. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно

иммунизируют вторым адъювантом. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют вакциной.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают иммунизацию субъекта иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуноген экспрессируется из линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует у субъекта иммунный ответ в отношении иммуногена, экспрессируемого с линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует выработку антител, которые связываются с иммуногеном, экспрессируемым с линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммунизация индуцирует клеточноопосредованный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид и разбавитель, носитель, первый адъювант или их комбинацию в одной композиции. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют вторым адъювантом. В некоторых вариантах осуществления субъекта дополнительно иммунизируют вакциной.

Субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими любое количество кольцевых полирибонуклеотидов. Субъекта иммунизируют, например, одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 1 кольцевой полирибонуклеотид. Животное, отличное от человека, характеризующееся наличием негуманизированной иммунной системы, иммунизируют, например, одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов или большее число отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими не более 1 кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не более 10, не более 11, не более 12, не более 13, не более 14, не

более 15, не более 20 отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов или менее 21 отличающегося кольцевого полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 1 кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15 или приблизительно 20 отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-15, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 4-4, 4-3, 5-20, 5-15, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 5-10, 10-15, или 15-20 отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов. Отличающиеся кольцевые полирибонуклеотиды содержат последовательности, отличающиеся друг от друга. Например, они могут включать или кодировать отличающиеся иммуногены, перекрывающиеся иммуногены, сходные иммуногены или одни и те же иммуногены (например, с одинаковыми или отличающимися регуляторными элементами, последовательностями инициации, промоторами, терминирующими элементами или другими элементами по настоящему изобретению). В случаях, когда субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов, при этом два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов могут находиться в одной и той же или отличающихся иммуногенных композициях и иммунизацию ими осуществляют в одно и то же или в разное время. Иммуногенные композиции, содержащие два или больше отличающихся кольцевых полирибонуклеотидов, могут вводиться в одно и то же анатомическое место или в отличающиеся анатомические места.

Субъекта могут иммунизировать одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими любое количество линейных полирибонуклеотидов. Субъекта иммунизируют, например, одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 1 линейный полирибонуклеотид. Животное, отличное от человека, характеризующееся наличием негуманизированной

иммунной системы, иммунизируют, например, одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 отличающихся линейных полирибонуклеотидов или большее число отличающихся линейных полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими по меньшей мере 1 линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими не более 2, не более 3, не более 4, не более 5, не более 6, не более 7, не более 8, не более 9, не более 10, не более 11, не более 12, не более 13, не более 14, не более 15, не более 20 отличающихся линейных полирибонуклеотидов или менее 21 отличающегося линейного полирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 1 линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, характеризующееся наличием гуманизированной иммунной системы, иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15 или приблизительно 20 отличающихся линейных полирибонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими приблизительно 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-15, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 4-4, 4-3, 5-20, 5-15, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 5-10, 10-15, или 15-20 отличающихся линейных полирибонуклеотидов. Отличающиеся линейные полирибонуклеотиды могут содержать последовательности, отличающиеся друг от друга. Например, они могут включать или кодировать отличающиеся иммуногены, перекрывающиеся иммуногены, сходные иммуногены или одни и те же иммуногены (например, с одинаковыми или отличающимися регуляторными элементами, последовательностями инициации, промоторами, терминирующими

элементами или другими элементами по настоящему изобретению). В случаях, когда субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими два или больше отличающихся линейных полирибонуклеотидов, при этом два или больше отличающихся линейных полирибонуклеотидов могут находиться в одной или отличающихся иммуногенных композициях и иммунизацию ими осуществляют в одно и то же или в разное время. Иммуногенные композиции, содержащие два или больше отличающихся линейных полирибонуклеотидов, могут вводиться в одно и то же анатомическое место или в отличающиеся анатомические места.

Два или больше отличающихся линейных полирибонуклеотидов могут предусматривать или кодировать иммуногены из одного и того же источника, из отличающихся источников или из отличающихся комбинаций источников, раскрытых в данном документе. Два или больше отличающихся линейных полирибонуклеотидов могут предусматривать или кодировать иммуногены одного и того же вируса или отличающихся вирусов, например отличающихся изолятов.

В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими любое количество кольцевых полирибонуклеотидов, и одной или несколькими иммуногенными композициями, содержащими любое количество линейных полирибонуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция, раскрытая в данном документе, содержит один или несколько кольцевых полирибонуклеотидов и один или несколько линейных полирибонуклеотидов, раскрытых в данном документе.

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

В определенных вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят второй адъювант. Адъювант обеспечивает усиление врожденного иммунного ответа, который в свою очередь обеспечивает усиление адаптивного иммунного ответа у субъекта.

Адъювант может представлять собой любой адъювант, описанный ниже. В определенных вариантах осуществления адъювант составляют с кольцевым полирибонуклеотидом в качестве части иммуногенной композиции. В определенных вариантах осуществления адъювант не является частью иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В определенных вариантах осуществления адъювант вводят отдельно от иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В данном аспекте адъювант вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличающийся от момента времени введения иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полинуклеотид. Например, адъювант вводят через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов после иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или за любое промежуточное число минут или часов до иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Например, адъювант вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней после иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней до иммуногенной композиции, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. Адъювант вводят в ту же анатомическую локализацию или в отличающуюся анатомическую локализацию по сравнению с иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид.

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

виде линейного полирибонуклеотида субъекту. В другом конкретном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и первый адъювант.

В определенных вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят второй адъювант. Адъювант обеспечивает усиление врожденного иммунного ответа, который в свою очередь обеспечивает усиление адаптивного иммунного ответа у субъекта. Адъювант может представлять собой любой адъювант, описанный ниже. В определенных вариантах осуществления адъювант составляют с линейным полирибонуклеотидом в качестве части иммуногенной композиции. В определенных вариантах осуществления адъювант не является частью иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В определенных вариантах осуществления адъювант вводят отдельно от иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В данном аспекте адъювант вводят субъекту совместно (например, вводят одновременно) с иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, или вводят в момент времени, отличающийся от момента времени введения иммуногенной композиции, содержащей линейный полинуклеотид. Например, адъювант вводят через 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или любое промежуточное число минут или часов после иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1 минуту, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа или за любое промежуточное число минут или часов до иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. Например, адъювант вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней после иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления адъювант вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 или 84 дня или любое промежуточное число дней до иммуногенной композиции, содержащей линейный полирибонуклеотид. Адъювант вводят в ту же анатомическую локализацию или в отличающуюся анатомическую локализацию по сравнению с иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид.

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

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

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

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

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

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

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

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

Для разделения двух или больше иммунизаций можно выбирать подходящие промежутки времени. Промежутки времени могут относиться к многократным иммунизациям с помощью одной и той же иммуногенной композиции, адъюванта или вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации, например, ту же иммуногенную композицию, адъювант или вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию можно вводить в том же количестве или в отличающихся количествах с помощью того же пути иммунизации или с помощью отличающихся путей иммунизации. Промежутки времени могут относиться к многократным иммунизациям с помощью отличающейся иммуногенной композиции, адъюванта или вакцины (например, субъединичной белковой вакцины) или их комбинации, например, отличающуюся иммуногенную композицию, адъювант или вакцину (например, субъединичную белковую вакцину) или их комбинацию можно вводить в том же количестве или в отличающихся количествах с помощью того же пути иммунизации или с помощью отличающихся путей иммунизации. Промежутки времени могут относиться к иммунизациям с помощью разных средств, например первой иммуногенной композиции, содержащей первый кольцевой полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей второй кольцевой полирибонуклеотид. Промежутки времени могут относиться к иммунизации с помощью отличающихся средств, например, первой иммуногенной композиции, содержащей первый кольцевой полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей белковый иммуноген (например, белковую субъединицу). Промежутки времени могут относиться к первой иммуногенной композиции, содержащей первый линейный полирибонуклеотид, и второй иммуногенной композиции, содержащей второй линейный полирибонуклеотид. Для режимов, предусматривающих три или больше иммунизаций, промежутки времени между иммунизациями могут быть одинаковыми или отличающимися. В некоторых

примерах между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17 ,18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 48, или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 28, или 30 дней. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 недель. В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 месяцев.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления между двумя иммунизациями проходит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или по меньшей мере 8 месяцев или

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

В некоторых вариантах осуществления способ включает предварительное введение субъекту средства для улучшения иммуногенных ответов на кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой иммуноген, раскрытый в данном документе (например, белковый иммуноген). Например, способ включает введение белкового иммуногена за 1-7 дней до введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый иммуноген. В некоторых вариантах осуществления белковый иммуноген вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до введения кольцевого полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый иммуноген. Например, способ включает введение белкового иммуногена за 1-7 дней до введения линейного полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый иммуноген. В некоторых вариантах осуществления белковый иммуноген вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до введения линейного полирибонуклеотида, содержащего последовательность, кодирующую белковый иммуноген. Белковый иммуноген может быть введен в виде препарата на основе белка, закодирован в плазмиде (pDNA), представлен в вирусоподобной частице (VLP), составлен в липидной наночастице (LNP) или т. п.

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

полирибонуклеотидов, описанных в данном документе, или любой из иммуногенных композиций, описанных в данном документе, и белковой субъединицы.

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

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

вакцину) или их комбинацию можно вводить в отличающиеся анатомические участи, отличающиеся иммуногенные композиции, содержащие одинаковые или отличающиеся линейные полирибонуклеотиды, адъюванты, вакцины (например, белковые субъединичные вакцины) или их комбинацию можно вводить в один и тот же анатомический участок или любую их комбинацию. Например, иммуногенную композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид, можно вводить в два отличающихся анатомических участка, и/или иммуногенную композицию, содержащую линейный полирибонуклеотид, можно вводить в один анатомический участок, а адъювант можно вводить в отличающийся анатомический участок.

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

не более чем 9 или не более чем 10 анатомических участках или в меньшем числе анатомических участков субъекта.. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид или адъювант по настоящему изобретению, проводят в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 анатомических участках субъекта.

Иммунизацию можно осуществлять любым подходящим путем. Неограничивающие примеры путей иммунизации включают внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интратекальный, интракапсулярный, внутриглазничный, внутрисердечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, транстрахеальный, подкожный, субкутикулярный, внутрисуставный, субкапсулярный, субарахноидальный, интраспинальный, эпидуральный, внутригрудинный, интрацеребральный, внутриглазной, внутриочаговый, интрацеребровентрикулярный, интрацистернальный или интрапаренхиматозный путь, например инъекцию и инфузию. В некоторых случаях иммунизацию можно осуществлять путем ингаляции. Две или больше иммунизаций можно осуществлять одним и тем же путем или отличающимися путями.

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

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

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид, иммуногенную композицию, фармацевтический препарат или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, вводят субъекту в возрасте от рождения до 15 месяцев в соответствии со схемой введения доз, представленной в таблице 1, или вводят субъекту в возрасте от 18 месяцев до 18 лет в соответствии со схемой введения доз, представленной в таблице 2. Введение доз можно проводить в соответствии со схемой введения доз, известной из уровня техники, например, как описано Центрами по контролю и профилактике заболеваний (CDC) или Национальными институтами здравоохранения (NIH). В таблицах 1 и 2 представлены сокращенные схемы введения доз вакцины против определенных заболеваний, указанных на веб-сайте CDC по состоянию на 29 августа 2020 года.

Таблица 1. Введение доз от рождения до 15 месяцев

Показание (Вакцина)	**Рождение**	**1 мес.**	**2 мес.**	**4 мес.**	**6 мес.**	**9 мес.**	**12 мес.**	**15 мес.**
Гепатит B (HepB)	1-я доза	2-я доза			3-я доза			
Корь, эпидемический паротит, краснуха (MMR); ветряная оспа (VAR)							1-я доза	
Гепатит A (HepA)							2 серии доз	
Ротавирус (RV1 или RV5)			1-я доза	2-я доза	3-я доза			
Дифтерия,			1-я	2-я	3-я			4-я

столбняк, бесклеточный коклюш (DTap)			доза	доза	доза			доза
Гемофильная палочка B (Hib)			1-я доза	2-я доза	3-я доза		3-я или 4-я доза	
Пневмококковый конъюгат (PCV13)			1-я доза	2-я доза	3-я доза		4-я доза	
Инактивированный полиомиелит (IPV)			1-я доза	2-я доза	3-я доза			
Грипп (IIV)					Ежегодная вакцинация, 1 или 2 дозы			

*необязательно

Таблица 2. Введение доз от 18 месяцев до 18 лет

Вакцина	**18 мес.**	**19-23 года**	**2-3 года**	**4-6 лет**	**4-6 лет**	**7-10 лет**	**11-12 лет**	**13-15 лет**	**16 лет**	**17-18 лет**
Hep B (HepB)	3-я доза									
Дифтерия, столбняк, бесклеточный коклюш (DTap)	4-я доза		5-я доза							
Инактивированный полиомиелит (IPV)	3-я доза		4-я доза							
Грипп (IIV)	Ежегодная вакцинация, 1 или 2 дозы					Ежегодная вакцинация, только 1 доза				
Грипп (LAIV)			Ежегодная вакцинация, 1 или 2 дозы			Ежегодная вакцинация, только 1 доза				
Гепатит A (HepA)	2 серии доз									
Менингококковая (MenACWY-D; MenACWY-CRM)							1-я доза		2-я доза	

Корь, эпидемический паротит, краснуха (MMR); ветряная оспа (VAR)				2-я доза						
Дифтерия, столбняк, бесклеточный коклюш (DTap)							TDap			

Местная доставка

В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлены композиции и фармацевтические композиции для местной доставки полирибонуклеотида, который вызывает иммунный ответ у субъекта. Композиции и фармацевтические композиции могут содержать спирт (например, этанол) для доставки полирибонуклеотида в клетку. Композиции и фармацевтические композиции могут содержать средство, способствующее проникновению в клетку. Средство, способствующее проникновению в клетку, имеет конфигурацию, позволяющую ему усиливать доставку полирибонуклеотида в клетку. Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

В некоторых вариантах осуществления композиции или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, вводят непосредственно в участок поверхности тела (например, на участок поверхности тела для местного применения). В некоторых вариантах осуществления композиции или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, наносят на участок поверхности тела субъекта после нанесения стерилизующего средства. В некоторых вариантах осуществления композиции или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, наносят на участок поверхности тела субъекта после нанесения спирта.

Описанные в данном документе композиции могут содержать смесь, содержащую полирибонуклеотид и спирт, такой как этанол. Описанные в данном документе способы могут включать доставку полирибонуклеотида в композиции, содержащей смесь полирибонуклеотида и спирта, такого как этанол. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен набор, содержащий полирибонуклеотид и спирт (например, этанол) для доставки полирибонуклеотида в клетку. В некоторых вариантах осуществления набор содержит стерилизующее средство. В конкретном варианте

осуществления набор содержит полирибонуклеотид и пропитанную спиртом салфетку (например, пропитанную этанолом салфетку, пропитанную изопропанолом салфетку).

Описанные в данном документе композиции могут содержать смесь, содержащую полирибонуклеотид и средство, способствующее проникновению в клетку. Описанные в данном документе способы могут включать доставку полирибонуклеотида в композиции, содержащей смесь полирибонуклеотида и средства, способствующего проникновению в клетку. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен набор, содержащий полирибонуклеотид и средство, способствующее проникновению в клетку, для доставки полирибонуклеотида в клетку. В некоторых вариантах осуществления набор содержит стерилизующее средство.

Композиции, раскрытые в данном документе, могут представлять собой композиции, не содержащие какого-либо носителя, содержащие полирибонуклеотид и разбавитель. Данную композицию можно применять в способе доставки в эпителиальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления композиции, терапевтические композиции или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, вводят непосредственно в участок поверхности тела (например, в участок поверхности тела для местного применения). В некоторых вариантах осуществления композиции, терапевтические композиции или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, наносят на участок поверхности тела субъекта после нанесения стерилизующего средства.

Композиции, способы и наборы, представленные в данном документе, могут предложить простое и эффективное решение для доставки полирибонуклеотидов в клетки. Полирибонуклеотид может быть доставлен в клетку более эффективно в присутствии средства, способствующего проникновению в клетку, чем в отсутствие средства, способствующего проникновению в клетку. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, описанное в данном документе, может увеличить эффективность доставки полинуклеотида на по меньшей мере приблизительно 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 2000%, 5000%, 8000%, 10000%, 20000% или 50000% по сравнению с эффективностью доставки полинуклеотида в отсутствие средства, способствующего проникновению в клетку.

Используемый в данном документе термин "местная доставка" означает доставку вещества в кожу или эпителиальный слой с помощью доступных, хотя и неинвазивных

способов. Местная доставка предусматривает местную доставку в эпителий кишечника и другой эпителий желудочно-кишечного тракта (GI) или эпителий влагалища. Местная доставка фармацевтической композиции может оказывать местный фармакодинамический эффект на субъекта, например, местно доставляемая фармацевтическая композиция оказывает фармакодинамический эффект на конкретную часть организма (например, кожу) или вблизи нее, куда доставляется фармацевтическая композиция. В некоторых других вариантах осуществления описанная в данном документе местная доставка фармацевтической композиции применяется только для обозначения способа доставки (местно, например, на определенный участок поверхности тела), тогда как фармацевтическая композиция может оказывать местный или системный фармакодинамический эффект. Например, фармацевтическая композиция может либо оставаться локально в месте введения или вблизи него, либо может поступать в систему кровообращения (например, в кровь или лимфатическую систему) организма субъекта, по которой фармацевтическая композиция может транспортироваться в отдаленные части организма, которые обычно недоступны для фармацевтической композиции посредством других путей, кроме систем кровообращения.

В некоторых вариантах осуществления композиция или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, составлена для непосредственного нанесения на участок кожи (например, для чрескожного или кожного введения). В некоторых вариантах осуществления композиция или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, составлена для введения через носовые ходы субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиция или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, составлена для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, составлена для офтальмологического введения. В некоторых вариантах осуществления композиция или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, составлена для введения в виде суппозитория, для вагинального введения или для введения через слизистую оболочку.

Композицию или фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, можно наносить на поверхность после нанесения на эту поверхность стерилизующего средства (например, предварительной обработки поверхности стерилизующим средством для доставки полирибонуклеотида). Поверхность может представлять собой участок поверхности тела субъекта. Участок поверхности тела субъекта предусматривает клетки, такие как эпителиальные клетки.

Стерилизующее средство может представлять собой любое средство, обладающее бактерицидным, бактериостатическим действием и/или активно убивающее микроорганизмы, инактивирующее микроорганизмы или препятствующее росту микроорганизмов. В некоторых вариантах осуществления стерилизующее средство представляет собой спирт, йод или перекись водорода. Стерилизующее средство может представлять собой ультрафиолетовое излучение или лазерное излучение. В некоторых вариантах осуществления стерилизующее средство представляет собой нагревание, обеспечиваемое электричеством, или с помощью других средств, таких как пар или приведение в контакт.

Стерилизующее средство можно наносить на участок поверхности тела субъекта различными неинвазивными способами. Например, стерилизующее средство можно наносить с помощью салфетки или тампона, содержащего стерилизующее средство. В некоторых вариантах осуществления стерилизующее средство наносят в виде спрея. Для нанесения стерилизующего средства можно применять различные устройства. Например, можно применять устройство, обеспечивающее УФ-излучение или лазерное излучение. В других вариантах осуществления можно применять устройство, которое обеспечивает тепло.

Композицию или фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, можно наносить на поверхность после нанесения спирта, такого как этанол (например, предварительной обработки поверхности спиртом для доставки полирибонуклеотида). Поверхность может представлять собой участок поверхности тела субъекта. Участок поверхности тела субъекта предусматривает клетки, такие как эпителиальные клетки. Спирт, применяемый для предварительной обработки поверхности перед введением (например, нанесением) полирибонуклеотида на данную поверхность, может действовать как стерилизующее средство и/или усиливать проникновение полирибонуклеотида в клетку. В некоторых случаях спирт наносится на поверхность с использованием салфетки или замены. В некоторых вариантах осуществления спирт допускается испытывать на поверхности перед введением (например, нанесением) полирибонуклеотида.

Композиция или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может представлять собой жидкий препарат, такой как суспензия, сироп или настойка. В некоторых случаях водные растворы упаковывают для применения как есть или лиофилизируют, и перед введением лиофилизированный препарат смешивают со стерильным раствором. Композиция может быть доставлена в виде раствора или суспензии. Как правило, такие составы, как гель (например, гель с ДМСО), желе, кремы,

лосьоны (например, лосьон Johnson & Johnson), суппозитории и мази могут обеспечить участок с более продолжительным воздействием одного или нескольких активных средств, в то время как составы в растворе, например, спреи, могут обеспечить более немедленное кратковременное воздействие.

Композиция или фармацевтическая композиция, нанесенная на участок поверхности тела после предварительной обработки, может не содержать какого-либо носителя и содержать полирибонуклеотид и разбавитель. Полирибонуклеотид может представлять собой линейный полирибонуклеотид или кольцевой полирибонуклеотид.

В некоторых случаях представленные в данном документе композиции являются подходящими для применения *in vivo* для вызывания иммунного ответа на представляющий интерес иммуноген при введении композиции субъекту. Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

В конкретном варианте осуществления композиции и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, например, составленные для местной доставки, можно применять для вызывания иммунного ответа на вирусный иммуноген и/или для лечения или предупреждения вирусной инфекции, например, вирусной инфекции, выбранной из гриппа (например, сезонного гриппа, пандемического гриппа, гриппа A, гриппа подтипа H1N1), натуральной оспы, вируса Чикунгунья (например, вируса Чикунгунья), коронавируса (например, SARS-CoV-2), вируса денге, вируса Зика,вируса желтой лихорадки, вируса Коксаки (например, энтеровирусного везикулярного стоматита), HIV, AIDS, эболавируса (например, геморрагической лихорадки Эбола), вируса Марбург (например, геморрагической лихорадки Марбурга), вирусного бронхиолита, респираторно-синцитиального вируса (RSV), вируса гепатита (например, гепатита B), вируса герпеса (например, генитального герпеса), ротавирусной инфекции, инфекции кори, инфекции паротита и инфекции краснухи.

В другом варианте осуществления композиции и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, например, составленные для местной доставки, можно применять для индукции иммунного ответа на бактериальный иммуноген и/или для лечения или предупреждения бактериальной инфекции, например, бактериальной инфекции, выбранной из лихорадки Ку, натуральной оспы, коклюша (судорожного кашля) *Haemophilus influenzae*, стрептококка (например, стрептококковой пневмонии), инфекции *E. coli*, бактериальной диареи, бактерий *Francisella tularensis* (например, туляремии), дифтерии и столбняка.

В другом варианте осуществления композиции и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, например, составленные для местной доставки, можно применять для индукции иммунного ответа на иммуноген паразита и/или для лечения или предупреждения паразитарной инфекции, например, малярии.

В другом варианте осуществления композиции и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, например, составленные для местного применения, можно применять для индукции иммунного ответа на токсин и/или для лечения или предупреждения токсичности, связанной с воздействием токсина, например, токсина, выбранного из ботулинического токсина и сибирской язвы.

В другом варианте осуществления композиции и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, например, составленные для местной доставки, можно применять для индукции иммунного ответа на аллерген и/или для лечения или предупреждения симптомов, связанных с воздействием аллергена, например аллергена, выбранного из аллергена арахиса, пищевого аллергена, аллергена пыльцы березы, аллергена пыльцы травянистых растений, аллергена кошки, аллергена пыльцы кедра, аллергена пылевого клеща и аллергена амброзии.

В другом варианте осуществления композиции и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть приготовлены для чрескожной доставки. В некоторых вариантах осуществления чрескожную доставку можно применять для индукции иммунного ответа к и/или для лечения или предупреждения любого из следующего: лихорадки Ку, натуральной оспы, аллергена арахиса, ботулинического токсина, вирусного бронхиолита, респираторно-синцитиального вируса (RSV), сибирской язвы, столбняка и аллергена пылевого клеща.

В другом варианте осуществления композиции и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены для доставки через кожу. В некоторых вариантах осуществления доставку через кожу можно применять для индукции иммунного ответа к и/или для лечения или предупреждения любого из следующего: гриппа (например, сезонного гриппа, пандемического гриппа, гриппа A, гриппа подтипа H1N1), натуральной оспы, вируса Чикунгунья (например, вируса Чикунгунья), коронавируса (например, SARS-CoV-2), вируса денге, вируса Зика, вируса желтой лихорадки, вируса Коксаки (энтеровирусного везикулярного стоматита), HIV, AIDS, эболавируса (например, геморрагической лихорадки Эбола), вируса Марбург (например, геморрагической лихорадки Марбурга), респираторно-синцитиального вируса (RSV), вируса гепатита (например, гепатита B), вируса герпеса (например, генитального герпеса),

ротавирусной инфекции, инфекции кори, инфекции паротита, инфекции краснухи, коклюша (судорожного кашля), стрептококка (например, стрептококковой пневмонии), инфекции *E. coli*, бактериальной диареи, бактерии *Francisella tularensis* (например, туляремии), дифтерии, столбняка, малярии, сибирской язвы, пищевого аллергена, аллергена пыльцы березы, аллергена пыльцы травянистых растений, аллергена кошки, аллергена пыльцы кедра, и аллергена пылевого клеща, и аллергена амброзии.

Спирт

Спирт, описанный в данном документе, можно применять для доставки полирибонуклеотида в клетку. Спирт может находиться в смеси с полирибонуклеотидом, описанном в данном документе, для доставки полирибонуклеотида в клетку. Смесь может содержать спирт в количестве, составляющем по меньшей мере от приблизительно 0,3% об./об. спирта до приблизительно 75% об./об. Спирт может представлять собой этанол. В некоторых вариантах осуществления смесь наносят на участок поверхности тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления смесь представляет собой фармацевтическую композицию.

Спирт может представлять собой любой спирт, который содержит одну или несколько гидроксильных функциональных групп. В некоторых случаях спирт представляет собой без ограничения одноатомный спирт, многоатомный спирт, ненасыщенный алифатический спирт или алициклический спирт. Спирт может предусматривать один или несколько из метанола, этанола, изопропанола, феноксиэтанола, триэтаноламина, фенилэтилового спирта, бутанола, пентанола, цетилового спирта, этиленгликоля, пропиленгликоля, денатурированного спирта, бензилового спирта, специально денатурированного спирта, гликоля, стеарилового спирта, цетеарилового спирта, ментола, полиэтиленгликоля (PEG)-400, этоксилированных жирных кислот или гидроксиэтилцеллюлозы. В определенных вариантах осуществления спирт представляет собой этанол.

В других случаях композиции, фармацевтические композиции и способы, предусмотренные в данном документе, включают только спирт и не содержат или не применяют какое-либо другое средство для усиления доставки полирибонуклеотида в клетку. В некоторых случаях спирт представляет собой этанол, и композиция, фармацевтическая композиция и способы не включают или используют какое-либо другое средство для усиления доставки полирибонуклеотида в клетку. В некоторых случаях спирт представляет собой средство, способствующее проникновению в клетку. В

некоторых случаях спирт не представляет собой средство, способствующее проникновению в клетку.

Описанная в данном документе композиция может предусматривать смесь, содержащую спирт и полирибонуклеотид. В некоторых случаях полирибонуклеотид присутствует в предварительно смешанной смеси со спиртом. В некоторых случаях полирибонуклеотиды представлены отдельно от спирта до введения в контакт с клеткой. В данных случаях полирибонуклеотид вводят в контакт со спиртом при применении в отношении клетки, и они становятся смешанными для доставки полирибонуклеотида в клетку. Без ограничения определенной теорией считается, что концентрация спирта в смеси может влиять на эффективность доставки. Поэтому в некоторых случаях в смеси обеспечивают предварительно определенную концентрацию спирта. В некоторых других случаях, когда спирт и полирибонуклеотид изначально разделены, но смешиваются друг с другом при применении для доставки, то спирт обеспечивают в количестве, достаточном в отношении полирибонуклеотида, чтобы обеспечить его минимальную предварительно определенную концентрацию в смеси.

В некоторых случаях спирт составляет по меньшей мере приблизительно 0,01%, по меньшей мере приблизительно 0,02%, по меньшей мере приблизительно 0,03%, по меньшей мере приблизительно 0,04%, по меньшей мере приблизительно 0,05%, по меньшей мере приблизительно 0,06%, по меньшей мере приблизительно 0,07%, по меньшей мере приблизительно 0,08%, по меньшей мере приблизительно 0,09%, по меньшей мере приблизительно 0,1%, по меньшей мере приблизительно 0,2%, по меньшей мере приблизительно 0,3%, по меньшей мере приблизительно 0,4%, по меньшей мере приблизительно 0,5%, по меньшей мере приблизительно 0,6%, по меньшей мере приблизительно 0,7%, по меньшей мере приблизительно 0,9%, по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 98% по объему (об./об.)

смеси. В некоторых случаях спирт составляет не более чем приблизительно 0,01%, не более чем приблизительно 0,02%, не более чем приблизительно 0,03%, не более чем приблизительно 0,04%, не более чем приблизительно 0,05%, не более чем приблизительно 0,06%, не более чем приблизительно 0,07%, не более чем приблизительно 0,08%, не более чем приблизительно 0,09%, не более чем приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90% об./об. смеси. В некоторых случаях спирт составляет приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 100% об./об. смеси.

В некоторых случаях спирт составляет по меньшей мере приблизительно 0,01%, по меньшей мере приблизительно 0,02%, по меньшей мере приблизительно 0,03%, по меньшей мере приблизительно 0,04%, по меньшей мере приблизительно 0,05%, по меньшей мере приблизительно 0,06%, по меньшей мере приблизительно 0,07%, по меньшей мере приблизительно 0,08%, по меньшей мере приблизительно 0,09%, по меньшей мере приблизительно 0,1%, по меньшей мере приблизительно 0,2%, по меньшей мере приблизительно 0,3%, по меньшей мере приблизительно 0,4%, по меньшей мере приблизительно 0,5%, по меньшей мере приблизительно 0,6%, по меньшей мере приблизительно 0,7%, по меньшей мере приблизительно 0,9%, по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 98% по весу (вес./вес.) смеси.

В некоторых случаях спирт составляет не более чем приблизительно 0,01%, не более чем приблизительно 0,02%, не более чем приблизительно 0,03%, не более чем приблизительно 0,04%, не более чем приблизительно 0,05%, не более чем приблизительно 0,06%, не более чем приблизительно 0,07%, не более чем приблизительно 0,08%, не более чем приблизительно 0,09%, не более чем приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%,

0,7%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90% вес./вес. смеси. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, составляет приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 98% вес./вес. смеси. В некоторых случаях спирт составляет приблизительно 10% об./об. смеси.

В некоторых вариантах осуществления спирт составляет от по меньшей мере приблизительно 0,5% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 1% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 5% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 10% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 15% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 20% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 30% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 40% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 50% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 60% об./об. до приблизительно 75% об./об., или от по меньшей мере приблизительно 70% об./об. до приблизительно 75% об./об. смеси или любое промежуточное процентное значение об./об. В некоторых вариантах осуществления спирт составляет от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 70% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 60% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 50% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 40% об./об., от по меньшей мере приблизительно 30% об./об. до приблизительно 20% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 15% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 10% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 5% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 1% об./об. или от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 0,5% об./об. смеси или любое промежуточное процентное значение об./об.

В некоторых случаях описанная в данном документе смесь представляет собой жидкий раствор. Например, спирт сам по себе является жидким веществом. В данных случаях полирибонуклеотид также может быть растворен в жидком растворе.

В некоторых случаях этанол составляет по меньшей мере приблизительно 0,1%, по меньшей мере приблизительно 0,2%, по меньшей мере приблизительно 0,3%, по меньшей мере приблизительно 0,4%, по меньшей мере приблизительно 0,5%, по меньшей мере приблизительно 0,6%, по меньшей мере приблизительно 0,7%, по меньшей мере приблизительно 0,9%, по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 98% по объему (об./об.) смеси. В некоторых случаях этанол составляет не более чем приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90% об./об. смеси. В некоторых случаях этанол составляет приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 100% об./об. смеси. В некоторых случаях этанол составляет приблизительно 10% об./об. смеси.

В некоторых вариантах осуществления этанол составляет от по меньшей мере приблизительно 0,5% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 1% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 5% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 10% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 15% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 20% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 30% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 40% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 50% об./об. до приблизительно 75% об./об., от по меньшей мере приблизительно 60% об./об. до приблизительно 75% об./об., или от по меньшей мере приблизительно 70% об./об. до приблизительно 75% об./об. смеси или любое

промежуточное процентное значение об./об. В некоторых вариантах осуществления этанол составляет от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 70% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 60% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 50% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 40% об./об., от по меньшей мере приблизительно 30% об./об. до приблизительно 20% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 15% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 10% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 5% об./об., от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 1% об./об. или от по меньшей мере приблизительно 0,3% об./об. до приблизительно 0,5% об./об. смеси или любое промежуточное процентное значение об./об.

Средства, способствующие проникновению в клетку

Средство, способствующее проникновению в клетку, описанное в данном документе, может включать любое вещество, которое усиливает доставку полирибонуклеотида в клетку. Средство, способствующее проникновению в клетку, может включать органическое соединение или неорганическую молекулу. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой органическое соединение, содержащее одну или несколько функциональных групп, таких как без ограничения алкан, алкен и арен; галогензамещенный алкан, алкены и арены; спирты, фенолы (производные бензола), простые эфиры, альдегиды, кетоны и карбоновые кислоты; амины и нитрилы и сероорганические соединения (например, диметилсульфоксид). В некоторых вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, является растворим в полярных растворителях. В некоторых вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, является нерастворим в полярных растворителях. Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

Средство, способствующее проникновению в клетку, может включать органические соединения, такие как спирты, содержащие одну или несколько функциональных гидроксильных групп. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, включает спирт, такой как без ограничения одноатомные спирты, многоатомные спирты, ненасыщенные алифатические спирты и алициклические спирты. Средство, способствующее проникновению в клетку, может включать один или

несколько из метанола, этанола, изопропанола, феноксиэтанола, триэтаноламина, фенилэтилового спирта, бутанола, пентанола, цетилового спирта, этиленгликоля, пропиленгликоля, денатурированного спирта, бензилового спирта, специально денатурированного спирта, гликоля, стеарилового спирта, цетеарилового спирта, ментола, полиэтиленгликоля (PEG)-400, этоксилированных жирных кислот или гидроксиэтилцеллюлозы. В определенных вариантах осуществления средство, способствующее проникновению в клетку, содержит этанол.

В других случаях композиции и способы, представленные в данном документе, предусматривают только спирт в качестве средства, способствующего проникновению в клетку, и не содержат или не предусматривают применения какого-либо другого средства для усиления доставки полирибонуклеотида в клетку. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, содержит этанол и любой другой спирт, который может усиливать доставку полирибонуклеотида в клетку. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, содержит этанол и любые другие органические или неорганические молекулы, которые могут усиливать доставку полирибонуклеотида в клетку. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, содержит этанол и липосомы или наночастицы, которые описаны в международных публикациях № WO2013/006825, WO2016/036735, WO2018/112282A1 и WO2012/031043A1, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, содержит этанол и пептиды или белки, способствующие проникновению в клетку, которые описаны в работе Bechara et al, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters* 587(12):1693-1702 (2013); Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL, 2002); El-Andaloussi et al., *Curr. Pharm. Des.* 11(28):3597-611 (2003); Deshayes et al, *Cell. Mol. Life Sci.* 62(16):1839-49 (2005), публикациях заявок на патенты США №US20130129726, US20130137644 и US20130164219, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых случаях соотношение этанола и других средств, способствующих проникновению в клетку, составляет приблизительно1:0,001, 1:0,002, 1: 005, 1:008, 1:0,01, 1:0,02, 1:0,05, 1:0,08, 1: 0,1, 1: 0,2, 1: 0,3, 1:0,4, 1:0,5, 1:0,6, 1:0,7, 1:0,8, 1:0,9, 1:1, 1:1,2, 1: 1,5, 1: 1,8, 1: 2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:120, 1:150, 1:200, 1:250, 1:500 или 1:1000. В некоторых случаях соотношение этанола и других средств, способствующих проникновению в клетку, составляет по меньшей мере

приблизительно 1:0,001, 1:0,002, 1: 005, 1:008, 1:0,01, 1:0,02, 1:0,05, 1:0,08, 1: 0,1, 1: 0,2, 1: 0,3, 1:0,4, 1:0,5, 1:0,6, 1:0,7, 1:0,8, 1:0,9, 1:1, 1:1,2, 1: 1,5, 1: 1,8, 1: 2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:120, 1:150, 1:200, 1:250, или 1:500.

Описанная в данном документе композиция может содержать смесь средства, способствующего проникновению в клетку, и полирибонуклеотида. В некоторых случаях полирибонуклеотид присутствует в предварительно смешанной смеси со средством, способствующим проникновению в клетку. В некоторых случаях полирибонуклеотиды обеспечивают отдельно от средства, способствующего проникновению в клетку, до введения в контакт с клеткой. В данных случаях полирибонуклеотид вводят в контакт со средством, способствующим проникновению в клетку, при применении в отношении клетки, и они смешиваются для доставки полирибонуклеотида в клетку. Без ограничения определенной теорией считается, что концентрация средства, способствующего проникновению в клетку, в смеси может влиять на эффективность доставки. Поэтому в некоторых случаях в смеси обеспечивают предварительно определенную концентрацию средства, способствующего проникновению в клетку. В некоторых других случаях, когда средство, способствующее проникновению в клетку, и полирибонуклеотид изначально разделены, но смешиваются друг с другом при применении для доставки, то средство, способствующее проникновению в клетку, обеспечивают в количестве, достаточном в отношении полирибонуклеотида, чтобы обеспечить его минимальную предварительно определенную концентрацию в смеси.

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, составляет по меньшей мере приблизительно 0,01%, по меньшей мере приблизительно 0,02%, по меньшей мере приблизительно 0,03%, по меньшей мере приблизительно 0,04%, по меньшей мере приблизительно 0,05%, по меньшей мере приблизительно 0,06%, по меньшей мере приблизительно 0,07%, по меньшей мере приблизительно 0,08%, по меньшей мере приблизительно 0,09%, по меньшей мере приблизительно 0,1%, по меньшей мере приблизительно 0,2%, по меньшей мере приблизительно 0,3%, по меньшей мере приблизительно 0,4%, по меньшей мере приблизительно 0,5%, по меньшей мере приблизительно 0,6%, по меньшей мере приблизительно 0,7%, по меньшей мере приблизительно 0,9%, по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере

приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 98% по объему (об./об.) смеси. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, составляет не более чем приблизительно 0,01%, не более чем приблизительно 0,02%, не более чем приблизительно 0,03%, не более чем приблизительно 0,04%, не более чем приблизительно 0,05%, не более чем приблизительно 0,06%, не более чем приблизительно 0,07%, не более чем приблизительно 0,08%, не более чем приблизительно 0,09%, не более чем приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90% об./об. смеси. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, составляет приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 100% об./об. смеси.

В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, составляет по меньшей мере приблизительно 0,01%, по меньшей мере приблизительно 0,02%, по меньшей мере приблизительно 0,03%, по меньшей мере приблизительно 0,04%, по меньшей мере приблизительно 0,05%, по меньшей мере приблизительно 0,06%, по меньшей мере приблизительно 0,07%, по меньшей мере приблизительно 0,08%, по меньшей мере приблизительно 0,09%, по меньшей мере приблизительно 0,1%, по меньшей мере приблизительно 0,2%, по меньшей мере приблизительно 0,3%, по меньшей мере приблизительно 0,4%, по меньшей мере приблизительно 0,5%, по меньшей мере приблизительно 0,6%, по меньшей мере приблизительно 0,7%, по меньшей мере приблизительно 0,9%, по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере

приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 98% по весу (вес./вес.) смеси. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, составляет не более чем приблизительно 0,01%, не более чем приблизительно 0,02%, не более чем приблизительно 0,03%, не более чем приблизительно 0,04%, не более чем приблизительно 0,05%, не более чем приблизительно 0,06%, не более чем приблизительно 0,07%, не более чем приблизительно 0,08%, не более чем приблизительно 0,09%, не более чем приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90% вес./вес. смеси. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, составляет приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 98% вес./вес. смеси. В некоторых случаях средство, способствующее проникновению в клетку, составляет приблизительно 10% об./об. смеси.

В некоторых случаях описанная в данном документе смесь представляет собой жидкий раствор. Например, средство, способствующее проникновению в клетку, само по себе является жидким веществом. В качестве альтернативы, средство, способствующее проникновению в клетку, представляет собой твердое, жидкое или газообразное вещество и растворяется в жидком носителе, например воде. В данных случаях полирибонуклеотид также может быть растворен в жидком растворе.

В некоторых случаях этанол составляет по меньшей мере приблизительно 0,1%, по меньшей мере приблизительно 0,2%, по меньшей мере приблизительно 0,3%, по меньшей мере приблизительно 0,4%, по меньшей мере приблизительно 0,5%, по меньшей мере приблизительно 0,6%, по меньшей мере приблизительно 0,7%, по меньшей мере приблизительно 0,9%, по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере

приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 98% по объему (об./об.) смеси. В некоторых случаях этанол составляет не более чем приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90% об./об. смеси. В некоторых случаях этанол составляет приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 100% об./об. смеси. В некоторых случаях этанол составляет приблизительно 10% об./об. смеси.

Консерванты

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может содержать материал для однократного введения или может содержать материал для многократного введения (например, "многодозовый" набор). Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме. Композиция или фармацевтическая композиция может содержать один или несколько консервантов, таких как тиомерсал или 2-феноксиэтанол. Консерванты могут применяться для предупреждения микробного загрязнения во время применения. Подходящие консерванты включают: хлорид бензалкония, тимеросал, хлорбутанол, метилпарабен, пропилпарабен, фенилэтиловый спирт, динатрия эдетат, сорбиновую кислоту, Onamer M или другие средства, известные специалистам в данной области техники. В офтальмологических продуктах, например, такие консерванты могут применяться на уровне от 0,004% до 0,02%. В композициях, описываемых в данном документе, консервант, например, хлорид бензалкония, может применяться в количестве от 0,001% до менее чем 0,01%, например, от 0,001% до 0,008%, предпочтительно приблизительно 0,005% по весу.

Полирибонуклеотиды могут быть восприимчивы к РНКазе, которая может находиться в избытке в окружающей среде. Композиции, представленные в данном документе, могут включать реагенты, которые ингибируют активность РНКазы, тем самым предохраняя полирибонуклеотид от разрушения. В некоторых случаях композиция или фармацевтическая композиция содержит любой ингибитор РНКазы, известный специалисту в данной области техники. В качестве альтернативы или дополнительно,

полирибонуклеотид и средство, способствующее проникновению в клетку, и/или фармацевтически приемлемые разбавители или носители, среды-носители, вспомогательные вещества или другие реагенты в композиции, представленной в данном документе, могут быть получены в среде, не содержащей РНКазы. Композиция может быть составлена в среде, не содержащей РНКазы.

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

Соли

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

Буферы/pH

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

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

Детергенты/поверхностно-активные вещества

Композиция или фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может содержать один или несколько детергентов и/или поверхностно-активных веществ, в зависимости от предполагаемого пути введения, например, поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемые "Tween"), например, полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), продаваемые под торговой маркой DOWFAX™, такие как линейные блок-сополимеры EO/PO; октоксинолы, которые могут различаться по числу повторяющихся этокси(окси-1,2-этандиильных) групп, например, октоксинол-9 (Triton X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (лецитин); этоксилаты нонилфенола, такие как серия Tergitol™ NP; сложные эфиры полиоксиэтилена и жирных кислот, полученные из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известные как поверхностно-активные вещества Brij), такие как монолауриловый сложный эфир триэтиленгликоля (Brij 30), и сложные эфиры сорбитана (широко известные как "SPAN"), такие как сорбитантриолеат (Span 85) и сорбитанмонолаурат, октоксинол (такой как октоксинол-9 (Triton X-100) или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол), бромид цетилтриметиламмония ("CTAB") или дезоксихолат натрия. Один или несколько детергентов и/или поверхностно-активных веществ могут присутствовать только в следовых количествах. В некоторых случаях композиция может содержать менее 1 мг/мл каждого из октоксинола-10 и полисорбата 80. В данном документе могут применяться неионогенные поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества можно классифицировать по их "HLB" (гидрофильно-липофильный баланс). В некоторых случаях поверхностно-активные вещества обладают HLB по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 и/или по меньшей мере 16. Полирибонуклеотид может присутствовать либо в линейной, либо в кольцевой форме.

Разбавители

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

Разбавитель может представлять собой вспомогательное вещество, отличное от носителя. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, служит в качестве среды-носителя или среды для композиции, такой как композиция на основе кольцевого полирибонуклеотида, описанная в данном документе. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, служит в качестве среды-носителя или среды для композиции, такой как композиция на основе линейного полирибонуклеотида, описанная в данном документе. Неограничивающие примеры вспомогательного вещества, отличного от носителя, включают растворители, водные растворители, неводные растворители, дисперсионные среды, разбавители, дисперсии, суспендирующие средства, поверхностно-активные средства, изотонические средства, загустители, эмульгаторы, консерванты, полимеры, пептиды, белки, клетки, гиалуронидазы, диспергирующие средства, гранулирующие средства, средства для улучшения распадаемости, связывающие средства, буферные средства (например, фосфатно-солевой буфер (PBS)), смазывающие средства, масла и их смеси. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой любой из неактивных ингредиентов, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством продуктов и лекарственных средств (FDA) Соединенных Штатов Америки и перечисленных в Базе данных неактивных ингредиентов, который не демонстрирует эффекта способствования проникновению в клетку. Вспомогательное вещество, отличное от носителя, может представлять собой любой неактивный ингредиент, подходящий для введения животному, отличному от человека, например, подходящий для ветеринарного применения. Модификация композиций, подходящих для введения людям, для того, чтобы сделать композиции подходящими для введения различным животным, является широко распространенной, и специалист средней квалификации в области ветеринарной фармакологии может разработать и/или осуществить такую модификацию путем проведения лишь обычных экспериментов в случае необходимости таковых.

В некоторых вариантах осуществления кольцевой полирибонуклеотид может быть доставлен в виде состава для доставки в "голом" виде, например, содержащего

разбавитель. Состав для доставки в "голом" виде обеспечивает доставку кольцевого полирибонуклеотида к клетке без помощи носителя и без модификации или частичной или полной инкапсуляции кольцевого полирибонуклеотида, кэпированного полирибонуклеотида или их комплекса.

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

В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде не содержит каких-либо или всех из реагентов для трансфекции, катионных носителей, углеводных носителей, носителей на основе наночастиц или белковых носителей. В некоторых вариантах осуществления состав для доставки в "голом" виде не содержит фитогликогена октенилсукцината, фитогликогена бета-декстрина, модифицированного ангидридом фитогликогена бета-декстрина, липофектамина, полиэтиленимина, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимина, аминогликозид-полиамина, дидезоксидиамино-b-циклодекстрина, спермина, спермидина, поли(2-диметиламино)этилметакрилата, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированного желатина, дендримеров, хитозана, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), хлорида N-[1 -(2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), хлорида l-[2-(олеоилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолиния (DOTIM), трифторацетата 2,3-диолеоилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA), гидрохлорида

3B-[N-(N\N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина (DC-холестерин HCl), дигептадециламидоглицилспермидина (DOGS), бромида N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), бромида N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE), хлорида N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), человеческого сывороточного альбумина (HSA), липопротеина низкой плотности (LDL), липопротеина высокой плотности (HDL) или глобулина.

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

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

Носители

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

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

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в клетке, везикуле или другом носителе на основе мембран, или такой кольцевой полирибонуклеотид обеспечивается с их помощью. В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид в клетке, везикуле или другом носителе на основе мембран, или такой линейный полирибонуклеотид обеспечивается с их помощью. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит кольцевой полирибонуклеотид в липосомах или других сходных везикулах. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция содержит линейный полирибонуклеотид в липосомах или других сходных везикулах. Липосомы представляют собой сферические везикулярные структуры, состоящие из одно- или многослойного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и относительно непроницаемого внешнего липофильного фосфолипидного бислоя. Липосомы могут быть анионными, нейтральными или катионными. Липосомы являются биосовместимыми, нетоксичными, могут доставлять как гидрофильные, так и липофильные молекулы лекарственных средств, защищать свой "груз" от разрушения под действием ферментов плазмы крови и транспортировать свою нагрузку через биологические мембраны и гематоэнцефалический барьер (BBB) (см., например, для обзора Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10,1155/2011/469679).

Везикулы можно получать из нескольких отличающихся типов липидов; однако для образования липосом в качестве носителей лекарственных средств чаще всего используются фосфолипиды. Способы получения многослойных липидных везикул известны из уровня техники (см., например, патент США № 6693086, идеи которого, относящиеся к получению многослойных липидных везикул, включены в данный

документ посредством ссылки). Хотя образование везикул может быть спонтанным при смешивании липидной пленки с водным раствором, его также можно ускорить путем применения силы в форме встряхивания с использованием гомогенизатора, соникатора или экструзионного аппарата (обзор см., например, в Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. doi:10.1155/2011/469679). Экструдированные липиды можно получать посредством экструзии через фильтры с уменьшающимся размером пор, как описано в работе Templeton et al., Nature Biotech, 15:647-652, 1997, идеи которой, относящиеся к получению экструдированных липидов, включены в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит кольцевой полирибонуклеотид и липидные наночастицы, например липидные наночастицы, описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит линейный полирибонуклеотид и липидные наночастицы. Липидные наночастицы представляют собой другой пример носителя, который обеспечивает биосовместимую и биоразлагаемую систему доставки для молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Липидные наночастицы представляют собой другой пример носителя, который обеспечивает биосовместимую и биоразлагаемую систему доставки для молекулы линейного полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Наноструктурированные липидные носители (NLC) представляют собой модифицированные твердые липидные наночастицы (SLN), которые сохраняют характеристики SLN, улучшают стабильность и емкость загрузки лекарственного средства и предупреждают утечку лекарственного средства. Полимерные наночастицы (PNP) являются важным компонентом для доставки лекарственных средств. Эти наночастицы могут эффективно направлять доставку лекарственного средства к конкретным мишеням и улучшать стабильность лекарственного средства и контролируемое высвобождение лекарственного средства. Также можно использовать липидно-полимерные наночастицы (PLN), новый тип носителя, который является комбинацией липосом и полимеров. Эти наночастицы обладают взаимодополняющими преимуществами PNP и липосом. PLN состоит из структуры сердцевина-оболочка; полимерная сердцевина обеспечивает стабильную структуру, а фосфолипидная оболочка обеспечивает хорошую биосовместимость. Таким образом, эти два компонента обеспечивают повышение показателя эффективности инкапсуляции лекарственного средства, способствуют модификации поверхности и предупреждают утечку

водорастворимых лекарственных средств. Обзор см., например, в работе Li et al. 2017, Nanomaterials 7, 122; doi:10.3390/nano7060122.

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

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

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

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

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

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

Микропузырьки также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы кольцевого полирибонуклеотида, описанной в данном документе. Микропузырьки также можно применять в качестве носителей для доставки молекулы линейного полирибонуклеотида, описанной в данном документе. См., например, US7115583; Beeri, R. et al., Circulation. 2002 Oct 1;106(14):1756-1759; Bez, M. et al., Nat Protoc. 2019 Apr; 14(4): 1015–1026; Hernot, S. et al., Adv Drug Deliv Rev. 2008 Jun 30;

60(10): 1153–1166; Rychak, J.J. et al., Adv Drug Deliv Rev. 2014 Jun; 72: 82-93. В некоторых вариантах осуществления микропузырьки представляют собой покрытые альбумином перфторуглеродные микропузырьки.

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

Липидные наночастицы

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

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

такие как полимеры, такие как полимеры, описанные в таблице 5 документа WO2019217941, включенного посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированные липиды в случае их присутствия могут включать одно или несколько из PEG-диацилглицерина (DAG) (такого как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG)), PEG-диалкилоксипропила (DAA), PEG-фосфолипида, PEG-церамида (Cer), пегилированного фосфатидилэтаноламина (PEG-PE), PEG-сукцинатдиацилглицерина (PEG-DAG) (такого как 4-0-(2',3'-ди(тетрадеканоилокси)пропил-1-0-(w-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG)), PEG-диалкоксипропилкарбама, натриевой соли N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль-2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина и соединений, описанных в таблице 2 документа WO2019051289 (включенного посредством ссылки), а также комбинаций вышеперечисленного.

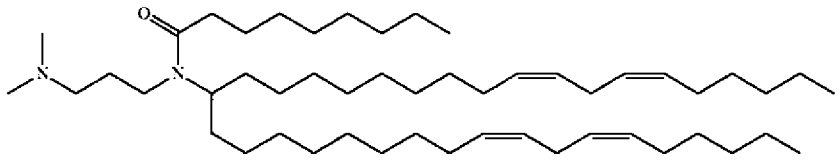
В некоторых вариантах осуществления стерины, которые могут быть включены в липидные наночастицы, включают одно или несколько из холестерина или производных холестерина, например таких, как в документах WO2009/127060 или US2010/0130588, которые включены посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные стерины включают фитостерины, в том числе описанные в работе Eygeris et al. (2020), dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386, включенной в данный документ посредством ссылки.

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

изменять. Например, отношение общего количества липидов к нуклеиновой кислоте (по массе или весу) может составлять от приблизительно 10: 1 до приблизительно 30: 1.

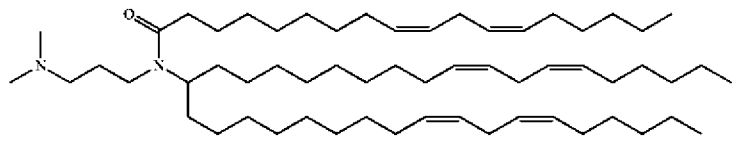
В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение липидов к нуклеиновой кислоте (соотношение масса/масса; соотношение вес./вес.) может находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от приблизительно 10:1 до приблизительно 14:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от приблизительно 4:1 до приблизительно 10:1, от приблизительно 5:1 до приблизительно 9:1 или от приблизительно 6:1 до приблизительно 9:1. Количества липидов и нуклеиновой кислоты можно регулировать для обеспечения требуемого отношения N/P, например отношения N/P, составляющего 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше. В целом, общее содержание липидов в составе на основе липидных наночастиц может находиться в диапазоне от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 30 мг/мл.

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



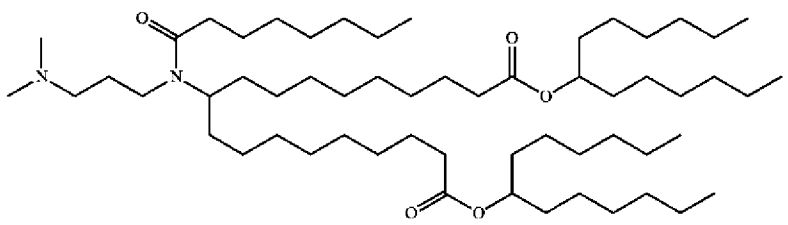
(i).

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



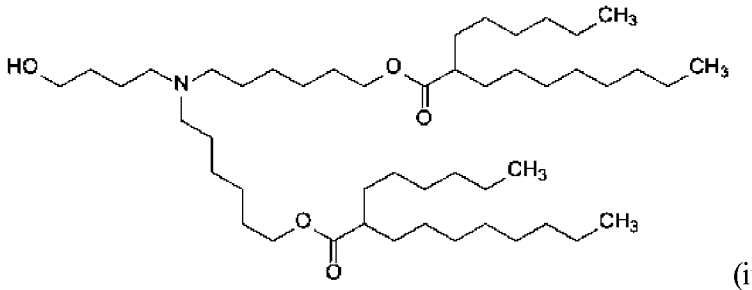
(ii)

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

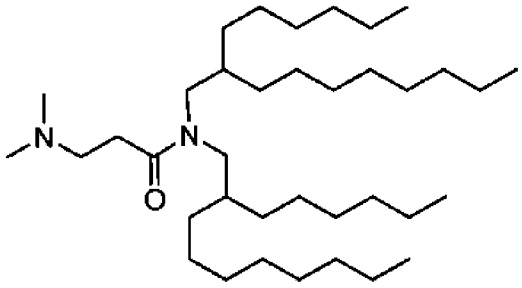


(iii)

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

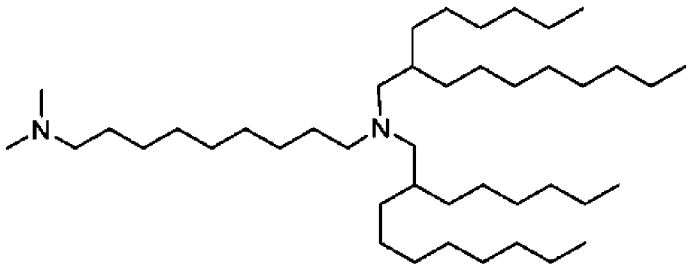


(iv)



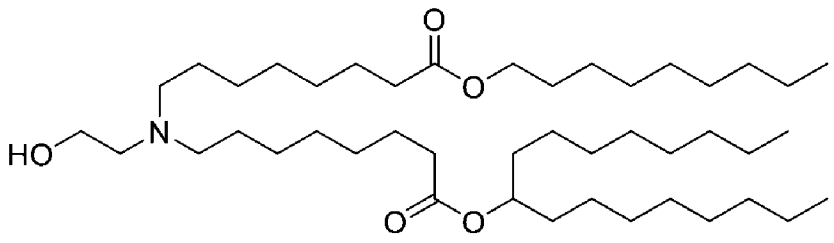
(v)

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

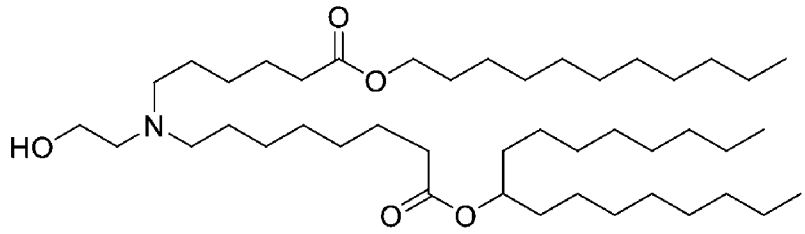


(vi)

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

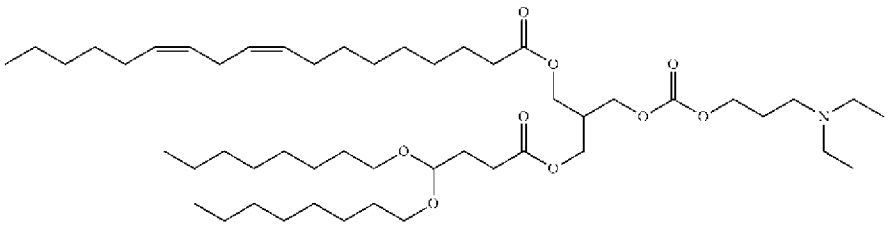


(vii)



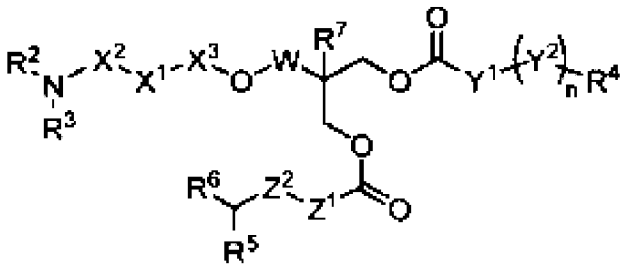
(viii)

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



(ix)

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

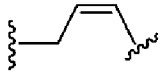
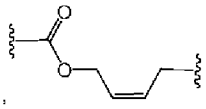
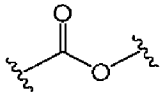


(x),

где

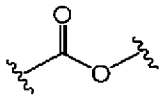
X^1 представляет собой O, NR^1 или прямую связь, X^2 представляет собой C2-5алкилен, X^3 представляет собой C(=O) или прямую связь, R^1 представляет собой H или Me, R^3 представляет собой C1-3алкил, R^2 представляет собой C1-3алкил, или R^2, взятый вместе с атомом азота, к которому он присоединен, и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

атомами азота, к которому они присоединены, образуют 5- или 6-членное кольцо, или R^2, взятый вместе с R^3 и атомом азота, к которому они присоединены, образует 5-, 6- или 7-членное кольцо, Y^1 представляет собой C2-12алкилен, Y^2 выбран из

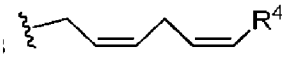
(в любой ориентации), (в любой ориентации), (в любой ориентации),

n равняется 0-3, R^4 представляет собой C1-15алкил, Z^1 представляет собой C1-6алкилен или прямую связь,

Z^2 = 

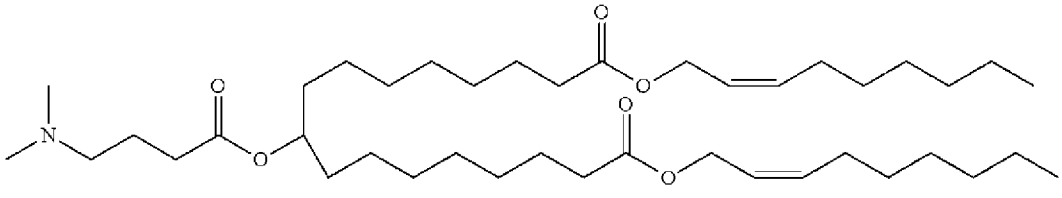
(в любой ориентации) или отсутствует, при условии, что если Z^1 представляет собой прямую связь, то Z^2 отсутствует;

R^5 представляет собой C5-9-алкил или C6-10-алкокси, R^6 представляет собой C5-9-алкил или C6-10-алкокси, W представляет собой метилен или прямую связь, и R^7 представляет собой H или Me или их соль, при условии, что если R^3 и R^2 представляют собой C2-алкилы, X^1 представляет собой O, X^2 представляет собой линейный C3-алкилен, X^3 представляет собой C(=0), Y^1 представляет собой линейный Ce-алкилен, $(Y^2)n\text{-}R^4$ представляет собой



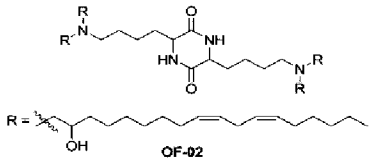
, R^4 представляет собой линейный C5-алкил, Z^1 представляет собой C2-алкилен, Z^2 отсутствует, W представляет собой метилен, и R^7 представляет собой H, то R^5 и R^6 не представляют собой Cx-алкокси.

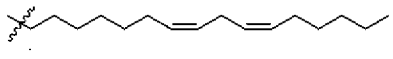
В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.

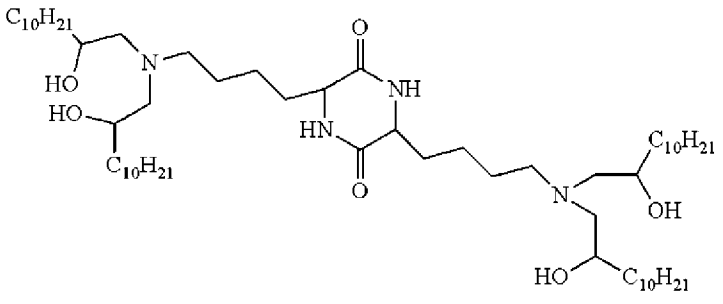

(xi)

В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например,

кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам.



где R=  (xii)

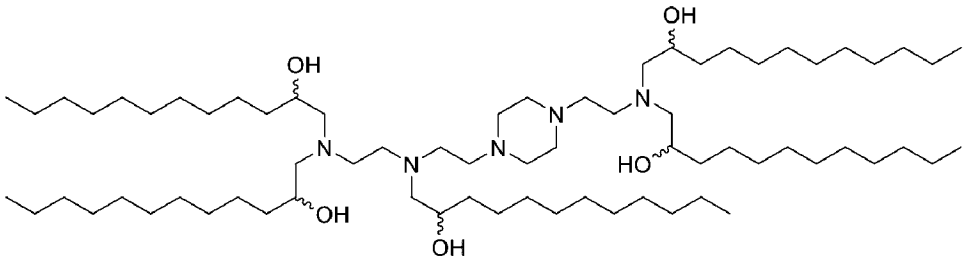


(xiii)



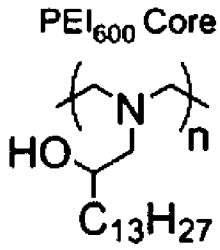
(xiv)

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



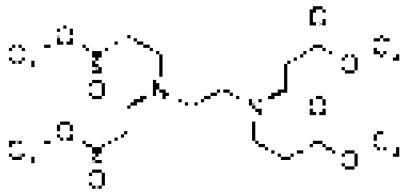
(xv)

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

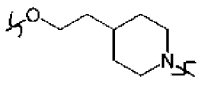


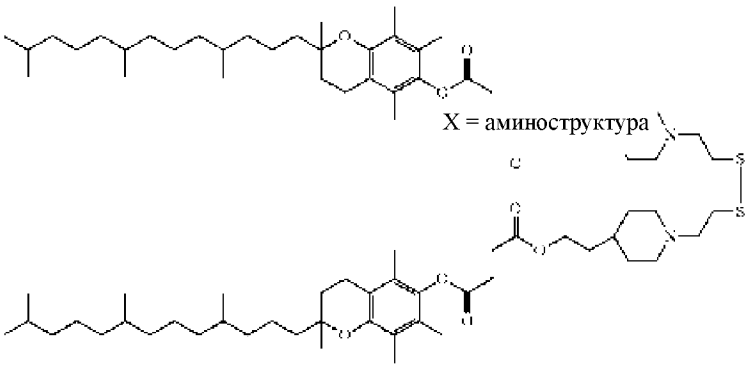
(xvi)

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

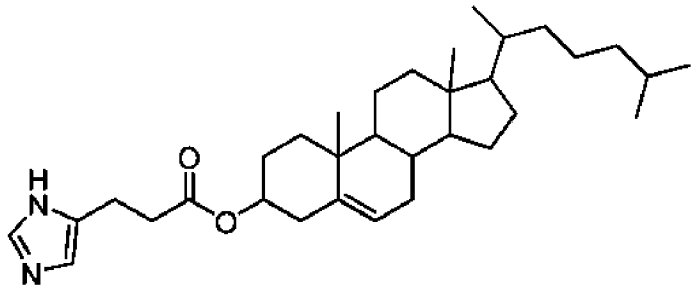


(xvii)

где X=  (xviii)(a)

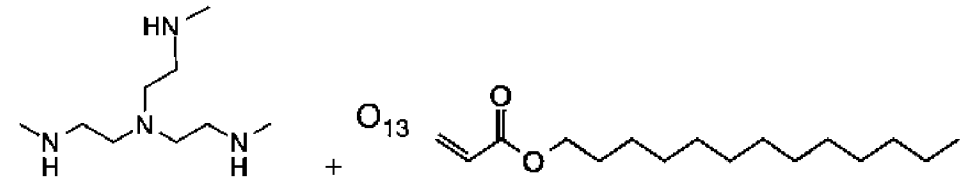


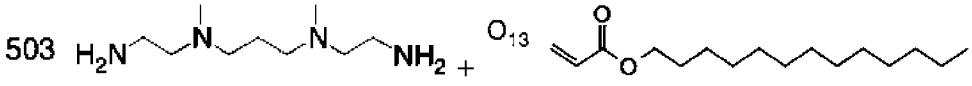
(xviii)(b)



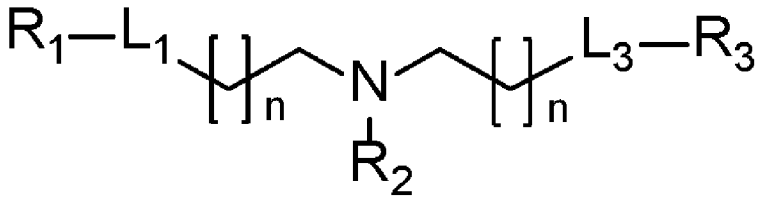
(xix)

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


(xx)(a)


(xx)(b).

В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxi), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxi) представляет собой LNP, описанную в WO 2021113777 (например, липид формулы (1), такой как липид из таблицы 1 в WO 2021113777).


(xxi),

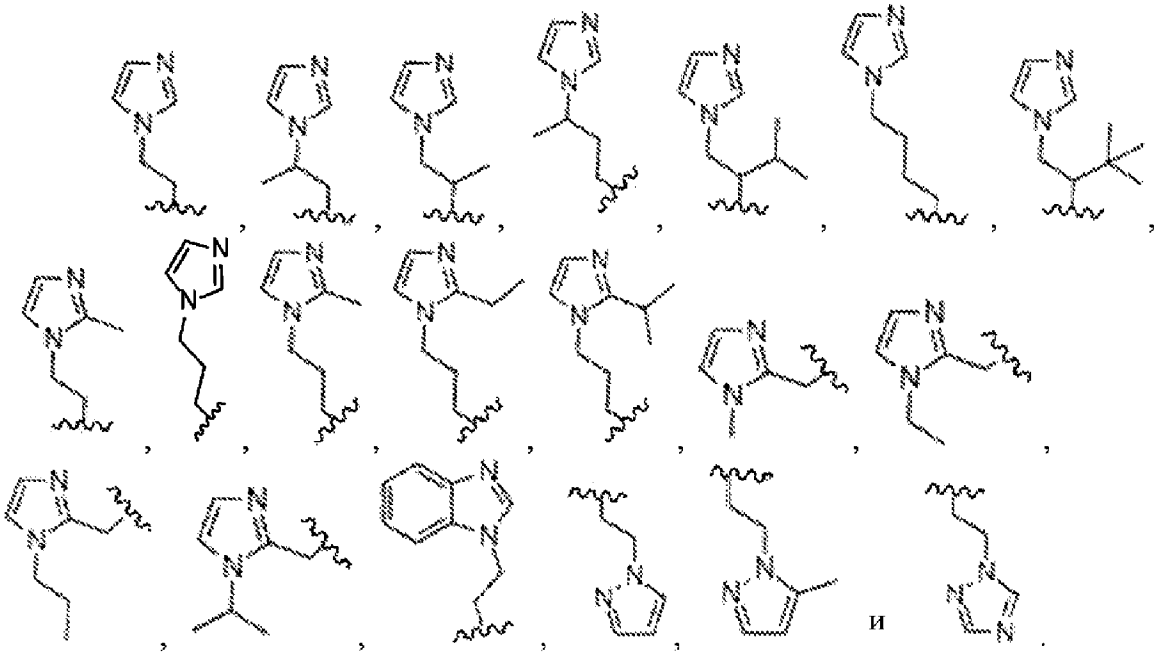
где

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

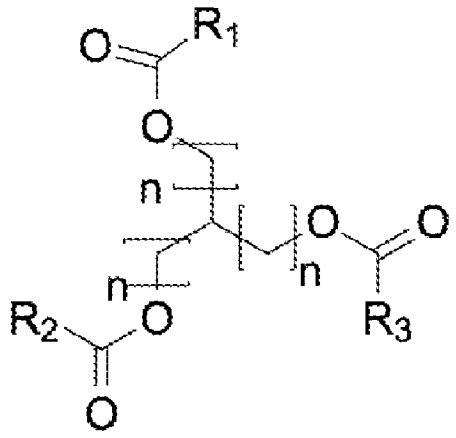
каждый из R_1 и R_3 независимо представляют собой линейный или разветвленный C_9-C_{20}алкил или C_9-C_{20}алкенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо, галогена, гидрокси, циано, алкила, алкенила, альдегида, гетероциклилалкила, гидроксиалкила,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

алкенилкарбонила, алкинилкарбонила, алкилсульфоксида, алкилсульфоксидалкила, алкилсульфонила и алкилсульфоналкил, и

R_2 выбран из группы, состоящей из:



В некоторых вариантах осуществления LNP, предусматривающая формулу (xxii), применяется для доставки композиции на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида), описанной в данном документе, к клеткам. В некоторых вариантах осуществления LNP формулы (xxii) представляет собой LNP, описанную в WO 2021113777 (например, липид формулы (2), такой как липид из таблицы 2 в WO 2021113777).

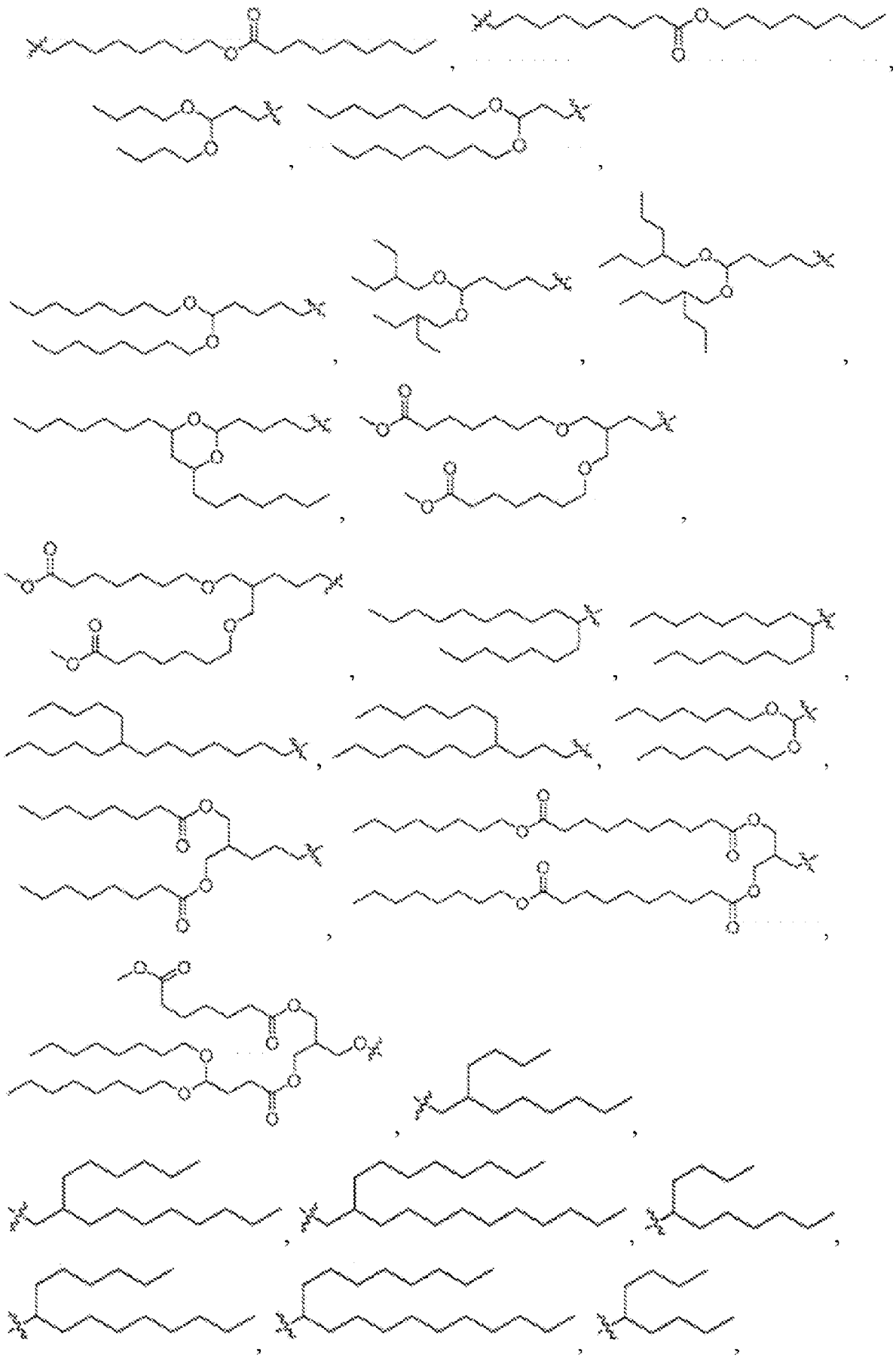


(xxii),

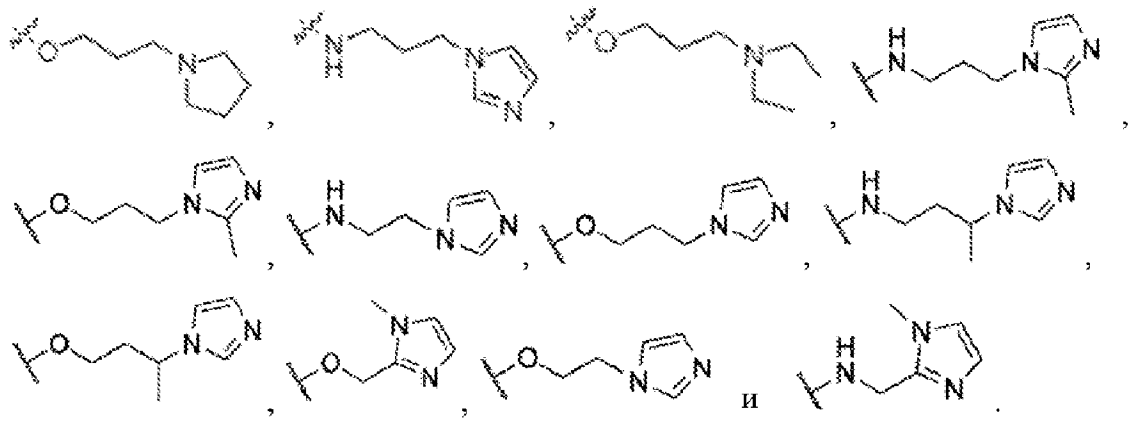
где

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

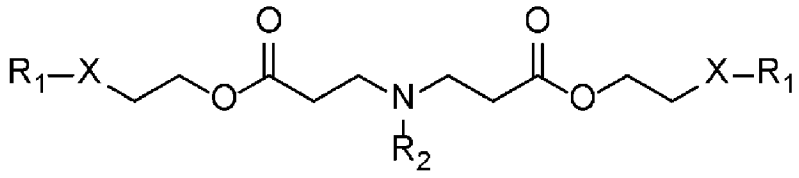
Каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из:



R_3 выбран из группы, состоящей из:



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

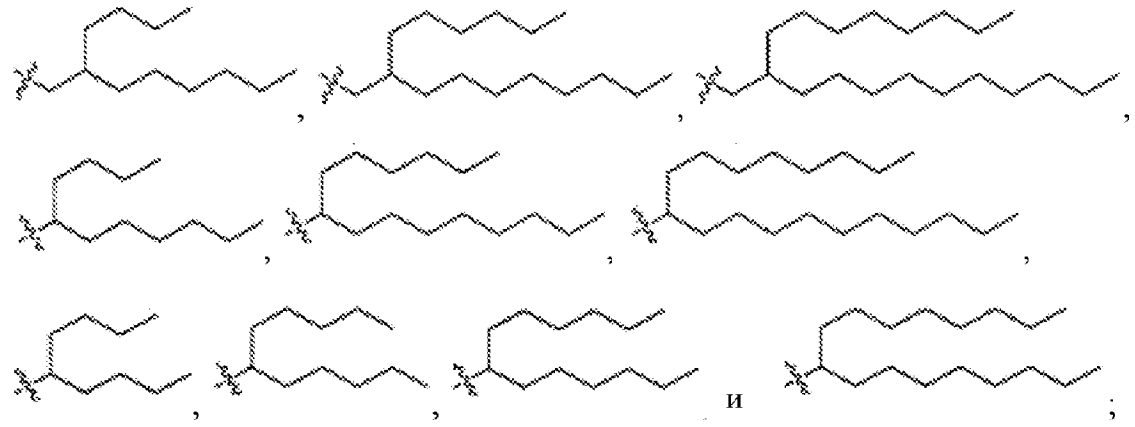


(xxiii),

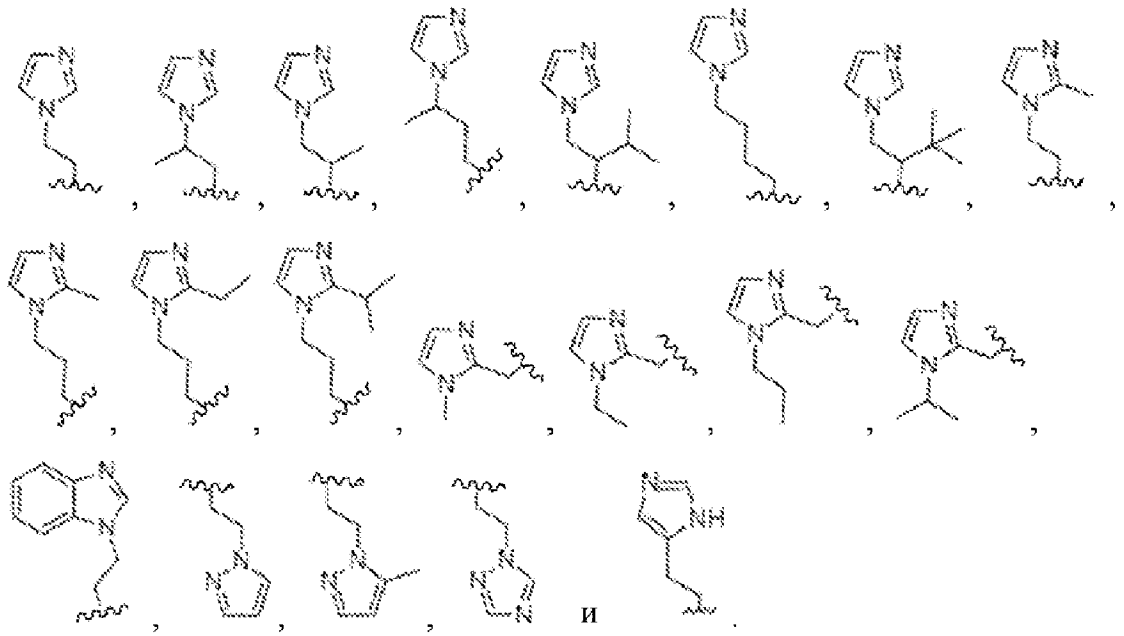
где

X выбран из -O-, -S- или -OC(O)-*, где * указывает точку присоединения к R_1;

R_1 выбран из группы, состоящей из:



и R_2 выбран из группы, состоящей из:



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

представляет собой липид на основе сложного эфира холестерина, содержащего имидазол (ICE) – (3S,10R,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-тетрадекагидро-1H-циклопента[a]фенантрен-3-ил-3-(1H-имидазол-4-ил)пропаноат, например структуру (I) из документа WO2020/106946 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

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

наночастица может содержать нацеливающий компонент, например быть покрытой нацеливающим средством. В вариантах осуществления состав на основе LNP является биоразлагаемым. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица, содержащая один или несколько липидов, описанных в данном документе, например соединения формулы (i), (ii), (ii), (vii) и/или (ix), инкапсулирует по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или 100% молекулы РНК.

Иллюстративные ионизируемые липиды, которые можно применять в составах на основе липидных наночастиц, включают без ограничения липиды, перечисленные в таблице 1 документа WO2019051289, включенного в данный документ посредством ссылки. Дополнительные иллюстративные липиды включают без ограничения соединения одной или нескольких из следующих формул: X из документа US 2016/0311759; I из документа US 20150376115 или из документа US 2016/0376224; I, II или III из документа US 20160151284; I, IA, II или IIA из документа US 20170210967; I-c из документа US 20150140070; A из документа US 2013/0178541; I из документа US 2013/0303587 или документа US 2013/0123338; I из документа US 2015/0141678; II, III, IV или V из документа US 2015/0239926; I из документа US 2017/0119904; I или II из документа WO 2017/117528; A из документа US 2012/0149894; A из документа US 2015/0057373; A из документа WO 2013/116126; A из документа US2013/0090372; A из документа US 2013/0274523; A из документа US 2013/0274504; A из документа US 2013/0053572; A из документа WO 2013/016058; A из документа WO 2012/162210; I из документа US 2008/042973; I, II, III или IV из документа US 2012/01287670; I или II из документа US 2014/0200257; I, II или III из документа US 2015/0203446; I или III из документа US 2015/0005363; I, IA, IB, IC, ID, II, IIA, IIB, IIC, IID или III-XXIV из документа US 2014/0308304; из документа US 2013/0338210; I, II, III или IV из документа WO 2009/132131; A из документа US 2012/01011478; I или XXXV из документа US 2012/0027796; XIV или XVII из документа US 2012/0058144; из документа US2013/0323269; I из документа US 2011/0117125; I, II или III из документа US 2011/0256175; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII из документа US 2012/0202871; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV или XVI из документа US 2011/0076335; I или II из документа US 2006/008378; I из документа US 2013/0123338; I или X-A-Y-Z из документа US 2015/0064242; XVI, XVII или XVIII из документа

US 2013/0022649; I, II или III из документа US 2013/0116307; I, II или III из документа US 2013/0116307; I или II из документа US 2010/0062967; I-X из документа US 2013/0189351; I из документа US 2014/0039032; V из документа US 2018/0028664; I из документа US2016/0317458; I из документа US 2013/0195920; 5, 6 или 10 из документа US 10221127; III-3 из документа WO 2018/081480; I-5 или I-8 из документа WO 2020/081938; 18 или 25 из документа US 9867888; A из документа US 2019/0136231; II из документа WO 2020/219876; 1 из документа US 2012/0027803; OF-02 из документа US 2019/0240349; 23 из документа US 10086013; cKK-E12/A6 из публикации Miao et al. (2020); C12-200 из документа WO 2010/053572; 7C1 из публикации Dahlman et al. (2017); 304-O13 или 503-O13 из публикации Whitehead et al.; TS-P4C2 из документа US 9708628; I из документа WO 2020/106946; I из документа WO 2020/106946 и (1), (2), (3), or (4) из документа WO 2021/113777. Иллюстративные липиды дополнительно предусматривают липид, указанный в любой из таблиц 1-16 из документа WO 2021/113777.

В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой MC3 (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (DLin-MC3-DMA или MC3), например, описанный в примере 9 документа WO2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой липид ATX-002, например, описанный в примере 10 документа WO 2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой (13Z,16Z)-A,A-диметил-3-нонилдокоза-13-16-диен-1-амин (соединение 32), например, описанное в примере 11 документа WO 2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение 6 или соединение 22, например, описанные в примере 12 документа WO 2019051289A9 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Иллюстративные некатионные липиды включают без ограничения дистеароил-sn-глицерофосфоэтаноламин, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-Mal),

дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), монометилфосфатидилэтаноламин (такой как 16-O-монометил-PE), диметилфосфатидилэтаноламин (такой как 16-O-диметил-PE), 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE), гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC), яичный фосфатидилхолин (EPC), диолеоилфосфатидилсерин (DOPS), сфингомиелин (SM), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG), диэрукоилфосфатидилхолин (DEPC), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG), диэлаидоилфосфатидилэтаноламин (DEPE), лецитин, фосфатидилэтаноламин, лизолецитин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, сфингомиелин, яичный сфингомиелин (ESM), цефалин, кардиолипин, фосфатидную кислоту, цереброзиды, дицетилфосфат, лизофосфатидилхолин, дилинолеоилфосфатидилхолин или их смеси. Понятно, что можно также применять другие диацилфосфатидилхолиновые и диацилфосфатидилэтаноламиновые фосфолипиды. Ацильные группы в данных липидах предпочтительно представляют собой ацильные группы, полученные из жирных кислот, имеющих C10-C24-углеродные цепи, например лауроила, миристоила, пальмитоила, стеароила или олеоила. Дополнительные иллюстративные липиды в определенных вариантах осуществления включают без ограничения липиды, описанные в работе Kim et al. (2020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386, включенной в данный документ посредством ссылки. Такие липиды включают в некоторых вариантах осуществления липиды растений, которые, как было обнаружено, обеспечивают улучшение трансфекции с использованием мРНК в печени (например, DGTS).

Другие примеры некатионных липидов, пригодных для применения в липидных наночастицах, включают без ограничения липиды, не содержащие фосфор, такие как, например, стеариламин, додециламин, гексадециламин, ацетилпальмитат, глицеринрицинолеат, гексадецилстеарат, изопропилмиристат, амфотерные акриловые полимеры, лаурилсульфат триэтаноламина, алкиларилсульфат, полиэтилоксилированные амиды жирных кислот, бромид диоктадецилдиметиламмония, церамид, сфингомиелин и т. п. Другие некатионные липиды описаны в документе WO 2017/099823 или в публикации заявки на патент США US 2018/0028664, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления некатионный липид представляет собой олеиновую кислоту или соединение формулы I, II или IV из документа US 2018/0028664,

включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Некатионный липид может составлять, например, 0-30% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления содержание некатионных липидов составляет 5-20% (мол.) или 10-15% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. В вариантах осуществления молярное отношение ионизируемых липидов к нейтральным липидам находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 8:1 (например, составляет приблизительно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 или 8:1).

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

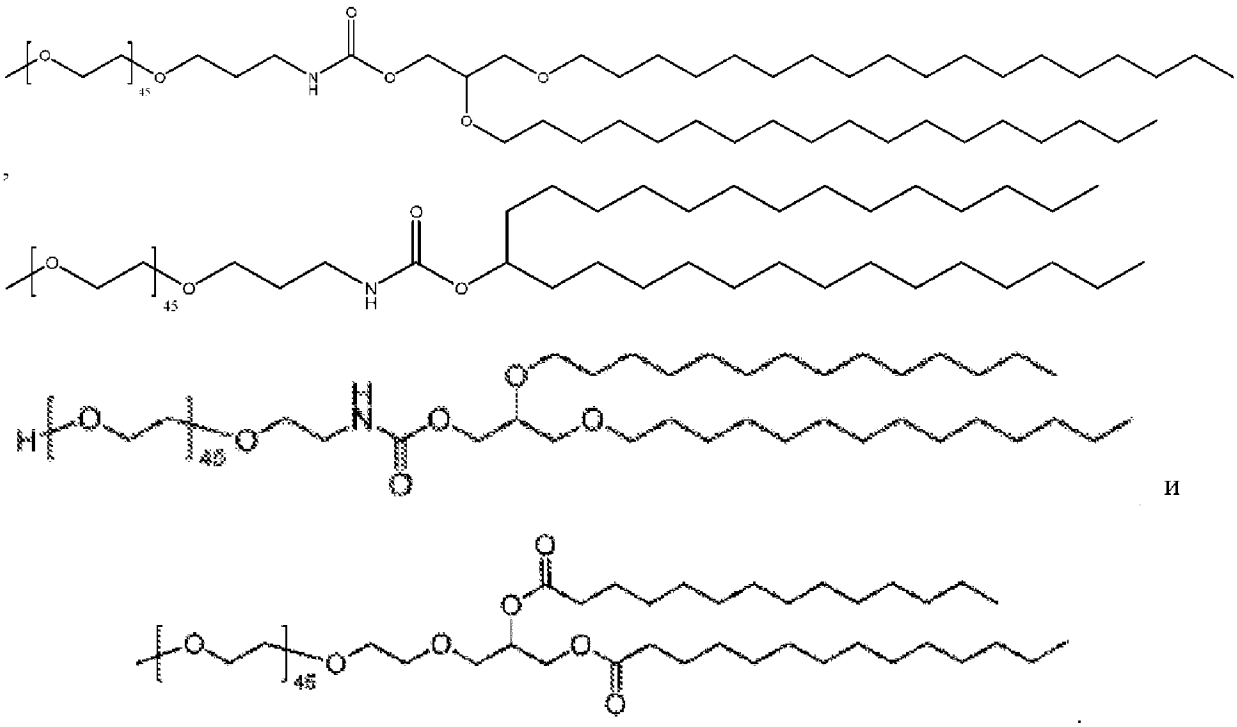
В некоторых аспектах липидная наночастица может дополнительно содержать компонент, такой как стерин, для обеспечения целостности мембраны. Одним иллюстративным стерином, который можно применять в липидной наночастице, является холестерин и его производные. Неограничивающие примеры производных холестерина включают полярные аналоги, такие как 5а-холестанол, 53-копростанол, холестерил-(2'-гидрокси)-этиловый эфир, холестерил-(4'-гидрокси)-бутиловый эфир и 6-кетохолестанол; неполярные аналоги, такие как 5а-холестан, холестенон, 5а-холестанон, 5р-холестанон и холестерилдеканоат и их смеси. В некоторых вариантах осуществления производное холестерина представляет собой полярный аналог, например холестерил-(4'-гидрокси)бутиловый эфир. Иллюстративные производные холестерина описаны в публикации согласно PCT WO 2009/127060 и публикации заявки на патент США US 2010/0130588, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица может содержать полиэтиленгликоль (PEG) или конъюгированную молекулу липида. Обычно они применяются для ингибирования агрегации липидных наночастиц и/или обеспечения стерической стабилизации. Иллюстративные конъюгированные липиды включают без ограничения конъюгаты PEG-липид, конъюгаты полиоксазолин (POZ)-липид, конъюгаты полиамид-липид (такие как конъюгаты ATTA-липид), конъюгаты катионный полимер-

липид (CPL) и их смеси. В некоторых вариантах осуществления молекула конъюгированного липида представляет собой конъюгат PEG-липид, например, липид, конъюгированный с (метоксиполиэтиленгликолем).

Иллюстративные конъюгаты PEG-липид включают без ограничения PEG-диацилглицерин (DAG) (такой как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG)), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer), пегилированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), PEG-сукцинатдиацилглицерин (PEG-DAG) (например, 4-0-(2',3'-ди(тетрадеканоилокси)пропил-1-0-(w-метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG)), PEG-диалкоксипропилкарбам, натриевую соль N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль 2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина или их смесь. Дополнительные иллюстративные конъюгаты PEG-липид описаны, например, в US 5885613, US 6287591, US 2003/0077829, US 2003/0077829, US 2005/0175682, US 2008/0020058, US 2011/0117125, US 2010/0130588, US 2016/0376224, US 2017/0119904 и US/099823, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы III, III-a-I, III-a-2, III-b-1, III-b-2 или V из документа US 2018/0028664, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид представляет собой соединение формулы II из документов US 20150376115 или US 2016/0376224, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил, PEG-димиристилоксипропил, PEG-дипальмитилоксипропил или PEG-дистеарилоксипропил. PEG-липид может представлять собой один или несколько из PEG-DMG, PEG-дилаурилглицерина, PEG-дипальмитоилглицерина, PEG-дистерилглицерина, PEG-дилаурилгликамида, PEG-димиристилгликамида, PEG-дипальмитоилгликамида, PEG-дистерилгликамида, PEG-холестерин-(1-[8'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диоксаоктанил]карбамоил-[омега]-метилполи(этиленгликоля), PEG-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполи(этиленгликолевого) эфира) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоля)-2000]. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид предусматривает PEG-DMG, 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид предусматривает структуру, выбранную из следующего:



и

В некоторых вариантах осуществления вместо PEG-липида также можно использовать липиды, конъюгированные с молекулой, отличной от PEG. Например, вместо PEG-липида или в дополнение к нему можно использовать конъюгаты полиоксазолин (POZ)-липид, конъюгаты полиамид-липид (такие как конъюгаты ATTA-липид) и конъюгаты катионный полимер-липид (GPL).

Иллюстративные конъюгированные липиды, т. е. конъюгаты PEG-липид, конъюгаты (POZ)-липид, конъюгаты ATTA-липид и катионный полимер-липид, описаны в патентных заявках согласно PCT и LIS, указанных в таблице 2 документа WO 2019051289A9, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления PEG или конъюгированный липид могут составлять 0-20% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления содержание PEG или конъюгированного липида составляет 0,5-10% или 2-5% (мол.) от общего количества липидов, присутствующих в липидной наночастице. Молярные отношения ионизируемого липида, некатионного липида, стерина и PEG-конъюгированного липида можно изменять по мере необходимости. Например, липидная частица может содержать 30-70% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 0-60% холестерина по молям или от общего веса композиции, 0-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции и 1-10% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции. Предпочтительно композиция содержит 30-40% ионизируемого липида по

молям или от общего веса композиции, 40-50% холестерина по молям или от общего веса композиции и 10-20% некатионного липида по молям или от общего веса композиции. В некоторых других вариантах осуществления композиция содержит 50-75% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 20-40% холестерина по молям или от общего веса композиции, 5-10% некатионного липида по молям или от общего веса композиции и 1-10% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции. Композиция может содержать 60-70% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 25-35% холестерина по молям или от общего веса композиции и 5-10% некатионного липида по молям или от общего веса композиции. Композиция может также содержать до 90% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции и 2-15% некатионного липида по молям или от общего веса композиции. Состав также может представлять собой состав на основе липидных наночастиц, например, содержащий 8-30% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 5-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции и 0-20% холестерина по молям или от общего веса композиции; 4-25% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 4-25% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, 2-25% холестерина по молям или от общего веса композиции, 10-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 5% холестерина по молям или от общего веса композиции; или 2-30% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции, 2-30% некатионного липида по молям или от общего веса композиции, 1-15% холестерина по молям или от общего веса композиции, 2-35% конъюгированного липида по молям или от общего веса композиции и 1-20% холестерина по молям или от общего веса композиции; или даже до 90% ионизируемого липида по молям или от общего веса композиции и 2-10% некатионных липидов по молям или от общего веса композиции, или даже 100% катионного липида по молям или от общего веса композиции. В некоторых вариантах осуществления состав на основе липидных частиц содержит ионизируемый липид, фосфолипид, холестерин и пегилированный липид при молярном отношении 50: 10:38,5: 1,5. В некоторых других вариантах осуществления состав на основе липидных частиц содержит ионизируемый липид, холестерин и пегилированный липид при молярном отношении 60:38,5: 1,5.

В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит ионизируемый липид, некатионный липид (например, фосфолипид), стерин (например, холестерин) и пегилированный липид, где молярное соотношение липидов находится в диапазоне от 20 до 70 молярных процентов для ионизируемого липида при целевом значении 40-60,

молярный процент для некатионного липида находится в диапазоне от 0 до 30 при целевом значении от 0 до 15, молярный процент стерина находится в диапазоне от 20 до 70 при целевом значении от 30 до 50, и молярный процент пегилированного липида находится в диапазоне от 1 до 6 при целевом значении от 2 до 5.

В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит ионизируемый липид/некатионный липид/стерин/конъюгированный липид при молярном отношении 50:10:38.5: 1,5.

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

В некоторых вариантах осуществления также могут быть включены одно или несколько дополнительных соединений. Данные соединения можно вводить отдельно, или дополнительные соединения могут быть включены в липидные наночастицы по настоящему изобретению. Другими словами, липидные наночастицы могут содержать другие соединения в дополнение к нуклеиновой кислоте или по меньшей мере вторую нуклеиновую кислоту, отличающуюся от первой. Другие дополнительные соединения могут без ограничений быть выбраны из группы, состоящей из малых или больших органических или неорганических молекул, моносахаридов, дисахаридов, трисахаридов, олигосахаридов, полисахаридов, пептидов, белков, аналогов пептидов и их производных, пептидомиметиков, нуклеиновых кислот, аналогов нуклеиновых кислот и производных, экстрактов, полученных из биологических материалов, или любых их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления LNP содержат биоразлагаемые ионизируемые липиды. В некоторых вариантах осуществления LNP содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат, или другой ионизируемый липид. См., например, липиды в документах WO 2019/067992, WO/2017/173054, WO 2015/095340 и WO 2014/136086, а также приведенные в них ссылки. В некоторых вариантах осуществления термины "катионный" и "ионизируемый" применительно к липидам LNP являются взаимозаменяемыми, например, где ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от значения pH.

В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от нескольких 10 до нескольких 100 нм, например, как измерено с

помощью динамического светорассеяния (DLS). В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 40 нм до приблизительно 150 нм, например приблизительно 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 50 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 70 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 60 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 70 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 80 до приблизительно 100 нм, от приблизительно 80 до приблизительно 90 нм или от приблизительно 90 нм до приблизительно 100 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм. В конкретном варианте осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять приблизительно 80 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP может составлять приблизительно 100 нм. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр LNP в составе на основе LNP находится в диапазоне от приблизительно 1 мм до приблизительно 500 мм, от приблизительно 5 мм до приблизительно 200 мм, от приблизительно 10 мм до приблизительно 100 мм, от приблизительно 20 мм до приблизительно 80 мм, от приблизительно 25 мм до приблизительно 60 мм, от приблизительно 30 мм до приблизительно 55 мм, от приблизительно 35 мм до приблизительно 50 мм или от приблизительно 38 мм до приблизительно 42 мм.

В некоторых случаях LNP может быть относительно однородной. Индекс полидисперсности может применяться для указания однородности LNP, например, распределения липидных наночастиц по размерам. Небольшой (например, менее 0,3) индекс полидисперсности обычно указывает на узкое распределение частиц по размерам. LNP может характеризоваться индексом полидисперсности от приблизительно 0 до приблизительно 0,25, например, 0 0,25. В некоторых вариантах осуществления индекс полидисперсности LNP может составлять от приблизительно 0,10 до приблизительно 0,20.

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

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

составлять по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 90%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 95%.

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

Дополнительные иллюстративные липиды, составы, способы и определение характеристик LNP описаны в документах WO 2020/061457 и WO 2021/113777, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительные иллюстративные липиды, составы, способы и определение характеристик LNP описаны в работе Hou et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nat Rev Mater (2021). doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (см., например, иллюстративные липиды и производные липидов на фиг. 2 в работе Hou et al.).

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

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

Дополнительные конкретные составы на основе LNP, пригодные для доставки нуклеиновых кислот (например, кольцевых полирибонуклеотидов, линейных полирибонуклеотидов), описаны в документах US8158601 и US8168775, оба из которых

включены посредством ссылки, и они включают составы, применяемые в патисиране, продаваемом под названием ONPATTRO.

Иллюстративная дозировка LNP на основе полирибонуклеотида (например, кольцевого полирибонуклеотида, линейного полирибонуклеотида) может предусматривать приблизительно 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 или 100 мг/кг (РНК). Иллюстративная доза AAV, содержащего полирибонуклеотид (например, кольцевой полирибонуклеотид, линейный полирибонуклеотид), может предусматривать MOI, составляющую приблизительно 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} и 10^{14} vg/кг.

Адъюванты

Адъювант обеспечивает усиление видов иммунного ответа (гуморального и/или клеточного), вызываемых у субъекта, который получает адъювант и/или иммуногенную композицию, содержащую адъювант. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят адъювант, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в способах, описанных в данном документе, применяется адъювант для получения иммунного ответа, как описано в данном документе. В конкретном варианте осуществления адъювант применяют для содействия иммунному ответу у субъекта на иммуноген, экспрессируемый кольцевым полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления адъювант и полирибонуклеотид вводят совместно в виде отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления адъювант смешивают или составляют с полирибонуклеотидом в одной композиции и вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления адъювант и кольцевой или линейный полирибонуклеотид вводят совместно в виде отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления адъювант смешивают или составляют с линейным или кольцевым полирибонуклеотидом в виде одной композиции с получением иммуногенной композиции, которую вводят субъекту.

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

вводиться отдельно (например, в виде отдельной фармацевтической композиции) в комбинации с полирибонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления адъювант кодируется кольцевым или линейным полирибонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодирует более одного адъюванта. Например, кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодирует от 2 до 100 адъювантов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодирует от 2 до 10 адъювантов. В некоторых вариантах осуществления кольцевой или линейный полирибонуклеотид кодирует 2 адъюванта. Один или несколько адъювантов, кодируемых кольцевым или линейным полирибонуклеотидом, может содержать N-концевую сигнальную последовательность, например, таковую, которая направляет экспрессируемый полипептидный адъювант по секреторному пути. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 3 адъюванта. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 4 адъюванта. В некоторых вариантах осуществления полирибонуклеотид кодирует 5 адъювантов. В некоторых вариантах осуществления адъювант кодируется тем же полирибонуклеотидом, который кодирует один или несколько иммуногенов. Адъювант(ы) и иммуноген(ы) могут быть совместно доставлены на одном и том же полирибонуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления адъювант, кодируемый полирибонуклеотидом, представляет собой последовательность (например, последовательность полирибонуклеотида), которая является стимулятором врожденной иммунной системы. Последовательность стимулятора врожденной иммунной системы может содержать по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100 или по меньшей мере 500 рибонуклеотидов. Последовательность стимулятора врожденной иммунной системы может содержать от 5 до 1000, от 10 до 500, от 20 до 500, от 10 до 100, от 20 до 100, от 20 до 50, от 100 до 500, от 500 до 1000 или от 10 и 1000 рибонуклеотидов. Например, последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы, может быть выбрана из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

Адъюванты могут представлять собой адъювант TH1 и/или адъювант TH2. Дополнительные адъюванты, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают без ограничения одно или несколько из следующего.

Минералосодержащие композиции. Минералосодержащие композиции, подходящие для применения в качестве адъювантов в настоящем изобретении, включают

минеральные соли, такие как соли алюминия и соли кальция. Настоящее изобретение предусматривает минеральные соли, такие как гидроксиды (например, оксигидроксиды), фосфаты (например, гидроксифосфаты, ортофосфаты), сульфаты и т. д., или смеси разных минеральных соединений, при этом соединения принимают любую подходящую форму (например, геля, кристаллическую, аморфную и т. д.). Соли кальция включают фосфат кальция (например, "CAP"). Соли алюминия включают гидроксиды, фосфаты, сульфаты и т. п.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

адъювант представляет собой аналог кольцевого полирибонуклеотида, представляющий собой линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе.

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

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

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

Адъювант для применения в настоящем изобретении, может быть получен из бактерий, например, флагеллин, LPS или бактериальный токсин (например, энтеротоксины (белок), например, термолабильный токсин или холерный токсин). Адъювант для применения в настоящем изобретении может представлять собой гибридную молекулу, такую как CpG, конъюгированную с имиквимодом. Адъювант для применения в настоящем изобретении может представлять собой ассоциированный с микроорганизмами молекулярный паттерн (MAMP) гриба или ооцита, такой как хитин или бета-глюкан. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой неорганическую наночастицу, такую как золотые наностержни или наночастицы на основе диоксида кремния (например, наночастицы на основе мезопористого диоксида кремния (MSN)). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой многокомпонентный адъювант или систему на основе адъюванта, такие как AS01, AS03, AS04 (MLP5 + алюминиевые квасцы), CFA (полный адъювант Фрейнда: IFA + пептидогликан + димиколят трегалозы), CAF01 (двухкомпонентная система, состоящая из среды-носителя на основе катионной липосомы (диметилдиоктадециламмония (DDA)), стабилизированной с помощью гликолипидного иммуномодулятора (6,6-дибегената трегалозы (TDB), который может представлять собой синтетический вариант фактора жгутообразования, расположенного в клеточной стенке микобактерий).

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

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

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

Адъювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, circRNA или мРНК), кодирующие стимулятор врожденной иммунной системы (частичный, полноразмерный или мутированный), такой как TLR4, TLR3, TLR3, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 или MDA-5/IFIH1, или конститутивно активный (ca) стимулятор врожденного иммунитета, такой как caTLR4, caTLR3, caTLR3, caTLR9, caTLR7, caTLR8, caTLR7, caRIG-I/DDX58 или caMDA-5/IFIH1.

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

Адъювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, circRNA или мРНК), кодирующие активатор транскрипции, такой как активатор транскрипции, который обладает способностью усиливать иммунный ответ (например, AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 или IRF5). Адъювант может представлять собой часть ДНК или полноразмерную ДНК, кодирующую рецептор цитокина, такой как IL-2-бета, IFN-гамма или IL-6.

Адъювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, circRNA или мРНК), кодирующие бактериальный компонент, такой как флагеллин или MBL.

Адъювант может представлять собой часть или полноразмерную ДНК или РНК (например, circRNA или мРНК), кодирующие любой компонент врожденной иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят кольцевой или линейный полирибонуклеотид, кодирующий один или несколько иммуногенов, в комбинации с адъювантом (например, адъювантом, который представляет собой молекулярную единицу, отдельную от кольцевого полирибонуклеотида, или адъювант, который кодируется отдельным полирибонуклеотидом). Термин "в комбинации с", используемый в данном описании, предусматривает любые две композиции, вводимые в качестве части

терапевтического режима. Это может предусматривать, например, полирибонуклеотид и адъювант, составленные в виде одной фармацевтической композиции. Это также предусматривает, например, полирибонуклеотид и адъювант, вводимые субъекту в виде отдельных композиций в соответствии с определенным терапевтическим режимом или режимом введения доз. Адъювант можно вводить субъекту до, по сути одновременно или после введения полирибонуклеотида. Адъювант можно вводить в пределах 1 дня, 2 дней, 5 дней, 10 дней, 20 дней, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев до или после введения полирибонуклеотида. Адъювант можно вводить тем же путем (например, внутримышечно, подкожно, внутривенно, внутрибрюшинно, местно или перорально), что и полирибонуклеотид, или отличающимся путем.

Вакцины

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, субъекту также вводят второе средство, например, субъекту также вводят вторую вакцину. В некоторых вариантах осуществления композиция, которую вводят субъекту, содержит кольцевой полирибонуклеотид, описанный в данном документе, и вторую вакцину. В некоторых вариантах осуществления вакцину и кольцевой полирибонуклеотид вводят совместно в отдельных композициях. Вакцину вводят одновременно с иммунизацией с помощью кольцевого полирибонуклеотида, вводят до иммунизации с помощью кольцевого полирибонуклеотида или после иммунизации с помощью кольцевого полирибонуклеотида.

Например, в некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют вакциной на основе некольцевого полирибонуклеотида (например, белковой субъединичной вакциной) и иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют не содержащей полирибонуклеотида вакциной против первого микроорганизма (например, пневмококка) и иммуногенной композицией, содержащей кольцевой полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе. Вакцина может представлять собой любую вакцину против бактериальной инфекции или вакцину против вирусной инфекции. В конкретном варианте осуществления вакцина представляет собой пневмококковую полисахаридную вакцину, такую как PCV13 или PPSV23. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против RSV (например, паливизумаб).

В некоторых вариантах осуществления композиция, которую вводят субъекту, содержит линейный полирибонуклеотид и вакцину. В некоторых вариантах осуществления вакцину и линейный полирибонуклеотид вводят совместно в отдельных композициях. Вакцину вводят одновременно с иммунизацией с помощью линейного полирибонуклеотида, вводят до иммунизации с помощью линейного полирибонуклеотида или после иммунизации с помощью линейного полирибонуклеотида.

Например, в некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют вакциной на основе полирибонуклеотида (например, нелинейного полирибонуклеотида) (например, белковой субъединичной вакциной) и иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, описанный в данном документе, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген. В некоторых вариантах осуществления субъекта иммунизируют не содержащей полирибонуклеотида вакциной против первого микроорганизма (например, пневмококка) и иммуногенной композицией, содержащей линейный полирибонуклеотид, раскрытый в данном документе, содержащий последовательность, кодирующую иммуноген коронавируса. Вакцина может представлять собой любую вакцину против бактериальной инфекции или вакцину против вирусной инфекции. В конкретном варианте осуществления вакцина представляет собой пневмококковую полисахаридную вакцину, такую как PCV13 или PPSV23. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против вируса гриппа. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против RSV (например, паливизумаб).

Другие варианты осуществления

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

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

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

ПРИМЕРЫ

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

Пример 1. Конструирование кольцевой РНК, кодирующей иммуногены

В данном примере описано конструирование кольцевых РНК, которые кодируют иммуногены. В данном примере кольцевые РНК конструируют таким образом, что они включают IRES, ORF, кодирующую иммуноген, и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF. Циркуляризация обеспечивает трансляцию по типу "катящегося кольца", несколько ORF с переменными сдвигающими элементами для дискретной экспрессии ORF и регулируемого белкового стехиометрического соотношения, а также IRES, который нацеливается на РНК для посадки рибосомы. Примерные иммуногены, которые кодируются кольцевой РНК, представляют собой иммуногены вируса SARS-Cov-2 (RBD и шиповидный белок), иммуногены вируса гриппа H1N1, иммуногены вируса HPV и опухолевые неоантигены.

Пример 2. Получение и очистка кольцевой РНК

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

Примерный способ 1. Лигирование с помощью ДНК-шунта

С помощью данного примерного способа получают кольцевую РНК посредством лигирования с помощью шунта. Линейную РНК, обработанную RppH, циркуляризируют с применением ДНК-шунта. Немодифицированную линейную РНК синтезируют путем транскрипции in vitro с использованием РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищают с помощью системы для очистки РНК (New England Biolabs), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356)

следуя инструкциям производителя. В качестве альтернативы или дополнительно РНК транскрибировали при избытке GMP относительно GTP.

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

Примерный способ 2. Циркуляризация посредством самосплайсирующегося интрона

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

Пример 3. Экспрессия нескольких иммуногенов из кольцевой РНК

В данном примере описана экспрессия нескольких иммуногенов из кольцевой РНК.

В данном примере одну кольцевую РНК конструируют таким образом, чтобы она содержала IRES (SEQ ID NO: 1), за которым следует ORF, кодирующая иммуноген 1, соответствующий части гемагглютинина (HA) из первого штамма вируса гриппа A H1N1,

A/California/07/2009(H1N1) (SEQ ID NO: 2), стоп-кодон, IRES (SEQ ID NO: 1), другая ORF, кодирующая иммуноген 2, соответствующий части гемагглютинина (HA) из второго штамма вируса гриппа A H1N1, A/Puerto Rico/8/1934 (SEQ ID NO: 3), стоп-кодон и спейсер (SEQ ID NO: 4), см. **фиг. 1A** Кольцевые РНК получают либо *in vitro*, либо в клетках в соответствии со способами, описанными в данном документе.

Если вкратце, кольцевую РНК инкубируют в течение 1,5-3 ч в лизате кроличьих ретикулоцитов (RRL; Promega, Фичберг, штат Висконсин, США) при 30°C. Конечный состав реакционной смеси включает 70% лизата кроличьих ретикулоцитов, 20 мкМ смеси аминокислот (Promega; L446A) и 0,8 ед/мкл ингибитора рибонуклеаз RNasin® (Promega, N211A). Гемоглобин удаляют посредством осаждения трихлоруксусной кислотой. После осаждения и центрифугирования супернатант удаляют и осадок растворяют в буфере для нанесения образцов 2× SDS (Thermo) и инкубируют при 70°C в течение 15 мин. Образцы разделяют в 4-12% градиентных полиакриламидных гелях с додецилсульфатом натрия (SDS) (Thermo, NP0326BOX) с последующим вестерн-блоттингом. Белки подвергают электропереносу на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) (Thermo) с применением полусухого способа, подвергают блоттингу и метят специфическими антителами и визуализируют посредством считывания хемилюминесценции на сканере C-Digit (LI-COR Biosciences). Image-Studio Lite (LI-COR Biosciences) используют для количественного определения уровней экспрессии.

Кроме того, экспрессию иммуногена 1 и иммуногена 2 измеряют посредством анализа ELISA в культуральных супернатантах клеток HeLa, трансфицированных eRNA. Если вкратце, 0,1 пмоль eRNA трансфицируют в 10000 клеток HeLa с применением MessengerMax (Invitrogen; LMRNA015) в Opti-MEM (Invitrogen; 31985062). Клеточный супернатант собирают на 1-й и 2-й дни. Анализ посредством ELISA выполняют следующим образом: в планшетах для ELISA (MaxiSorp 442404, 96 лунок) иммобилизуют захватывающее антитело в течение ночи при 4°C в 100 мкл PBS. После трехкратной промывки с использованием TBS-T планшеты блокируют в течение 1 часа посредством блокирующего буфера (TBS с 2% FBS и 0,05% Tween 20). Затем в каждую лунку добавляют разведения супернатантов в 100 мкл блокирующего буфера и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с использованием TBS-T планшеты инкубируют с HRP детектирующим антителом в течение 1 часа при комнатной температуре. В каждую лунку добавляют тетраметилбензол (Pierce 34021), позволяют прореагировать в течение 5-15 минут и затем гасят 2 н. серной кислотой. Значение оптической плотности (OD) определяют при длине волны 450 нм.

Пример 4. Кольцевая РНК, кодирующая иммуноген и адъювант

В данном примере описывается способность кольцевой РНК экспрессировать иммуноген и дополнительно кодировать адъювант. Адъювант может быть экспрессированным или может соответствовать неэкспрессированной последовательности нуклеиновой кислоты, такой как последовательность стимулятора врожденного иммунитета.

В первом случае одну кольцевую РНК конструируют таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая иммуноген, стоп-кодон, IRES, другая ORF, кодирующая адъювант, стоп-кодон и спейсер, см. **фиг. 1A**. Кольцевые РНК получают либо *in vitro*, либо в клетках и экспрессируют в соответствии со способами, описанными в данном документе.

Во втором случае одну кольцевую РНК конструируют таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая иммуноген, стоп-кодон, и дополнительно кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты, которая не экспрессируется и действует как адъювант, стимулируя врожденную иммунную систему (например, GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер), см. **фиг. 2**. Кольцевые РНК получают либо *in vitro*, либо в клетках и экспрессируют в соответствии со способами, описанными в данном документе.

Пример 5. Кольцевая РНК, кодирующая множество иммуногенов, полученных из мутационных вариантов

Например, кольцевая РНК кодирует два полипептидных иммуногена, которые являются мутационными вариантами друг друга, так что они характеризуются по меньшей мере 90% и менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности (**фиг. 1A – 1B**). Каждый из полипептидных иммуногенов содержит один или несколько эпитопов, соответствующих одному и тому же белку. Полипептидные иммуногены могут быть эндогенно встречающимися полипептидными иммуногенами, которые связаны генетическим дрейфом, или их модифицированными версиями. Кольцевую РНК конструируют со стартовым кодоном, экспрессионными последовательностями, сдвигающим(сдвигающими) элементом(элементами) и IRES (**фиг. 1B**). Циркуляризация обеспечивает возможность осуществления трансляции по типу

"катящегося кольца" нескольких экспрессионных последовательностей, разделенных сдвигающим элементом.

Мутационные варианты белка гемагглютинина, ассоциированного с вирусом гриппа, известны специалистам в данной области техники. Мутационные варианты вводятся в белок гемагглютинина в результате низкой точности вирусной полимеразы, в результате чего белки гемагглютинина больше не имеют идентичных последовательностей (Wong et al. (2011) J. Med. Virol., 83: 510-516). Следовательно, множество иммуногенов, соответствующих различным мутационным вариантам гемагглютинина, где каждый из множества иммуногенов характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, кодируется кольцевой РНК. Кольцевая РНК содержит старт-кодон, первую ORF, предусматривающую полипептидный иммуноген, полученный из белка гемагглютинина, ассоциированного с "головой" вируса гриппа, сдвигающий элемент, вторую ORF, предусматривающую полипептидный иммуноген, полученный из мутационного варианта белка гемагглютинина, и необязательный IRES.

Пример 6. Кольцевая РНК, кодирующая несколько иммуногенов, полученных из одной и той же мишени

Для данного примера кольцевая РНК кодирует два полипептидных иммуногена, полученных из двух отличающихся белков, но при этом оба белка идентифицируют одну и ту же мишень. Кольцевую РНК конструируют со стартовым кодоном, экспрессионными последовательностями, сдвигающим(сдвигающими) элементом(элементами) и IRES (**фиг. 1B**). Циркуляризация обеспечивает возможность осуществления трансляции по типу "катящегося кольца" нескольких экспрессионных последовательностей, разделенных сдвигающим элементом.

В частности, кольцевая РНК кодирует стартовый кодон, первую ORF, включающую полипептидный иммуноген, полученный из гликопротеина 120 оболочки HIV-1 (gp120), необязательный сдвигающий элемент, вторую ORF, включающую полипептидный иммуноген, полученный из гликопротеина 41 оболочки HIV-1 (gp41), и необязательно IRES, где белок оболочки HIV-1 является мишенью для полипептидных иммуногенов. Три gp120 и три gp41 объединяют в тример из гетеродимеров, где тример gp120 представляет собой головную область, а тример gp41 представляет собой хвостовую область, которые вместе образуют шипы оболочки HIV-1. Таким образом,

полипептидные иммуногены, полученные как из gp120, так и из gp41, включены в кольцевую РНК для нацеливания на белок оболочки HIV-1.

Пример 7. Кольцевая РНК, кодирующая несколько иммуногенов, полученных из отличающихся мишеней

Для данного примера кольцевая РНК кодирует два полипептидных иммуногена, полученных из двух отличающихся белков, которые идентифицируют мишени, отличающиеся друг от друга. Кольцевую РНК конструируют со стартовым кодоном, экспрессионными последовательностями, сдвигающим(сдвигающими) элементом(элементами) и IRES (**фиг. 1B**). Циркуляризация обеспечивает возможность осуществления трансляции по типу "катящегося кольца" нескольких экспрессионных последовательностей, отделенных сдвигающим элементом.

Несколько иммуногенов, полученных из отличающихся мишеней, кодируется кольцевой РНК, сконструированной так, что она содержит стартовый кодон, ORF, кодирующую полипептидный иммуноген, полученный из гликопротеина 1 оболочки (gP1) вируса ветряной оспы, сдвигающую последовательность и полипептидный иммуноген, полученный из гемагглютинина. Существует по меньшей мере 6 оболочечных гликопротеинов вируса ветряной оспы, и гликопротеины gP1, gP2, gP3 могут индуцировать выработку организмом нейтрализующих антител (Zweerink et al. 1981;31(1):436-444). Аналогично два гликопротеина оболочки, гемагглютинин и слитый белок, являются известными иммуногенами из *Morbillivirus*. Следовательно, кольцевая РНК, кодирующая полипептидный иммуноген, полученный из gP1, и полипептидный иммуноген, полученный из гемагглютинина, нацеливаются как на вирус ветряной оспы, так и на *Morbillivirus*.

Пример 8. Экспрессия нескольких иммуногенов посредством введения кольцевой РНК

В данном примере описана экспрессия нескольких иммуногенов у субъекта посредством введения нескольких молекул кольцевой РНК.

В данном примере кольцевую РНК 1 конструируют таким образом, чтобы она содержала IRES (SEQ ID NO: 1), за которым следует ORF, кодирующая иммуноген 1, соответствующий части гемагглютинина (HA) из первого штамма вируса гриппа A H1N1, A/California/07/2009 (SEQ ID NO: 2), стоп-кодон и спейсер (SEQ ID NO: 4), см. **фиг. 2**. Кольцевую РНК 2 конструируют таким образом, чтобы она содержала IRES (SEQ ID NO:

1) за которым следует ORF, кодирующая иммуноген 2, соответствующий части гемагглютинина (HA) из второго штамма вируса гриппа A H1N1, A/Puerto Rico/8/1934 (SEQ ID NO: 3), стоп-кодон и спейсер (SEQ ID NO: 4), см. **фиг. 3.** Кольцевые РНК получают посредством транскрипции in vitro (Lucigen; AS3107) и лигирования РНК с использованием РНК-лигазы, как описано в способах, представленных в данном документе.

Несколько кольцевых РНК, кодирующих несколько отличающихся иммуногенов, описанных в данном документе, составляют для введения субъекту-млекопитающему.

Кольцевые РНК составляют в виде любого из составов, включенных в данный документ. Данные составленные РНК вводят подходящим путем: или внутрикожно, подкожно, внутримышечно, или внутривенно в день 0.

Экспрессию секретируемого иммуногена оценивают в крови или тканях, отобранных у млекопитающих. Образцы крови собирают в пробирки без антикоагулянта через 1, 2, 7, 14 и 21 день после введения дозы. Сыворотку крови отделяют центрифугированием в течение 25 мин при 1300g при 4°C, и экспрессию секретируемого белка измеряют посредством анализа ELISA. Если вкратце, в планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96 лунок) иммобилизуют захватывающее антитело в течение ночи при 4°C в 100 мкл PBS. После трехкратной промывки с использованием TBS-T планшеты блокируют в течение 1 часа посредством блокирующего буфера (TBS с 2% FBS и 0,05% Tween 20). Затем в каждую лунку добавляют разведения супернатантов в 100 мкл блокирующего буфера и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с использованием TBS-T планшеты инкубируют с HRP детектирующим антителом в течение 1 часа при комнатной температуре. В каждую лунку добавляют тетраметилбензол (Pierce 34021), позволяют прореагировать в течение 5-15 минут и затем гасят 2 н. серной кислотой. Значение оптической плотности (OD) определяют при 450 нм.

Пример 9. Совместное введение иммуногена и адъюванта, кодируемых множеством кольцевых РНК

Данный пример демонстрирует введение множества кольцевых РНК субъекту для стимуляции иммунного ответа. Одна из кольцевых РНК, вводимых субъекту, кодирует полипептидный иммуноген. Другая кольцевая РНК, введенная субъекту, кодирует адъювант (**фиг. 3**).

В данном примере кольцевую РНК, кодирующую полипептидный иммуноген, конструируют, получают, очищают и готовят в виде состава. Для стимуляции иммунного ответа конструируют, получают, очищают и готовят в виде фармацевтического состава отдельную кольцевую РНК, содержащую поли(U), которая, как известно специалисту в данной области техники, действует как адъювант. Составы на основе кольцевой РНК, кодирующей полипептидный иммуноген, и поли(U)-адъювант вводят субъекту одновременно в составах, отличающиеся друг от друга.

Пример 10. Совместное введение иммуногена, кодируемого кольцевой РНК, и низкомолекулярного адъюванта

В данном примере продемонстрировано введение субъекту кольцевой РНК в комбинации с низкомолекулярным адъювантом для стимуляции иммунного ответа.

В данном примере кольцевую РНК, кодирующую полипептидный иммуноген, конструируют, получают, очищают и готовят в виде состава. Для стимуляции иммунного ответа субъекту вводят низкомолекулярный адъювант, такой как адъювант MF5®. И состав на основе кольцевой РНК, кодирующий полипептидный иммуноген, и низкомолекулярный адъювант вводят субъекту одновременно.

Пример 11. Совместное введение иммуногенной композиции, включающей несколько кольцевых РНК, каждая из которых кодирует полипептидный иммуноген, соответствующий отличающейся мишени

В данном примере субъекту вводят несколько кольцевых РНК, каждая из которых кодирует полипептидный иммуноген (**фиг. 3**).

Субъекту вводят одну кольцевую РНК, кодирующую полипептидный иммуноген, полученный из оболочечного белка гемагглютинина, известного в данной области техники для идентификации мишени *Morbillivirus*. Субъекту вводят другую кольцевую РНК, кодирующую полипептидный иммуноген, полученный из оболочечного белка гликопротеина E, известного в данной области техники для идентификации мишени вируса ветряной оспы. Обе кольцевые РНК сконструированы, получены, очищены и приготовлены в виде состава. Состав, включающий обе кольцевые РНК, вводят субъекту.

Пример 12. Индуцирование in vivo антител к иммуногену у млекопитающих с применением кольцевой РНК

Кольцевой полинуклеотид, кодирующий описанный в данном документе иммуноген, составляют для введения субъекту-млекопитающему. Состав представлен либо в физиологическом солевом растворе, либо в любом из составов, описанных в данном документе. Вакцина, содержащая кольцевой полинуклеотид, необязательно содержит одно или несколько из средства или фрагментов, нацеливающихся на дендритные клетки. Вакцину, содержащую полинуклеотид, кодирующий иммуноген, вводят подходящим путем: или внутрикожно, подкожно, внутримышечно, или внутривенно в день 0. Полинуклеотид, кодирующий иммуностимулирующее средство или иммуностимулирующий фрагмент, можно вводить совместно с полинуклеотидом, кодирующим иммуноген, для стимуляции иммунного ответа. Дополнительные контрольные введения вакцины, содержащей кольцевой полинуклеотид, кодирующий иммуноген, осуществляют раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в пять недель, раз в шесть недель, раз в семь недель или раз в восемь недель до обнаружения антитела к иммуногену. Дополнительные контрольные введения вакцины осуществляют для повышения выработки иммуноген-специфических антител.

Пример 13. Выявление экспрессии белка или иммуногена из кольцевой РНК в клетках млекопитающих

Для измерения эффективности экспрессии несекретируемых белков или иммуногенов из конструкций РНК получают кольцевую РНК (0,1 пикомоль), кодирующую белок или иммуноген, и очищают в соответствии со способами, описанными в данном документе. Кольцевую РНК трансфицируют в HEK293 (10000 клеток на лунку в 96-луночном планшете в бессывороточной среде) с применением MessengerMax (Invitrogen, LMRNA).

В случае несекретируемого белка или иммуногена экспрессию белка измеряют посредством иммуноген-специфического анализа ELISA через 24, 48 и 72 часа. Для измерения уровня экспрессии клетки подвергают лизису в каждой лунке в соответствующий момент времени с применением буфера для лизиса и ингибитора протеазы. Клеточный лизат извлекают и центрифугируют при 12000 об./мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость собирают.

В случае секретируемого белка или иммуногена экспрессию иммуногена выявляют посредством иммуноген-специфичного вестерн-блоттинга через 24, 48 и 72 часа. Если

вкратце, из каждой лунки отбирают 80 мкл супернатанта клеток млекопитающих. Уровни белка в собранной среде измеряют посредством метода анализа белка BCA, и такое же количество белка разделяют в градиентном 4-12% геле Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific) и переносят на нитроцеллюлозную мембрану с применением системы для переноса iBlot2 (Thermo Fisher Scientific). Антитело к иммуногену (Sino Biological) используют для выявления иммуногена. Сигнал хемилюминесценции от белковых полос отслеживают с помощью системы для визуализации iBright FL1500 (Invitrogen).

Пример 14. Экспрессия иммуногена, представляющего собой RBD, из кольцевой РНК в клетках млекопитающих

В данном примере продемонстрирована экспрессия иммуногенов, представляющих собой RBD, из кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

В данном примере кольцевые РНК, кодирующие иммуногены, представляющие собой RBD SARS-CoV-2, получали и очищали в соответствии со способами, описанными в данном документе.

Экспрессию кольцевой РНК, кодирующей RBD, проверяли посредством иммунопреципитации в комбинации с вестерн-блоттингом (IP-вестерн). Если вкратце, кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой RBD (0,1 пикомоль), трансфицировали в фибробласты BJ и клетки HeLa (10000 клеток) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015). MessengerMax отдельно использовали в качестве контроля. Надосадочную жидкость собирали через 24 часа и выполняли иммунопреципитацию с использованием кроличьего антитела, специфического к гликопротеину RBD-шиповидный белок SARS-CoV-2 (Sino Biologicals, № по кат.: 40592-T62), в сочетании с Dynabeads, покрытыми белком G (Invitrogen, 10003D), и то же антитело использовали для выявления продуктов иммунопреципитации, разделенных посредством PAGE. Иммунопреципитацию рекомбинантного RBD (42 нг) использовали в качестве контроля и для количественного определения экспрессии белка в клетке. Мембранную хемилюминесценцию количественно определяли с применением программного обеспечения для количественного анализа результатов вестерн-блоттинга Image Studio™ Lite (Li-COR Biosciences).

Иммуноген, представляющий собой RBD, кодируемый кольцевой РНК, выявляли в супернатантах фибробластов BJ и клеток HeLa, но не в контролях (**фиг. 4**).

В данном примере показано, что иммуногены, представляющие собой RBD SAR-CoV-2 (которые представляют собой секретируемые белки), экспрессировались из кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

Пример 15. Иммуногенность иммуногенов, представляющих собой RBD SARS-CoV-2, в мышиной модели

Иммуногенность кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, составленный с катионным полимером (например, протамином), оценивали в мышиной модели. Выработку антител к иммуногену, представляющему собой RBD SARS-CoV-2, составленному с катионным полимером, также оценивали в мышиной модели.

В данном примере конструировали кольцевую РНК с IRES и ORF, кодирующими иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и двумя спейсерными элементами, фланкирующими IRES-ORF. Кольцевые РНК получали следующим образом. Немодифицированную линейную РНК синтезировали посредством транскрипции *in vitro* с избытком гуанозин-5'-монофосфата с применением РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищали с использованием системы для очистки РНК (New England Biolabs, Inc.) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенную линейную РНК подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта.

Образование кольцевой РНК обеспечивали посредством лигирования с помощью шунта следующим образом: Транскрибированную линейную РНК и ДНК-шунт смешивали, отжигали и обрабатывали РНК-лигазой. Для очистки кольцевых РНК смеси для лигирования разделяли посредством обращенно-фазовой хроматографии. Кольцевую РНК селективно элюировали из линейной РНК посредством увеличения содержания органических веществ в подвижной фазе. Элюированную РНК собирали в виде фракций и анализировали в отношении чистоты кольцевой РНК. Выбранные фракции объединяли и подвергали замене буфера с удалением солей подвижной фазы и растворителей. Электрофорез в акриламидном геле использовали в качестве анализа контроля качества для валидации чистоты и циркуляризации.

Очищенную кольцевую РНК разводили в чистой воде до концентрации 1100 нг/мкл. Протамина сульфат растворяли в растворе Рингера с лактатом (4000 нг/мкл). При перемешивании раствор протамина в растворе Рингера с лактатом добавляли к половине раствора кольцевой РНК до тех пор, пока весовое соотношение РНК:протамин не составило 2:1. Раствор перемешивали в течение дополнительных 10 минут для

обеспечения образования стабильных комплексов. Затем добавляли оставшуюся кольцевую РНК (т. е. оставшуюся кольцевую РНК к раствору кольцевая РНК:протамин) и раствор перемешивали в течение непродолжительного периода времени. Конечную концентрацию смеси (т. е. смеси кольцевых РНК) регулировали с применением раствора лактата Рингера с получением препарата на основе кольцевой РНК с конечной концентрацией РНК, составляющей 2 мкг или 10 мкг РНК в 50 мкл.

Трех мышей в каждой группе вакцинировали внутримышечно или внутрикожно препаратом на основе кольцевой РНК в дозе 2 мкг или 10 мкг или контролем, представляющим собой среду-носитель в виде протамина, в день 0 и день 21. Адъювант Addavax™ (Invivogen) вводили однократно каждой мыши внутримышечно или внутрикожно через 24 часа после введения препарата на основе кольцевой РНК в день 0 и день 21. Адъювант Addavax™ добавляли в количестве 50% в 1X PBS в 50 мкл в соответствии с инструкциями производителя.

Отбор крови от каждой мыши осуществляли из подскуловой области. Кровь отбирали в сухие пробирки без антикоагулянта в дни 7, 14, 21, 23, 28, 35, 41, 49, 56, 63, 69, 77, 84, 108 и 115 после введения дозы кольцевой РНК. Сыворотку крови отделяли от цельной крови центрифугированием при 1200g в течение 30 минут при 4°C. Сыворотку крови инактивировали нагреванием при 56°C в течение 1 часа. Отдельные инактивированные нагреванием образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия RBD-специфического IgG посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96-луночные, Nunc) покрывали с помощью RBD SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40592-V08B; 100 нг) в 100 мкл PBS в течение ночи при 4°C. Затем планшеты блокировали в течение 1 часа посредством блокирующего буфера (TBS с 2% FBS и 0,05% Tween 20). Затем разбавления сыворотки крови добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-буферного солевого раствора с детергентом Tween® (TBS-T) планшеты инкубировали с детектирующим антителом к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Jackson 115-035-071), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, после чего добавляли тетраметилбензол (Pierce 34021). В планшете для ELISA обеспечивали протекание реакции в течение 5 мин, а затем гасили посредством 2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (OD) определяли при 450 нм.

Значение оптической плотности для каждого образца сыворотки крови делили на такое значение для фона (планшетов, покрытых RBD, инкубированных только со

вторичным антителом). Кратность изменения показателей для каждого образца по сравнению с фоном наносили на график.

Результаты показывали, что ответы на RBD были получены в дни 14, 21, 23, 28, 35, 41, 49, 56, 63, 69, 77, 84, 108 и 115 после инъекции препаратов на основе кольцевой РНК (**фиг. 5**). После инъекции среды-носителя в виде протамина антитела к RBD не образовывались. Данные результаты показывали, что кольцевая РНК, кодирующая иммуноген, представляющий собой RBD, индуцировала антигенспецифический иммунный ответ у мышей.

Аналогичный ELISA использовали для анализа образцов сыворотки крови в отношении IgG, специфического в отношении шиповидного белка. Планшеты для анализа ELISA (MaxiSorp 442404, 96-лунок, Nunc) покрывали в течение ночи при 4°C шиповидным белком SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40589-V08B1; 100 нг) в 100 мкл PBS. Затем планшеты блокировали в течение 1 часа посредством блокирующего буфера (TBS с 2% FBS и 0,05% Tween 20). Затем разбавления сыворотки крови добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-буферного солевого раствора с детергентом Tween® (TBS-T) планшеты инкубировали с детектирующим антителом к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Jackson 115-035-071), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, после чего добавляли тетраметилбензол (Pierce 34021). В планшете для ELISA обеспечивали протекание реакции в течение 5 мин, а затем гасили посредством 2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (OD) определяли при 450 нм.

Результаты показали, что антитела к шиповидному белку формировались через 35 дней после инъекции препаратов на основе кольцевой РНК (**фиг. 6**). После инъекции среды-носителя антитела к шиповидному белку не образовывались.

Характеристики антител в сыворотке крови в день 14 после введения дозы определяли с применением анализа для измерения относительного уровня изотипа IgG1 по сравнению с изотипом IgG2a (**фиг. 7**), и способность сывороточных антител нейтрализовать вирус определяли с помощью анализа нейтрализации PRNT. Результаты показывали, что RBD кольцевой РНК, вводимая внутримышечно в дозе 2 мкг с адъювантом, обладала нейтрализующей способностью.

Пример 16. Состав на основе кольцевой РНК для введения животному, отличному от человека

Кольцевые РНК, кодирующие иммуноген SARS-CoV-2 или люциферазу Gaussia (GLuc) в качестве модельного иммуногена, сконструировали и очищали в соответствии с методами, описанными в данном документе. После очистки кольцевую РНК или мРНК составляли следующим образом.

A. Кольцевую РНК или мРНК разбавляли в PBS до конечной концентрации, составляющей 2,5 или 25 пикомоль в 50 мкл, с получением препарата на основе кольцевой или линейной РНК (несоставленного).

B. Кольцевую РНК или мРНК составляли с липидным носителем (например, TransIT (Mirus Bio)) и реагентом mRNA Boost Reagent (Mirus Bio) в соответствии с инструкциями производителя (15% TransIT, 5% реагента Boost) с получением конечной концентрации РНК, составляющей 2,5 или 25 пикомоль в 50 мкл, с получением препарата на основе кольцевой или линейной РНК.

C. Кольцевую РНК или мРНК составляли с катионным полимером (например, протамином). Если вкратце, кольцевую РНК разбавляли в чистой воде. Протамина сульфат растворяли в растворе Рингера с лактатом (4000 нг/мкл). При перемешивании раствор протамина в растворе Рингера с лактатом добавляли к половине раствора кольцевой РНК или мРНК до тех пор, пока весовое соотношение РНК:протамин не составило 2:1. Раствор перемешивали в течение дополнительных 10 минут для обеспечения образования стабильных комплексов. Затем добавляли оставшуюся кольцевую РНК или мРНК, и раствор перемешивали в течение непродолжительного периода времени. Конечную концентрацию раствора регулировали с применением раствора лактата Рингера таким образом, чтобы конечная концентрация препарата кольцевой РНК или линейной РНК составляла 2,5 или 25 пикомолей на 50 мкл.

D. Кольцевую РНК или мРНК составляли с липидной наночастицей. Если вкратце, кольцевую РНК или мРНК разбавляли в 25 мМ ацетатного буфера с pH = 4 (профильтрованного через фильтр с размером пор 0,2 мкм) до концентрации 0,2 мкг/мкл. Липидные наночастицы (LNP) составляли посредством предварительного растворения ионизируемого липида (например, ALC0315), холестерина, DSPC и DMG-PEG2000 в этаноле (профильтрованном через стерилизующий фильтр с размером пор 0,2 мкм) при молярном соотношении 50/38,5/10/1,5 мол. %. Конечное весовое соотношение ионизируемый липид/РНК составляло 8/1 вес/вес. Растворы липида и РНК смешивали в чипе-микромиксере с применением микрофлюидной системы при соотношении скоростей

потока буфер/этанол 3/1 и общей скорости потока 1 мл/мин. Затем LNP подвергали диализу в PBS pH = 7,4 в течение 3 ч с удалением этанола. Концентрацию РНК внутри LNP и эффективность инкапсуляции измеряли с применением анализа на основе Ribogreen. При необходимости LNP концентрировали до требуемой концентрации РНК с применением центрифужных фильтров Amicon с отсечкой по 100 кДа. Размер, концентрацию и заряд частиц измеряли с применением Zetasizer Ultra (Malvern Pananaytical). Концентрацию РНК регулировали с помощью PBS с получением конечной концентрации, составляющей 0,1 или 0,2 мкг/мкл. В случае составов, содержащих две последовательности РНК, РНК смешивали либо до составления с LNP, либо после того, как каждую РНК составляли по отдельности. В случае экспериментов in vivo конечные РНК, составленные в LNP, фильтровали через стерилизующие фильтры из восстановленной целлюлозы с размером пор 0,2 мкм.

Пример 17. Модулирование получения люциферазы Gaussia из кольцевой РНК у мышей *in vivo* с применением заданной по времени доставки адъюванта

В данном примере продемонстрирована экспрессия белков или иммуногенов из кольцевой РНК *in vivo* при одновременной доставке адъюванта для стимуляции иммунного ответа.

В данном примере кольцевую РНК, кодирующую GLuc, получали и очищали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Кольцевые РНК составляли так, как это описано в **примере 16**, с получением препаратов на основе кольцевой РНК (например, составленных с Trans-IT, составленных с протамином, составленных с PBS/несоставленных). Мышам посредством инъекции вводили по 50 мкл каждого препарата на основе кольцевой РНК либо путем однократной внутримышечной инъекции в заднюю конечность. . Другой группе мышей внутрикожно вводили препарат на основе кольцевой РНК, составленной с протамином, путем однократной внутрикожной инъекции в спину.

Для стимуляции иммунного ответа адъювант Addavax™ (Invivogen), который представляет собой наноэмульсию типа "масло в воде" на основе сквалена с составом, подобным адъюванту MF59®, вводили в заднюю конечность мыши в момент времени 0 часов (одновременная доставка с препаратом на основе кольцевой РНК) или в 24 часа. Адъювант Addavax™ вводили в количестве 50 мкл в соответствии с инструкциями производителя.

Отбор образцов крови (~25 мкл) от каждой мыши осуществляли из подскуловой области. Кровь отбирали в пробирки с EDTA через 0, 6, 24 и 48 часов после введения дозы кольцевой РНК. Плазму крови отделяли с помощью центрифугирования в течение 30 минут при 1300 g при 4°C, и активность люциферазы Gaussia, секретируемого фермента, тестировали с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). 50 мкл 1x субстрата GLuc добавляли к 5 мкл плазмы крови для осуществления анализа активности люциферазы Gluc. Планшеты считывали на люминометре (Promega) непосредственно после смешивания.

В данном примере продемонстрирована успешная экспрессия белка из кольцевой РНК *in vivo* в течение продолжительных периодов времени с применением: (a) внутримышечной инъекции составленных с TransIT, составленных с протамином и препаратов на основе несоставленной кольцевой РНК без адъюванта (**фиг. 8**), а также доставки адъюванта в моменты времени 0 и 24 ч (**фиг. 9**); и (b) внутрикожной инъекции составленного с протамином препарата на основе кольцевой РНК без адъюванта, а также при доставке адъюванта в момент времени 24 ч (**фиг. 10**).

Пример 18. Определение характеристик препарата на основе кольцевой РНК путем оценки продуктов разрушения нуклеиновых кислот, образующихся в результате воздействия РНКазой H

В данном примере продемонстрировано, что оценка препарата на основе кольцевой РНК в отношении продуктов разрушения нуклеиновых кислот, образующихся в результате воздействия РНКазой H, может обеспечивать выявление линейных и конкатемеризованные продуктов в сравнении с кольцевыми продуктами.

РНК при инкубации с лигазой может не реагировать либо образовывать внутри- или межмолекулярную связь с получением соответственно кольцевой (без свободных концов) или конкатемерной РНК (линейной). Ожидалось, что в результате обработки каждого типа РНК комплементарным ДНК-праймером и РНКазой H, неспецифичной эндонуклеазой, которая распознает дуплексы ДНК/РНК, образуется уникальное количество продуктов разрушения определенных размеров в зависимости от исходного материала РНК.

Можно также продемонстрировать, что лигированная РНК представляет собой кольцевую РНК без примеси конкатемерной РНК или кольцевую РНК с примесью конкатемерной РНК, исходя из количества и размера РНК, образующихся в результате разрушения под воздействием РНКазы H. Если добавляют праймер и РНКазу H к

кольцевой РНК, то один праймер образует дуплекс с кольцевой РНК и РНКаза Н разрушает участок дуплекса ДНК/РНК с образованием одного линейного продукта РНК. Если добавляют праймер и РНКазу Н к конкатемеру, то по меньшей мере два праймера образуют дуплекс с конкатемерной РНК и РНКаза Н разрушает дуплексы ДНК/РНК с образованием трех продуктов; один продукт представляет собой РНК в направлении от 5'-конца до области связывания первого праймера, один продукт представляет собой РНК между областью связывания первого праймера и областью связывания следующего праймера, которая может включать несколько РНК в зависимости от количества лигированных вместе конкатемеров, и конечный продукт представляет собой РНК в направлении от последней области связывания праймера до 3'-конца. Если добавляют праймер и РНКазу Н к линейной РНК, то один праймер образует дуплекс с линейной РНК, что приводит к образованию одного продукта РНК в направлении от 5'-конца до области связывания праймера и другого продукта в направлении от области связывания праймера до 3'-конца. Рисунок слева на **фиг. 11** иллюстрирует данную стратегию.

В данном примере кольцевую РНК получали следующим образом. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции in vitro с помощью РНК-полимеразы Т7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищали с помощью системы для очистки РНК (New England Biolabs, Inc.), обрабатывали РНК-5'-пирофосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, Inc., M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью системы для очистки РНК. Кольцевые РНК конструировали таким образом, что они включали IRES с ORF, кодирующей нанолюциферазу (Nluc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Для тестирования состояния циркуляризации РНК 0,05 пмоль/мкл препарата на основе линейной или кольцевой РНК инкубировали с 0,25 ед/мкл РНКазы Н, эндорибонуклеазы, расщепляющей дуплексы ДНК/РНК, и 0,3 пмоль/мкл олигомера из 10-30 нуклеиновых кислот, комплементарных к Nluc РНК при 37°C в течение 30 мин. После инкубации реакционную смесь подвергали анализу с помощью 6% денатурирующего PAGE. Гель окрашивали SYBR-green и визуализировали с помощью E-gel Imager. Измеряли интенсивность полосы на визуализируемом геле и анализировали с помощью ImageJ.

С правой стороны **фиг. 11** показаны фактические продукты расщепления в данном эксперименте. Что касается количества полос, то на дорожке с линейной РНК, инкубируемой с эндонуклеазой РНКазой Н, как и ожидалось, были получены две полосы, тогда как на дорожке с кольцевой РНК выявляли одну полосу в случае дорожки А, что

указывает на то, что кольцевая РНК в действительности была кольцевой и не конкатемерной. В случае дорожки B и дорожки C полосы от контаминации линейной и конкатемерной РНК были видны после обработки РНКазой H из-за присутствия нескольких меньших полос фрагментов, появляющихся на дорожках РНКазы H.

Пример 19. Линейная РНК в препаратах на основе кольцевой РНК (стандартная кривая)

Данный пример демонстрирует расчет линейной РНК в препарате кольцевой РНК.

В данном примере кольцевую РНК получали следующим образом. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции in vitro с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищали с помощью системы для очистки РНК (New England Biolabs, Inc.), обрабатывали РНК-5'-пирофосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, Inc., M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью системы для очистки РНК. Кольцевые РНК конструировали таким образом, что они включали IRES с ORF, кодирующей нанолюциферазу (Nluc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Шунт лигированной кольцевой РНК получали путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, Inc., M0239).

Для очистки кольцевых РНК смеси для лигирования разделяли в 4% денатурирующем геле для PAGE, и полосы РНК, соответствующие каждой из кольцевых РНК, вырезали. Вырезанные из геля фрагменты РНК измельчали, и РНК элюировали буфером для элюирования геля (0,5 M NaOAc, 1 мМ ЭДТА и 0,1% SDS) в течение часа при 37°C. Собирали супернатант и элюировали РНК еще раз, добавляя к измельченному гелю буфер для элюирования геля, и инкубировали в течение часа. Остатки геля удаляли посредством центрифужных фильтров и осаждали РНК этанолом. Элюированную кольцевую РНК анализировали с использованием 6% денатурирующего геля для PAGE. Гель окрашивали SYBR-green и визуализировали с помощью E-gel Imager.

Количество РНК в геле определяли путем сравнения интенсивности полосы, соответствующей РНК того же размера и известного количества (стандартной РНК). Получали стандартную кривую для определения количества неизвестного образца в геле (**FIG. 12**). Для получения стандартной кривой 1, 0,5, 0,2 и 0,05 пмоль линейного эквивалента кольцевой РНК загружали параллельно с препаратом на основе кольцевой РНК в 6% денатурирующий PAGE. Денатурирующий гель окрашивали с помощью SYBR-

green и визуализировали с помощью E-gel Imager. Затем измеряли интенсивность каждой полосы на геле и анализировали с помощью ImageJ. Стандартную кривую для линейной РНК получали посредством анализа интенсивности полосы РНК, загруженной на каждую из различных дорожек (R^2>0,98 во всех случаях), и количество линейной РНК в препарате на основе кольцевой РНК определяли на основе стандартной кривой для линейной РНК.

Количество линейной РНК в различающихся образцах было следующим для препарата на основе кольцевой РНК A: рассчитывали, что линейная РНК составляла примерно 0,31 моль/моль, или 115,99 нг/395 нг, или 30,2%. Для препарата кольцевой РНК C: рассчитывали, что линейная РНК составляет примерно 0,45 моль/моль, или 260,52 нг/488 нг, или 49,2%.

Пример 20. Линейная РНК в препаратах на основе кольцевой РНК (вырезание из геля и экстракция)

Данный пример демонстрирует очистку и количественное определение кольцевой РНК в препарате.

В данном примере кольцевую РНК получали следующим образом. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции in vitro с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищали с помощью системы для очистки РНК (New England Biolabs, Inc.), обрабатывали РНК-5'-пирофосфогидролазой (New England Biolabs, Inc., M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью системы для очистки РНК. Кольцевые РНК конструировали таким образом, что они включали IRES с ORF, кодирующей нанолюциферазу (Nluc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Шунт лигированной кольцевой РНК получали путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью ДНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, Inc., M0239).

Для очистки кольцевых РНК смеси для лигирования разделяли в 6% денатурирующем геле для PAGE, и полосы РНК, соответствующие каждой из кольцевых РНК, вырезали. Вырезанные из геля фрагменты РНК измельчали и РНК элюировали буфером для элюирования геля (0,5 M NaOAc, 1 мМ ЭДТА и 0,1% SDS) в течение часа при 37°C. Собирали супернатант и еще раз элюировали РНК, добавляя к измельченному гелю буфер для элюирования геля, и инкубировали в течение часа. Остатки геля удаляли с помощью центрифужных фильтров, и РНК осаждали этанолом в присутствии 0,3 M ацетата натрия. Элюированную кольцевую РНК анализировали с использованием 6%

денатурирующего геля для PAGE. Гель окрашивали с помощью SYBR-green и визуализировали с помощью E-gel Imager.(**фиг. 13**). Видимые полосы снова вырезали и измельчали с помощью средства для разрушения геля. Для экстракции РНК к измельченному гелю добавляли буфер для элюирования геля (0,5 М NaOAc, 1 мМ ЭДТА, 0,1% SDS) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Собирали супернатант и элюировали РНК еще раз, добавляя к измельченному гелю буфер для элюирования геля, и инкубировали в течение часа. Остатки геля удаляли с помощью микроцентрифужной колонки X, и экстрагированную РНК осаждали этанолом. Экстрагированную РНК из отдельной полосы измеряли с помощью флуорометра Qubit3.

Экстрагированную РНК из различающихся образцов количественно определили следующим образом: (препарат A) примерно 1446 нг кольцевой РНК и 176 нг линейной РНК (89,1% кольцевой РНК); (препарат B) примерно 934 нг кольцевой РНК и 270 нг линейной РНК (77,5% кольцевой РНК) и (препарат C) примерно 320 нг кольцевой РНК и 396 нг линейной РНК (44,6% кольцевой РНК).

Пример 21. Линейная РНК в препаратах на основе кольцевой РНК

Данный пример демонстрирует получение на 91% (вес./вес.) чистых кольцевых молекул РНК относительно общего количества молекул рибонуклеотидов в препарате и последующее введение доз мышам для обеспечения биологического эффекта.

В данном примере кольцевые РНК содержали IRES, ORF, кодирующую люциферазу Gaussia (GLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

В данном примере кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Линейные полирибонуклеотиды остались в препарате на основе конечного продукта кольцевой РНК. Чистоту кольцевой РНК и процентное содержание оставшейся линейной РНК в препарате на основе конечного продукта количественно определяли для каждой партии, анализируя препараты на основе конечного продукта на гелях 6% TBE-мочевины и анализируя полосы с применением ImageJ. Чистоту оценивали, вычисляя интенсивность кольцевой РНК по сравнению с интенсивностью общей РНК и регистрируя в процентах. В данном случае кольцевая РНК характеризовалась чистотой, составляющей 91% (вес./вес.), по отношению к общей РНК в препарате.

Перед введением добавляли PBS и 10% носитель TransIT для достижения желаемой конечной концентрации кольцевой РНК, составляющей 0,25 пмоль, в конечном объеме, составляющем 100 мкл. Мышам сделали однократную внутривенную инъекцию в хвостовую вену 0,25 пмоль кольцевой РНК, кодирующей ORF люциферазы Gaussia (100 мкл).

Отбор образцов крови (~25 мкл) от каждой мыши осуществляли из подскуловой области. Кровь отбирали в пробирки с EDTA в часы 0, 6 и в дни 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 и 35 после введения доз. Плазму крови выделяли с помощью центрифугирования в течение 30 минут при 1300 g при 4°C, и активность люциферазы Gaussia, секретируемого фермента, тестировали с помощью анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). Вкратце, 50 мкл 1x субстрата GLuc добавляли к 5 мкл плазмы крови для осуществления анализа активности люциферазы GLuc. Планшеты считывали на люминометре (Promega) непосредственно после смешивания.

Активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови через 6 часов, и 1, 2, 3, 7, 14 и 21 день после введения доз кольцевой РНК. Самая высокая экспрессия кольцевой РНК наблюдалась примерно через 2 дня после инъекции, и высокие уровни экспрессии сохранялись в течение продолжительных периодов времени и все еще обнаруживались через 21 день. Во все моменты времени эти уровни активности были выше, чем те, которые наблюдались для отрицательного контроля (только среда-носитель PBS).

Данный пример демонстрирует, что кольцевая РНК с чистотой 91% (вес./вес.) по отношению к общей РНК в препарате была успешно получена, успешно доставлена с помощью внутривенной инъекции и способна экспрессировать белок, обнаруживаемый в крови, в течение продолжительных периодов времени.

Пример 22. Количественное определение кольцевой РНК с однонитевым разрывом в кольцевой РНК, очищенной из геля

Данный пример демонстрирует, что кольцевая РНК, очищенная с помощью экстракции из геля, содержит не более 1,1% (вес./вес.) РНК с однонитевым разрывом относительно общего количества молекул РНК в препарате.

В данном примере РНК содержали IRES, ORF, кодирующую люциферазу Gaussia (GLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

В данном примере кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Это приводит к циркуляризации РНК в месте лигирования с образованием кольцевой РНК. Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной на 4% геле PAGE, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000). В данном примере очищенную кольцевую РНК оценивали как характеризующуюся чистотой 80% (вес./вес.) относительно общего количества в препарате.

В данном примере последовательность линейных РНК оценивали с помощью секвенирования нового поколения. Препарат на основе очищенной кольцевой РНК (чистота 80%) получали для последовательности операций NGS с применением способа подготовки библиотеки, описанного в TruSeq Small RNA Workflow (Illumina, RS-200-0012). Данный способ сохранил идентичность 3'-конца с высокой точностью. Вкратце, адаптеры лигировали с любыми молекулами РНК с доступными 3'- или 5'-концами в растворе. Интактная кольцевая РНК не подвергается такому лигированию, поэтому данный этап выбран только для некольцевой РНК. Затем данные продукты подвергают обратной транскрипции и амплификации с получением библиотек кДНК, которые затем очищают, подвергают контролю качества и мультиплицируют. Затем библиотеки подвергали секвенированию на приборе Illumina Miniseq.

Аналогично описанному выше, продукт линейной РНК, полученный в результате транскрипции *in vitro*, после обработки с помощью RppH обрабатывали для секвенирования.

Результаты секвенирования как продукта линейной РНК IVT, так и некольцевой РНК в препарате кольцевой РНК, очищенной с помощью геля, сравнивали путем обратного картирования ридов в матричную последовательность, используемую для получения кольцевой РНК и оценки количества ридов, которые картируются над местом лигирования.

В данном анализе предполагается, что оставшаяся некольцевая РНК представляет собой смесь РНК с однонитевым разрывом и продукта остаточной линейной РНК из IVT. В данном примере, если предполагается, что некольцевая РНК содержит только РНК с однонитевым разрывом, то ожидается, что процентное содержание фрагментов, которые картируются над местом лигирования, составит 50%. Если предполагается, что некольцевая РНК содержит только продукт остаточной линейной РНК из IVT, то ожидается, что процентное содержание фрагментов, которые картируются над местом лигирования, будет составлять 0%. Применяя данные статистические допущения и контрольные эксперименты, была построена стандартная кривая, которая позволила провести количественное определение РНК с однонитевым разрывом. В результате этого получили расчет, равный 5,4% некольцевой РНК в виде РНК с однонитевым разрывом.

Данный пример демонстрирует, что 5,4% (вес./вес.) фракции некольцевой РНК очищенного препарата кольцевой РНК (эквивалентно 1,1% (вес./вес.) всей РНК) представляла собой РНК с однонитевым разрывом.

Пример 23. Снижение количества линейной РНК, присутствующей в препаратах на основе кольцевой РНК, увеличивало экспрессию кодируемого белка

Данный пример демонстрирует, что снижение линейной РНК, присутствующей в композиции преимущественно на основе кольцевой РНК, увеличивало экспрессию кодируемого белка в клетках.

В данном примере кольцевые РНК содержали IRES, ORF, кодирующую люциферазу Gaussia (GLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Были получены две партии кольцевой РНК. В каждом случае кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали

с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Линейные РНК остались в конечном продукте кольцевой РНК. Чистоту кольцевой РНК и процентное содержание оставшейся линейной РНК в конечном продукте количественно определяли для каждой партии, анализируя конечные продукты на гелях 6% TBE-мочевины и анализируя полосы с применением ImageJ. Чистоту оценивали, вычисляя интенсивность circRNA по сравнению с интенсивностью общей РНК и регистрируя в процентах. В данном случае партии имели чистоту 71% и чистоту 84%.

Для трансфекции клеток применяли 0,2 пмоль каждой партии РНК. РНК комбинировали с препаратами Optimem и Messenger Max в соответствии с рекомендациями производителя. Аналогичным образом готовили контрольный образец, содержащий только среду-носитель, но он не содержал никакой РНК. В момент времени = 0 каждый препарат добавляли к клеткам фибробластов BJ.

Активность люциферазы Gaussia тестировали с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). Образцы объемом 20 мкл клеточного супернатанта добавляли в 96-луночный планшет (Corning 3990). Образцы отбирали через 6, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после трансфекции. Вкратце, в каждую лунку добавляли 1x субстрат целентеразин. Планшеты считывали на люминометре (Promega) сразу после добавления субстрата и перемешивания.

Активность люциферазы Gaussia определяли в клетках в экспериментах с применением кольцевой РНК с чистотой 84% через 6, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после трансфекции (**фиг. 12**) и она была выше, чем экспрессия, обеспечиваемая только контролем со средой-носителем. Экспрессия, полученная с помощью кольцевой РНК с чистотой 84%, была значительно выше, чем экспрессия, полученная с помощью кольцевой РНК с чистотой 71%. Через 24 часа после трансфекции активность GLuc была в 397 раз выше при трансфекции кольцевой РНК с чистотой 84% по сравнению с трансфекцией кольцевой РНК с чистотой 71%. Активность GLuc определяли в клетках в экспериментах с применением кольцевой РНК с чистотой 71% через 6, 24, 48 и 72 часа

после трансфекции (**фиг. 14**) и она была выше, чем экспрессия, обеспечиваемая только контролем со средой-носителем.

Данный пример продемонстрировал, что кольцевая РНК с большей чистотой (со сниженным содержанием линейной РНК) увеличивает и продлевает экспрессию кодируемого белка.

Пример 24. Линейная РНК, присутствующая в препаратах на основе кольцевой РНК, влияла на врожденный иммунный ответ дозозависимым образом в клетках

Данный пример демонстрирует, что линейная РНК, присутствующая в препарате на основе кольцевой РНК, отрицательно влияет на врожденный иммунный ответ дозозависимым образом.

В данном примере кольцевую РНК и линейную РНК получали следующим образом. Немодифицированную линейную РНК синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 из сегмента ДНК. Транскрибированную РНК очищали с помощью системы для очистки РНК (New England Biolabs, Inc.), обрабатывали РНК-5'-пирофосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, Inc., M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью системы для очистки РНК. Кольцевые РНК конструировали таким образом, что они включали IRES с ORF, кодирующей люциферазу *Gaussia* (GLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Шунт лигированной кольцевой РНК получали путем обработки транскрибированной линейной РНК и ДНК-шунта с помощью РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, Inc., M0239).

Для очистки кольцевых РНК смеси для лигирования разделяли в 4% денатурирующем геле для PAGE, и полосы РНК, соответствующие каждой из кольцевых и линейных РНК, вырезали. Линейные РНК очищали с применением того же 4% денатурирующего геля для PAGE. Вырезанные из геля фрагменты РНК (линейной или кольцевой) измельчали, и РНК элюировали буфером для элюирования геля (0,5 M NaOAc, 1 мМ ЭДТА и 0,1% SDS) в течение часа при 37°C. Собирали супернатант и элюировали РНК еще раз, добавляя к измельченному гелю буфер для элюирования геля, и инкубировали в течение часа. Остатки геля удаляли посредством центрифужных фильтров и осаждали РНК этанолом.

Влияние различных уровней эквивалентов линейной РНК в препаратах очищенной в геле кольцевой РНК определяли путем мониторинга уровней кольцевой РНК в клетках

фибробластов BJ. Клетки в 96-луночном планшете подвергали суспензионной (обратной) трансфекции либо препаратом на основе кольцевой РНК, очищенной в геле, либо равным количеством препарата на основе очищенной в геле кольцевой РНК, но с добавлением различных уровней очищенной на геле линейной РНК с применением липидного трансфекционного реагента (ThermoFisher Scientific (LMRNA003). Уровни связанных с иммунитетом генов анализировали с помощью Q-PCR через 6 часов и 1-5 дней после трансфекции. Вкратце, кДНК получали из клеточных лизатов с использованием случайных праймеров с применением набора Power SYBR Green Cells to C_T (ThermoFisher Scientific, кат. № 4402953) и следуя инструкциям производителя. Q-PCR проводили с применением праймеров, специфических в отношении связанных с иммунитетом генов, и рассчитывали относительные уровни РНК с применением метода Пфаффла и ß-актина в качестве гена "домашнего хозяйства".

Кольцевая РНК в клетках, трансфицированных только препаратом на основе очищенной в геле кольцевой РНК, показала ограниченную повышенную экспрессию генов врожденного иммунитета. И наоборот, клетки, трансфицированные комбинированными кольцевыми и линейными РНК, продемонстрировали повышение уровня экспрессии генов врожденного иммунитета дозозависимым образом (**фиг. 15**).

Пример 25. В результате трансляции по типу "катящегося кольца" с синтетической кольцевой РНК в клетках продуцируются дискретные белковые продукты

В данном примере продемонстрировано, что дискретные белковые или иммуногенные продукты образовывались в результате трансляции по типу "катящегося кольца" с синтетической кольцевой РНК, в которой отсутствует терминирующий элемент (стоп-кодон), например, которая имеет сдвигающий элемент вместо терминирующего элемента (стоп-кодона), в клетках. Кроме того, в данном примере показано, что кольцевая РНК со сдвигающим элементом экспрессировала большее количество белкового или иммуногенного продукта, имеющего надлежащую молекулярную массу, по сравнению с ее линейным эквивалентом.

Кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали ген люциферазы (nLUC) со сдвигающим элементом вместо терминирующего элемента (стоп-кодона). Клетки трансфицировали средой-носителем: только трансфицирующим реагентом; линейной nLuc: IRES EMCV, сдвигающий элемент (последовательность 2A), последовательности nLuc, меченые 3xFLAG, и сдвигающий элемент (последовательность 2A); или кольцевой nLuc: IRES EMCV, сдвигающий элемент (последовательность 2A),

последовательности nLuc, меченые 3xFLAG, и сдвигающий элемент (последовательность 2A). На **фиг. 16** показано, что с кольцевой РНК белок, имеющий надлежащую молекулярную массу, продуцировался на более высоких уровнях по сравнению с линейной РНК.

Через 24 ч клетки собирали путем добавления 100 мкл буфера RIPA. После центрифугирования при 1400 × g в течение 5 мин надосадочную жидкость анализировали в 10-20% градиентном полиакриламидном геле с SDS.

После электрофоретического переноса на нитроцеллюлозную мембрану с использованием способа сухого переноса блот инкубировали с антителом к FLAG и антителом к IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой. Блот визуализировали с помощью набора ECL, и интенсивность полос в вестерн-блоте измеряли с помощью ImageJ.

На **фиг. 16** показано, что в клетках выявляли продукт трансляции кольцевой РНК. В частности, с кольцевой РНК без терминирующего элемента (стоп-кодона) дискретный белковый продукт, имеющий надлежащую молекулярную массу, продуцировался на более высоких уровнях, чем с ее эквивалента в форме линейной РНК.

Пример 26. Получение кольцевой РНК с сайтами для регуляторных нуклеиновых кислот

В данном примере продемонстрировано получение кольцевой РНК с сайтом связывания регуляторной РНК *in vitro*.

Отличающиеся типы клеток обладают уникальным механизмом регуляции посредством нуклеиновых кислот для нацеливания на специфические последовательности РНК. Кодирование этих специфических последовательностей в кольцевой РНК может придавать уникальные свойства отличающимся типам клеток. Как показано в следующем примере, кольцевую РНК конструировали таким образом, чтобы она кодировала сайт связывания микроРНК.

В данном примере кольцевая РНК содержала последовательность, кодирующую IRES EMCV WT, сайт связывания микроРНК mir692 и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы в дополнение к промотору РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для

очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с помощью ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной (**фиг. 17**), элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКаз.

На **фиг. 17** показано, что кольцевую РНК получали таким образом, чтобы она содержала сайт связывания miRNA.

Пример 27. Состав на основе РНК для местной доставки

Данный пример демонстрирует состав на основе РНК для местной доставки.

Чтобы определить местные эффекты РНК, РНК составляли для доставки в эпителиальные ткани.

Как описано в настоящем документе РНК составляли со средством, способствующим проникновению в клетку, в соответствии со следующим:

10 нг линейной или кольцевой РНК, содержащей ORF EGF

5 мкл 80% этанола

35 мкл PBS+глюкоза (4,5 г/л)

Пример 28. Местная доставка кольцевой РНК

Данный пример демонстрирует местную доставку РНК.

Чтобы определить эффекты местной доставки, РНК составляли и доставляли в эпителиальные ткани. Как описано в настоящем документе, РНК составляли со средством, способствующим проникновению в клетку, и доставляли местно в ткань уха.

Образцы кольцевой РНК готовили, как в **примере 27** (50 мкл), и наносили на оба уха мыши. Уши протирали салфеткой, пропитанной изопропиловым спиртом, перед нанесением образцов на уши. Образцы высушивали на ушах, кратковременно подвергая уши воздействию нагревательной лампы и вентилятора в стерильном боксе. Мышей снова помещали в клетки в нормальных условиях.

В определенные моменты времени (6 часов, 1 день, 3 дня или 12 дней после нанесения) для каждого образца РНК отбирали ткани уха (посредством одного перфорирования тканей ушей).

Пример 29. Устойчивость РНК после местной доставки

Данный пример демонстрирует присутствие РНК после местной доставки.

Для определения устойчивости РНК образцы тканей анализировали на предмет доставленной РНК. Как описано в настоящем документе, образцы, полученные в результате перфорации тканей ушей, анализировали на предмет устойчивости в различные моменты времени после местного введения РНК.

Образцы, полученные в результате перфорации тканей ушей, из **примера 28** и образцы, полученные в результате перфорации необработанных тканей ушей, собирали в реагенте для стабилизации РНК, и РНК экстрагировали с применением стандартного набора для выделения РНК из ткани (Maxwell RSC simply RNA).

К каждому образцу добавляли смесь 1-тиоглицерина/раствора для гомогенизации в объеме, равном 200 мкл. Рабочий раствор готовили путем добавления 20 мкл 1-тиоглицерина на миллилитр раствора для гомогенизации. Альтернативно, 600 мкл 1-тиоглицерина добавляли во флакон для раствора для гомогенизации объемом 30 миллилитров. Перед применением смесь 1-тиоглицерин/раствор для гомогенизации охлаждали на льду или при температуре 2-10°C.

Образцы ткани гомогенизировали в 200 мкл охлажденной смеси 1-тиоглицерин/раствор для гомогенизации с помощью ручного гомогенизатора и стерильного пестика до тех пор, пока не оставалось видимых фрагментов ткани. Каждый образец гомогенизировали дополнительно 15-30 секунд для полной гомогенизации.

Для проверки присутствия РНК в разные моменты времени образцы проверяли на наличие РНК с помощью q-PCR. q-PCR применяли для количественной оценки присутствия как линейной, так и кольцевой РНК в образцах, полученных в результате перфорации тканей ушей. Для выявления применяли праймеры для линейной и кольцевой РНК, которые амплифицировали с помощью ORF Nluc. Для выявления только кольцевой РНК применяли праймеры, которые амплифицировали место соединения 5'-3', что обеспечивало возможность выявления кольцевых, но не линейных конструкций РНК.

Линейную и кольцевую РНК обнаруживали через 6, 24 и 72 часа после местной доставки. Более высокие уровни кольцевой РНК по сравнению с линейной РНК были обнаружены в тканях ушей мышей через 3 дня после инъекции (**фиг. 18**).

Как показано в данном примере, линейные и кольцевые РНК, введенные местно, обнаруживались *in vivo*.

Пример 30. Экспрессия белка с мРНК после местной доставки

Данный пример описывает присутствие белка после местной доставки.

Чтобы определить, может ли местно доставленная РНК транслироваться, образцы тканей анализируют на предмет экспрессии белка или иммуногена в разные моменты времени с помощью вестерн-блоттинга. Образцы, полученные в результате перфорации тканей ушей, анализируют на предмет экспрессии белка после местной доставки РНК.

Вкратце, образцы, полученные в результате перфорации тканей ушей, собирают и хранят в реагенте для стабилизации РНК (Invitrogen). Ткань гомогенизируют в буфере RIPA с помощью гомогенизатора с микропробирками (Fisher Scientific) и экстрагируют белок. Каждый образец центрифугируют при 14k x g в течение 15 минут.

Надосадочную жидкость удаляют, и осадок растворяют в 2× SDS-буфере для образцов (0,125 М Трис-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 30% глицерин, 5% 2-меркаптоэтанол, 0,01% бромфеноловый синий) при 70°C в течение 15 мин.

В качестве маркера размера применяют коммерчески доступный стандарт (BioRad). После электрофоретического переноса на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) (Millipore) с применением полусухого способа блот визуализировали с помощью хемилюминесцентного набора (Rockland).

Ожидается, что белок GFP визуализируют в образцах, полученных в результате перфорации необработанных тканей ушей, и обнаружат в кольцевой РНК и линейной РНК.

Пример 31. Местное введение РНК приводит к доставке РНК в ткани при включении этанола в раствор РНК

Данный пример демонстрирует доставку РНК в клетки и ткани посредством местного введения *in vivo*, когда в раствор РНК включен этанол.

В данном примере кольцевая РНК была сконструирована с помощью IRES EMCV и ORF, кодирующих нанолюциферазу (NLuc).

Кольцевую РНК получали *in vitro*. Немодифицированную линейную РНК транскрибировали *in vitro* с матрицы ДНК. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Затем

кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000). В данном примере кольцевую РНК также очищали с помощью HPLC.

В данном примере была сконструирована линейная мРНК с ORF, кодирующей нанолюциферазу (NLuc). В данном примере модифицированная линейная мРНК была получена в лаборатории посредством транскрипции *in vitro*. В данном примере линейная РНК была полностью замещена с помощью псевдоуридина и 5-метил-С, кэпирована с помощью CleanCap™ AG, содержала 5'- и 3'-UTR альфа-глобина человека и была полиаденилирована.

Затем РНК разбавляли в смеси PBS/глюкозе (4,5 г/л) и этаноле (10% об./об.) таким образом, чтобы общий объем образца для каждого образца составлял 50 мкл и общее количество РНК для каждого образца составляло 3,5 пмоль. Все реагенты перед смешиванием доводят до комнатной температуры, и смеси готовят непосредственно перед применением.

В момент времени = 0 дозу, равную 50 мкл, каждого образца наносили местно на ухо мыши BALB/c по каплям с применением наконечника для дозатора. В качестве отрицательного контроля применяли необработанную мышь. Образцы высушивали, кратковременно подвергая уши воздействию нагревательной лампы и вентилятора в стерильном боксе. Мышей снова помещали в клетки в нормальных условиях.

Чтобы определить устойчивость РНК в ткани, образцы тканей анализировали на предмет наличия РНК в различные моменты времени после доставки с применением RT-qPCR. Через 6 часов, 1, 3 и 12 дней после введения у каждого животного отбирали образец, полученный в результате перфорации тканей ушей, размером 2 мм и хранили его в растворе RNAlater (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7020). Общую РНК выделяли из образцов, полученных в результате перфорации тканей ушей, с применением экстракции с помощью TRIzol. Водную фазу осаждали изопропанолом и осадок промывали 70% ETOH в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезировали из общей РНК и проводили RT-PCR на матрицах кДНК с применением праймеров, специфических в отношении ORF NLuc. Все образцы анализировали в трех повторностях на Bio-Rad CFX384 Thermal Cycler. Затем уровни РНК оценивали относительно актина и необработанного отрицательного контроля.

Кольцевую РНК и линейную РНК обнаруживали в образцах ткани через 6 часов и через 1, 3 и 12 дней после местного введения и продемонстрировали больший сигнал, чем у контрольного образца только со средой-носителем (**фиг. 19A** и **фиг. 19B**).

Данный пример демонстрирует, что кольцевая РНК и линейная РНК успешно доставляются путем местного введения в ткань при доставке с этанолом и сохраняются в ткани на протяжении длительных периодов времени.

Пример 32. Местное введение кольцевой РНК приводит к доставке РНК в ткань

Данный пример демонстрирует доставку кольцевой РНК в клетки и ткани путем местного введения *in vivo*.

В данном примере кольцевую РНК конструировали с ORF, кодирующей белок или иммуноген. В данном случае кольцевая РНК кодировала белок эритропоэтин (EPO).

Кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. В данном примере Cy5-UTP применяют для получения РНК, меченной Cy5. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 M ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Кольцевую РНК разбавляли в смеси PBS/глюкозе (4,5 г/л) с 5% этанолом таким образом, чтобы общий объем образца для каждого образца составлял 25 мкл, и общее количество РНК для каждого образца составляло 12 пикомолей. Все реагенты перед смешиванием доводили до комнатной температуры, и смеси готовили непосредственно перед применением.

В момент времени = 0 ухо мыши протирали салфеткой, пропитанной изопропиловым спиртом, высушили и дозу, равную 25 мкл, каждого образца наносили местно на ухо мыши BALB/c по каплям с применением наконечника для дозатора. Образцы высушивали, кратковременно подвергая уши воздействию нагревательной

лампы и вентилятора в стерильном боксе. Мышей снова помещали в клетки в нормальных условиях.

Для определения доставки кольцевой РНК в ткани образцы тканей анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии в различные моменты времени после введения. Через 6 часов, 1 день и 3 дня после введения у каждого животного отбирали образец, полученный в результате перфорации тканей ушей, размером 2 мм и хранили в охлажденном льдом PBS. Затем образцы тканей исследовали под флуоресцентным микроскопом EVOS II. Затем изображения были количественно оценены по флуоресценции с применением ImageJ.

Сигнал Cy5 обнаруживали в образцах ткани через 6 часов, 1 и 3 дня после местного введения и показали более сильный сигнал, чем у отрицательного контроля, который не проявлял никакой флуоресценции (**фиг. 20** и **фиг. 21**). Это указывает на то, что кольцевая РНК успешно доставляется в ткань.

Данный пример демонстрирует, что кольцевая РНК успешно доставляется посредством местного введения на кожу и сохраняется в тканях на протяжении длительных периодов времени.

Пример 33. Местное введение немодифицированной РНК в эпителий слизистой оболочки носа приводит к устойчивости РНК в тканях

В данном примере описывается доставка немодифицированной РНК посредством местного введения в эпителий слизистой оболочки носа и достижение поглощения линейной и кольцевой РНК посредством местного введения.

В данном примере в РНК включены IRES, ORF, кодирующая нанолюциферазу (NLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Кольцевую РНК получают in vitro. Обеспечивают транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищают с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывают РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергают циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищают с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA),

осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000). Получают эквиваленты линейной РНК, которые содержат те же ORF NLuc и кодирующие компоненты, описанные выше.

РНК разбавляют до концентрации, составляющей 1 пмоль/мкл. 5 пмоль РНК в цитратном буфере объединяют со стерильным PBS. Общий объем образца, который следует применять для одного нанесения, составляет 20 мкл. Контрольные образцы только со средой-носителем получают аналогичным образом, но без РНК. Все реагенты перед смешиванием доводят до комнатной температуры, и смеси готовят непосредственно перед применением.

В стерильном боксе мышей помещают в висячее положение за уши. В момент времени = 0 дозу, составляющую 20 мкл, каждого образца постепенно высвобождают в ноздри мыши BALB/c (по 10 мкл в каждую ноздрю) с помощью микропипетки. Рот и альтернативная ноздря закрыты во время нанесения, чтобы гарантировать поглощение. Мышей держат в висячем положении до тех пор, пока частота дыхания не вернется к норме. Мышей снова помещают в клетки в нормальных условиях.

Через 6, 24 и 48 часов после введения мышей умерщвляют и у мышей отбирают образцы тканей носа. Каждый образец ткани (~ 2 мг) помещают в 200 мкл охлажденной смеси 1-тиоглицерин/раствор для гомогенизации и гомогенизируют с помощью ручного гомогенизатора и стерильного пестика до тех пор, пока не останется видимых фрагментов ткани. Каждый образец гомогенизируют дополнительно 15-30 секунд для полной гомогенизации.

Чтобы определить устойчивость РНК в ткани, образцы тканей анализируют на наличие РНК в различные моменты времени после доставки с применением qPCR. qPCR применяют для количественной оценки как линейной, так и кольцевой РНК в извлеченной ткани. Применяют праймеры, которые амплифицируют ORF NLuc. Для обнаружения только кольцевой РНК используют праймеры, которые амплифицируют 5'-3'-соединение, что обеспечивало возможность выявления кольцевых, но не линейных конструкций РНК.

Пример 34. Местное введение кольцевой РНК приводит к доставке РНК в ткань, если перед нанесением ткань обрабатывают пропитанной этанолом салфеткой

Данный пример демонстрирует доставку немодифицированной кольцевой РНК в клетки и ткани путем местного введения *in vivo*.

В данном примере кольцевая РНК была сконструирована с использованием IRES и ORF, кодирующих нанолюциферазу *(NLuc)*.

Кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта, характеризующегося длиной от 10 до 40 нуклеотидов, и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Затем РНК разбавляли либо только PBS, либо PBS с 10% (об./об.) этанолом, таким образом, чтобы общий объем образца для каждого образца составлял 35 мкл и общее количество РНК для каждого образца составляло 20 пмоль. В качестве отрицательных контролей получали контроли только со средой-носителем, как описано выше, но без РНК. Все реагенты перед смешиванием доводят до комнатной температуры, и смеси готовят непосредственно перед применением.

В момент времени = 0 ухо мыши протирали салфеткой, пропитанной этанолом, высушили и дозу, равную 35 мкл, каждого образца наносили местно на ухо мыши BALB/c по каплям с применением наконечника для дозатора. Образцы высушивали, кратковременно подвергая уши воздействию нагревательной лампы и вентилятора в стерильном боксе. Мышей снова помещали в клетки в нормальных условиях.

Чтобы определить устойчивость РНК в ткани, образцы тканей анализировали на предмет наличия РНК в различные моменты времени после доставки с применением RT-qPCR. Через 1 и 4 дня после введения у каждого животного отбирали образец, полученный в результате перфорации тканей ушей, размером 2 мм и хранили его в растворе RNAlater (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7020). Общую РНК выделяли из образцов, полученных в результате перфорации тканей ушей, путем резкого охлаждения и гомогенизации ткани в жидком азоте с помощью стеклянной ступки и пестика с последующей экстракцией с помощью TRIzol (ThermoFisher Scientific, кат. № 15596026). Водную фазу осаждали изопропанолом и осадок промывали 70% EtOH в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезировали из общей РНК с применением Superscript IV (Thermo Scientific, кат. № 11766500). RT-PCR проводили на матрицах кДНК

с применением iTaq™ Universal SYBR®Green Supermix (Bio-Rad, номер по каталогу 1725124) и праймеров, специфических в отношении ORF NLuc. Все образцы анализировали в трех повторностях на Bio-Rad CFX384 Thermal Cycler. Затем уровни РНК оценивали относительно гена "домашнего хозяйства" (28s).

Кольцевая РНК была обнаружена в образцах ткани на 1-й и 4-й день для кольцевой РНК только в PBS и на 1-й день для кольцевой РНК в PBS + 10% EtOH после местного введения после протирания кожи салфеткой, пропитанной этанолом, и показали больший сигнал, чем соответствующий контроль только со средой-носителем (**фиг. 22**).

Данный пример демонстрирует, что кольцевая РНК успешно доставляется посредством местного введения, когда перед введением кожу протирают салфеткой, пропитанной этанолом, и сохраняется в тканях на протяжении длительных периодов времени.

Пример 35. Местное введение кольцевой РНК приводит к доставке РНК в ткань, если перед нанесением ткань обрабатывают пропитанной изопропиловым спиртом салфеткой

Данный пример демонстрирует доставку немодифицированной кольцевой РНК в клетки и ткани путем местного введения *in vivo*.

В данном примере кольцевая РНК была сконструирована с использованием IRES и ORF, кодирующих нанолюциферазу (NLuc).

Кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Затем РНК разбавляли только с помощью PBS, таким образом, чтобы общий объем образца для каждого образца составлял 35 мкл и общее количество РНК для каждого

образца составляло 20 пмоль. В качестве отрицательных контролей получали контроли только со средой-носителем, как описано выше, но без РНК. Все реагенты перед смешиванием доводят до комнатной температуры, и смеси готовят непосредственно перед применением.

В момент времени = 0 ухо мыши протирали салфеткой, пропитанной изопропиловым спиртом (CVS, 297584), высушили и дозу, равную 35 мкл, каждого образца наносили местно на ухо мыши BALB/c по каплям с применением наконечника для дозатора. В качестве отрицательного контроля применяли только салфетку, пропитанную изопропиловым спиртом. Образцы высушивали, кратковременно подвергая уши воздействию нагревательной лампы и вентилятора в стерильном боксе. Мышей снова помещали в клетки в нормальных условиях.

Чтобы определить устойчивость РНК в ткани, образцы тканей анализировали на предмет наличия РНК в различные моменты времени после доставки с применением RT-qPCR. Через 1 день и 4 дня после введения у каждого животного отбирали образец, полученный в результате перфорации тканей ушей, размером 2 мм и хранили его в растворе RNAlater (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7020). Общую РНК выделяли из образцов, полученных в результате перфорации тканей ушей, путем резкого охлаждения и гомогенизации ткани в жидком азоте с помощью стеклянной ступки и пестика с последующей экстракцией с помощью TRIzol (ThermoFisher Scientific, кат. № 15596026). Водную фазу осаждали изопропанолом и осадок промывали 70% ETOH в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезировали из общей РНК с применением Superscript IV (Thermo Scientific, кат. № 11766500). RT-PCR проводили на матрицах кДНК с применением iTaq™ Universal SYBR®Green Supermix (Bio-Rad, номер по каталогу 1725124) и праймеров, специфических в отношении ORF NLuc. Все образцы анализировали в трех повторностях на Bio-Rad CFX384 Thermal Cycler. Затем уровни РНК оценивали относительно гена "домашнего хозяйства" (28s).

Кольцевую РНК обнаруживали в образцах ткани через 1 день и 4 дня после местного введения и продемонстрировали больший сигнал, чем у контрольного образца только со средой-носителем (**фиг. 23**).

Данный пример демонстрирует, что замкнутая РНК успешно доставляется путем местного введения в ткань после обработки кожи салфеткой, пропитанной изопропиловым спиртом, и сохраняется в тканях на протяжении длительных периодов времени.

Пример 36. Местное введение кольцевой РНК приводит к экспрессии белка в ткани

Данный пример демонстрирует доставку немодифицированной кольцевой РНК в клетки и ткани путем местного введения *in vivo* и достижение последующей экспрессии белка.

В данном примере кольцевая РНК была сконструирована с использованием IRES и ORF, кодирующих нанолюциферазу (NLuc).

Кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Затем РНК разбавляли с помощью PBS с 10% (об./об.) этанолом, таким образом, чтобы общий объем образца для каждого образца составлял 35 мкл и общее количество РНК для каждого образца составляло 20 пмоль. В качестве отрицательных контролей получали контроли только со средой-носителем, как описано выше, но без РНК. Все реагенты перед смешиванием доводили до комнатной температуры, и смеси готовили непосредственно перед применением.

В момент времени = 0 дозу, равную 35 мкл, каждого образца наносили местно на ухо мыши BALB/c по каплям с применением наконечника для дозатора. Образцы высушивали, кратковременно подвергая уши воздействию нагревательной лампы и вентилятора в стерильном боксе. Мышей снова помещали в клетки в нормальных условиях.

Для определения экспрессии РНК в ткани образцы ткани анализировали на активность NLuc в различные моменты времени после местной доставки. Образцы, полученные в результате перфорации тканей ушей, собирали у мышей через 4 дня после доставки. Каждый образец ткани измельчали на фрагменты и помещали в 50 мкл охлажденного льдом буфера для анализа лизиса NLuc с смесью 1x ингибиторов протеазы

и помещали на лед. Затем образцы инкубировали на орбитальном шейкере в течение 5 минут при 700 об/мин и затем центрифугировали при комнатной температуре для удаления остатков ткани. Затем супернатант объемом 50 мкл переносили в новую пробирку, не взбалтывая осадок ткани. 50 мкл каждого образца переносили в 96-луночный планшет и проводили анализ с помощью системы анализа люциферазы Nano-Glo (Promega, № N1110) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, в каждую лунку добавляли 1 мкл субстрата фуримазина и 49 мкл PBS и перемешивали. Планшеты инкубировали в течение 10 мин после добавления субстрата и перемешивания и затем считывали на люминометре (Promega).

Активность нанолюциферазы обнаруживали в образцах ткани через 4 дня после местного введения кольцевой РНК в PBS с 10% этанолом (об./об.) и наблюдали, что данная активность была выше, чем соответствующий контроль только со средой-носителем (**фиг. 24**).

Данный пример продемонстрировал, что кольцевая РНК успешно доставляется посредством местного введения и способна экспрессировать функциональный белок, обнаруживаемый в тканях в течение продолжительных периодов времени.

Пример 37. Местное введение кольцевой РНК приводит к доставке РНК в ткани, если ткань обрабатывают повидон-йодом перед нанесением

Данный пример описывает доставку немодифицированной кольцевой РНК в клетки и ткани путем местного введения *in vivo*.

В данном примере кольцевую РНК конструируют с использованием IRES и ORF, кодирующих нанолюциферазу (NLuc).

Кольцевую РНК получают *in vitro*. Обеспечивают транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищают с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывают РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, подвергают циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищают с помощью PAGE с мочевиной, элюируют в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA),

осаждают этанолом и ресуспендируют в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Затем РНК разбавляют только с помощью PBS, таким образом, чтобы общий объем образца для каждого образца составил 35 мкл и общее количество РНК для каждого образца составило 20 пмоль. В качестве отрицательных контролей получают контроли только со средой-носителем, как описано выше, но без РНК. Все реагенты перед смешиванием доводят до комнатной температуры, и смеси готовят непосредственно перед применением.

В момент времени = 0 ухо мыши протирают коммерческим повидон-йодом (10%), который представляет собой стерилизующее средство. Избыток повидон-йода удаляют стерильным ватным тампоном и дозу объемом 35 мкл каждого образца по каплям наносят местно на ухо мыши BALB/c с помощью наконечника для дозатора. Образцы высушивают, кратковременно подвергая уши воздействию нагревательной лампы и вентилятора в стерильном боксе. Мышей снова помещают в клетки в нормальных условиях.

Чтобы определить устойчивость РНК в ткани, образцы тканей анализируют на предмет наличия РНК в различные моменты времени после доставки с применением RT-qPCR. Через 1 день и 4 дня после введения у каждого животного отбирают образец, полученный в результате перфорации тканей ушей, размером 2 мм и хранят его в растворе RNAlater (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7020). Общую РНК выделяют из образцов, полученных в результате перфорации тканей ушей, путем резкого охлаждения и гомогенизации ткани в жидком азоте с помощью стеклянной ступки и пестика с последующей экстракцией с помощью TRIzol (ThermoFisher Scientific, кат. № 15596026). Водную фазу осаждают изопропанолом и осадок промывают 70% ETOH в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезируют из общей РНК с применением Superscript IV (Thermo Scientific, кат. № 11766500). RT-PCR проводят на матрицах кДНК с применением iTaq™ Universal SYBR®Green Supermix (Bio-Rad, номер по каталогу 1725124) и праймеров, специфических в отношении ORF NLuc. Все образцы анализируют в трех повторностях на Bio-Rad CFX384 Thermal Cycler. Затем уровни РНК оценивают относительно гена "домашнего хозяйства" (28s).

Пример 38. Местное введение кольцевой РНК приводит к доставке РНК в ткань, если перед нанесением на ткань распыляют спрей перекиси водорода

Данный пример описывает доставку немодифицированной кольцевой РНК в клетки и ткани путем местного введения *in vivo*.

В данном примере кольцевую РНК конструируют с использованием IRES и ORF, кодирующих нанолюциферазу (NLuc).

Кольцевую РНК получают *in vitro*. Обеспечивают транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищают с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывают РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищают с помощью колонки для очистки РНК. Линейную РНК, обработанную с помощью RppH, будут подвергать циркуляризации с применением ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищают с помощью PAGE с мочевиной, элюируют в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждают этанолом и ресуспендируют в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Затем РНК разбавляют только с помощью PBS, таким образом, чтобы общий объем образца для каждого образца составил 35 мкл и общее количество РНК для каждого образца составило 20 пмоль. В качестве отрицательных контролей получают контроли только со средой-носителем, как описано выше, но без РНК. Все реагенты перед смешиванием доводят до комнатной температуры, и смеси готовят непосредственно перед применением.

В момент времени = 0 на ухо мыши распыляют коммерческую перекись водорода (3%), которая является стерилизующим средством, высушивают стерильным ватным тампоном, и дозу 35 мкл каждого образца наносят местно на ухо мыши BALB/c по каплям с помощью наконечника для дозатора. Образцы высушивают, кратковременно подвергая уши воздействию нагревательной лампы и вентилятора в стерильном боксе. Мышей снова помещают в клетки в нормальных условиях.

Чтобы определить устойчивость РНК в ткани, образцы тканей анализируют на предмет наличия РНК в различные моменты времени после доставки с применением RT-qPCR. Через 1 день и 4 дня после введения у каждого животного отбирают образец, полученный в результате перфорации тканей ушей, размером 2 мм и хранят его в растворе

RNAlater (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7020). Общую РНК выделяют из образцов, полученных в результате перфорации тканей ушей, путем резкого охлаждения и гомогенизации ткани в жидком азоте с помощью стеклянной ступки и пестика с последующей экстракцией с помощью TRIzol (ThermoFisher Scientific, кат. № 15596026). Водную фазу осаждают изопропанолом и осадок промывают 70% ETOH в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезируют из общей РНК с применением Superscript IV (Thermo Scientific, кат. № 11766500). RT-PCR проводят на матрицах кДНК с применением iTaq™ Universal SYBR®Green Supermix (Bio-Rad, номер по каталогу 1725124) и праймеров, специфических в отношении ORF NLuc. Все образцы анализируют в трех повторностях на Bio-Rad CFX384 Thermal Cycler. Затем уровни РНК оценивают относительно гена "домашнего хозяйства" (28s).

Пример 39. Выявление секретируемого иммуногена в крови

Отбор образцов крови (~25 мкл) у каждой мыши осуществляют из подскуловой области. Кровь собирают в пробирки с EDTA через 0, 6 часов, 24, 48 часов и 7 дней после введения дозы кольцевой РНК. Плазму крови отделяют посредством центрифугирования в течение 30 минут при 1300 g при 4°C. Экспрессию секретируемого иммуногена оценивают с применением ELISA или вестерн-блоттинга, например, в случае с иммуногеном, представляющим собой RBD – с применением способов, описанных в **примере 14**.

Пример 40. Выявление антител к иммуногену

В данном примере описан способ определения наличия антител к иммуногену.

ELISA применяют, как описано Chen X et al. (*medRxiv*, doi: doi.org/10.1101/2020.04.06.20055475 (2020)). Если вкратце, белком SARS-CoV-2 в 100 мкл PBS на лунку покрывают планшеты для ELISA в течение ночи при 4°C. Затем планшеты для ELISA блокируют в течение 1 часа с помощью блокирующего буфера (5% FBS с 0,05% Tween 20). Затем в каждую лунку добавляют 10-кратно разбавленную плазму крови в 100 мкл блокирующего буфера на 1 час. После промывки с помощью 1X фосфатно-солевого буфера с детергентом Tween® (PBST) связанные антитела инкубируют с детектирующим антителом к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Invitrogen), в течение 30 мин с последующей промывкой с помощью PBST, затем PBS и добавлением тетраметилбензола. В планшете для ELISA обеспечивают протекание реакции в течение 5

мин, а затем гасят посредством 1 М останавливающего буфера на основе HCl. Значение оптической плотности (OD) определяют при 450 нм.

A. Для антител к иммуногену, представляющему собой RBD SARS-CoV-2, используемый белок SARS-CoV-2 представляет собой RBD SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40592-V08B).

B. Для антител к иммуногену, представляющему собой шиповидный белок SARS-CoV-2, используемый белок SARS-CoV-2 представляет собой шиповидный белок SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40591-V08H)

Пример 41. Повышенная экспрессия белка из кольцевой РНК

В данном примере продемонстрирована трансляция синтетической кольцевой РНК в клетках. Кроме того, в данном примере показано, что с кольцевой РНК продуцировалось большее количество продукта экспрессии надлежащей молекулярной массы, чем с ее линейного эквивалента.

Линейные и кольцевые РНК конструировали таким образом, чтобы они содержали ген люциферазы (nLUC) с терминирующим элементом (стоп-кодоном). Клетки трансфицировали средой-носителем: только трансфицирующим реагентом; линейной nLuc: IRES EMCV, сдвигающий элемент (последовательность 2A), последовательности nLuc, меченые 3xFLAG, сдвигающий элемент (последовательность 2A) и терминирующий элемент (стоп-кодон); или кольцевой nLuc: IRES EMCV, сдвигающий элемент (последовательность 2A), последовательности nLuc, меченые 3xFLAG, сдвигающий элемент (последовательность 2A) и терминирующий элемент (стоп-кодон). На **фиг. 25** показано, что с кольцевой РНК белок, имеющий надлежащую молекулярную массу, продуцировался на более высоких уровнях по сравнению с линейной РНК.

Через 24 ч клетки собирали путем добавления 100 мкл буфера RIPA. После центрифугирования при 1400 × g в течение 5 мин надосадочную жидкость анализировали в 10-20% градиентном полиакриламидном геле с SDS.

После электрофоретического переноса на нитроцеллюлозную мембрану с использованием способа сухого переноса блот инкубировали с антителом к FLAG и антителом к IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой. Блот визуализировали с помощью набора ECL, и интенсивность полос в вестерн-блоте измеряли с помощью ImageJ.

На **фиг. 25** показано, что кольцевая РНК транслировалась в клетках с образованием белка. В частности, с кольцевой РНК белок, имеющий надлежащую молекулярную массу,

продуцировался на более высоких уровнях по сравнению с ее эквивалентом в форме линейной РНК.

Пример 42. Повторное введение дозы кольцевой РНК in vivo

В данном примере продемонстрирована способность к управлению экспрессией из кольцевой РНК *in vivo* с применением двух доз кольцевой РНК.

В данном примере кольцевые РНК содержали IRES EMCV, ORF, кодирующую люциферазу Gaussia (GLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК Monarch (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH, New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью системы для очистки РНК Monarch. РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с помощью ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в растворе для хранения РНК (ThermoFisher Scientific, кат. № AM7000).

Мыши получали однократную инъекцию в хвостовую вену дозы 0,25 мкг кольцевой РНК с ORF люциферазы Gaussia или линейной РНК в качестве контроля, которые обе составляли с липидным трансфекционным реагентом (Mirus) в качестве носителя в день 0, при этом вторую дозу вводили в день 56.

Образцы крови (50 мкл) отбирали из хвостовой вены каждой мыши в пробирки с EDTA через 1, 2, 7, 11, 16 и 23 дня после введения дозы. Плазму крови выделяли с помощью центрифугирования в течение 25 мин при 1300 g при 4°C, и активность люциферазы Gaussia, секретируемого фермента, тестировали с помощью анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). 50 мкл 1X субстрата GLuc добавляли к 5 мкл плазмы крови для осуществления анализа активности люциферазы GLuc. Планшеты считывали на люминометре (Promega) сразу после смешивания.

Активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови через 1, 2, 7, 11, 16 и 23 дня после введения первой дозы кольцевой РНК (**фиг. 26**).

В отличие от этого, активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови только через 1 и 2 дня после введения дозы модифицированной линейной РНК (**фиг. 26**).

Активность люциферазы Gaussia снова выявлялась в плазме крови через 2, 3, 8 и 15 дней после введения второй дозы кольцевой РНК (**фиг. 26**).

В отличие от этого, активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови только через 1, 2, 3 дня после введения дозы модифицированной линейной РНК.

В данном примере продемонстрировано, что из кольцевой РНК экспрессировался белок *in vivo* в течение продолжительных периодов времени с уровнями активности белка в плазме крови через несколько дней после инъекции. Кроме того, это демонстрирует, что повторное введение кольцевой РНК приводит к получению сходного профиля экспрессии.

Пример 43. *In vivo* введение в шахматном порядке доз кольцевой РНК

В данном примере продемонстрирована способность к стимулированию более высокого уровня экспрессии белка или иммуногена из кольцевой РНК *in vivo* с использованием непрерывного введения в шахматном порядке доз кольцевой РНК.

В данном примере кольцевые РНК содержали IRES EMCV, ORF, кодирующую люциферазу Gaussia (GLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Кольцевую РНК получали *in vitro*. Обеспечивали транскрипцию немодифицированной линейной РНК *in vitro* с ДНК-матрицы, содержащей все перечисленные выше мотивы, а также промотор РНК-полимеразы T7 для управления транскрипцией. Транскрибированную РНК очищали с помощью набора для очистки РНК (New England Biolabs, T2050), обрабатывали РНК-5'-фосфогидролазой (RppH) (New England Biolabs, M0356), следуя инструкциям производителя, и снова очищали с помощью колонки для очистки РНК. РНК, обработанную с помощью RppH, подвергали циркуляризации с помощью ДНК-шунта длиной от 10 до 40 нуклеотидов и РНК-лигазы 2 T4 (New England Biolabs, M0239). Кольцевую РНК очищали с помощью PAGE с мочевиной, элюировали в буфере (0,5 М ацетата натрия, 0,1% SDS, 1 мМ EDTA), осаждали этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКаз.

Мыши получали инъекцию в хвостовую вену дозы 0,25 пмоль кольцевой РНК с ORF люциферазы Gaussia или линейной РНК в качестве контроля, которые обе составляли с липидным трансфекционным реагентом (Mirus) в качестве носителя в день 0, день 2 и день 5.

Образцы крови (50 мкл) отбирали из хвостовой вены каждой мыши в пробирки с EDTA через 6 часов, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42 дня после введения дозы. Плазму крови

выделяли с помощью центрифугирования в течение 25 мин при 1300 g при 4°C, и активность люциферазы Gaussia, секретируемого фермента, тестировали с помощью анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). 50 мкл 1X субстрата GLuc добавляли к 5 мкл плазмы крови для осуществления анализа активности люциферазы GLuc. Планшеты считывали на люминометре (Promega) сразу после смешивания.

Активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови через 6 часов, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 дней после введения однократной дозы кольцевой РНК (**фиг. 27** и **фиг. 28**). Активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови через 6 часов, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35 дней после введения первой дозы кольцевой РНК при введении 3 доз (**фиг. 27** и **фиг. 28**).

И напротив, активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови только через 6 часов, 1, 2, 3 дня после введения дозы модифицированной линейной РНК, и уровни экспрессии никогда не превышали исходную дозу. Ферментативная активность белка, полученного из линейной РНК, не выявлялась на уровнях, превышающих фоновые в день x или позже, даже несмотря на то, что вводили дополнительную дозу линейной РНК (**фиг. 27** и **фиг. 28**).

В данном примере продемонстрировано, что из кольцевой РНК экспрессировался белок *in vivo* в течение продолжительных периодов времени с повышенными уровнями активности белка в плазме крови после нескольких инъекций. Кроме того, это демонстрирует, что повторное введение кольцевой РНК, а не линейной РНК, приводит к экспрессии.

Пример 44. Доза для доставки в "голом" виде и повторная доза кольцевой РНК для введения посредством внутримышечной инъекции

В данном примере продемонстрирована способность к управлению экспрессией белка или иммуногена из кольцевой РНК *in vivo* с применением двух доз кольцевой РНК, вводимых внутримышечно.

В данном примере кольцевые РНК содержали IRES EMCV, ORF, кодирующую люциферазу Gaussia (GLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Кольцевую РНК и мРНК получали в соответствии со способами, описанными в данном документе.

Для получения несоставленной РНК кольцевую РНК и мРНК затем разбавляли до конечной концентрации 2,5 пикомоль в 100 мкл PBS.

Мыши получали однократную внутримышечную инъекцию в заднюю конечность в дозе 2,5 пикомоль кольцевой РНК с ORF люциферазы Gaussia. Инъекции выполняли в день 0, а вторую дозу вводили в день 49. Отдельно среду-носитель применяли в качестве контроля.

Образцы крови (50 мкл) отбирали посредством подподбородочной пункции в пробирки с EDTA через 1, 2, 7, 11, 16 и 23 дня после введения дозы. Плазму крови выделяли с помощью центрифугирования в течение 25 мин при 1300 g при 4°C, и активность люциферазы Gaussia, секретируемого фермента, тестировали с помощью анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). 50 мкл 1X субстрата GLuc добавляли к 5 мкл плазмы крови для осуществления анализа активности люциферазы GLuc. Планшеты считывали на люминометре (Promega) сразу после смешивания.

Активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови через 1, 2, 7, 11, 16 и 23 дня после введения первой дозы несоставленной кольцевой РНК (**фиг. 29**).

В отличие от этого, активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови только через 1 и 2 дня после введения дозы несоставленной мРНК. (**фиг. 29**).

Активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови через 2, 3, 8, и 15 дней после введения второй дозы несоставленной кольцевой РНК (**фиг. 29**).

В отличие от этого, активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови только через 1, 2, 3 дня после введения дозы несоставленной модифицированной мРНК (**фиг. 29**).

В каждом случае уровень активности люциферазы Gaussia был выше, чем в контроле, представляющем только среду-носитель.

В данном примере продемонстрировано, что из кольцевой РНК, вводимой внутримышечно без носителя, экспрессировался белок *in vivo* в течение продолжительных периодов времени с уровнями активности белка в плазме крови через несколько дней после инъекции. Кроме того, это демонстрирует, что повторное введение кольцевой РНК приводит к получению сходного профиля экспрессии.

Пример 45. Повторное дозы комплекса кольцевой РНК и носителя посредством внутривенной инъекции, повторяемой пять раз, приводит к экспрессии функционального белка

В данном примере продемонстрирована способность к управлению экспрессией из кольцевой РНК *in vivo* с применением пяти доз кольцевой РНК, вводимых внутривенно.

В данном примере кольцевые РНК содержали IRES EMCV, ORF, кодирующую люциферазу Gaussia (GLuc), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Кольцевую РНК и мРНК получали в соответствии со способами, описанными в данном документе.

Кольцевую РНК и мРНК составляли с применением катионного липидного носителя. В данном примере 10% TransIT (Mirus Bio) и 5% Boost связывали в комплексы с РНК в соответствии с инструкциями производителя.

Мыши получали однократную инъекцию в хвостовую вену в дозе 0,25 пикомоль кольцевой РНК, включающей ORF люциферазы Gaussia. Инъекции выполняли в день 0, день 71, день 120, день 196 и день 359. Отдельно среду-носитель применяли в качестве контроля.

Образцы крови (50 мкл) отбирали посредством подподбородочной пункции в пробирки с EDTA через 0,25, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 и 35 дней после введения дозы. Плазму крови выделяли с помощью центрифугирования в течение 25 мин при 1300 g при 4°C, и активность люциферазы Gaussia, секретируемого фермента, тестировали с помощью анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). 50 мкл 1X субстрата GLuc добавляли к 5 мкл плазмы крови для осуществления анализа активности люциферазы GLuc. Планшеты считывали на люминометре (Promega) сразу после смешивания.

При введении кольцевой РНК, составленной с Trans-IT, активность люциферазы Gaussia выявлялась в плазме крови в дни 1, 2, 3, 7, 14, 21 и 28 после введения первой дозы; в дни 1, 2, 3, 7, 14 и 21 после введения второй дозы; в дни 1, 2, 3, 7, 14 и 21 после введения третьей дозы; в дни 1, 2, 3, 7, 14, 21 и 28 после введения четвертой дозы; и в дни 1, 2, 3, 7, 14 и 21 после введения пятой дозы. (**фиг. 30**).

И наоборот, при введении модифицированной мРНК, составленной с Trans-IT, уровень активности люциферазы Gaussia выявлялся в плазме крови в дни 0,25, 1 и 2 после введения первой дозы; в дни 0,25, 1 и 2 после введения второй дозы; в дни 0,25, 1 и 2 после введения третьей дозы; в дни 0,25, 1 и 2 после введения четвертой дозы и в дни 0,25, 1 и 2 после введения пятой дозы. (**фиг. 30**).

В каждом случае уровень активности люциферазы Gaussia и, следовательно, уровень экспрессии были выше для кольцевой РНК, чем для мРНК.

В данном примере демонстрируется, что из кольцевой РНК, вводимой внутривенно, экспрессировался белок *in vivo* в течение продолжительных периодов времени с уровнями активности белка в плазме крови через несколько дней после

инъекции, и ее можно было повторно вводить по меньшей мере 5 раз. Кроме того, это демонстрирует, что длительное повторное введение кольцевой РНК приводит к получению сходного профиля экспрессии.

Пример 46. Экспрессия нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в клетках млекопитающих

В данном примере продемонстрирована экспрессия нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в клетках млекопитающих.

Эксперимент 1

Первую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, содержащую N-концевую сигнальную последовательность Gluc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 32), и вторую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 31; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 30), конструировали и очищали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали вместе с получением смеси. Смесью (1 пикомоль каждой кольцевой РНК) трансфицировали клетки HeLa (100000 клеток на лунку в 24-луночном планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015). В качестве контролей первой кольцевой РНК и второй кольцевой РНК также по отдельности трансфицировали клетки HeLa с применением MessengerMax.

Экспрессию иммуногена, представляющего собой RBD, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Экспрессию иммуногена, представляющего собой шиповидный белок, измеряли через 24 часа посредством проточной цитометрии.

После трансфекции смесью иммуноген, представляющий собой RBD SARS-Co-V-2, был выявлен в надосадочной жидкости клеток HeLa и иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, был выявлен на клеточной поверхности клеток HeLa. После трансфекции первой кольцевой РНК иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, был выявлен, а иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, не был выявлен. После трансфекции второй кольцевой РНК иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, был выявлен, а иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, не был выявлен. Это демонстрирует, что как

иммуноген, представляющий собой RBD SAR-CoV-2, так и иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, экспрессировались в клетках млекопитающего из комбинированной смеси кольцевых РНК.

Эксперимент 2

Первую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, содержащую N-концевую сигнальную последовательность люциферазы Gaussia (GLuc) (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 32), и вторую кольцевую РНК, кодирующую полипептид люциферазы GLuc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 37; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 36), сконструировали и получали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК по отдельности связывали в комплекс с Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015) и затем смешивали с получением смеси. Смесью (0,1 пикомоль каждой из кольцевых РНК) трансфицировали клетки HeLa (20000 клеток на лунку в 96-луночном планшете). В качестве контролей первой кольцевой РНК и второй кольцевой РНК также по отдельности трансфицировали клетки HeLa с применением MessengerMax.

Экспрессию иммуногена, представляющего собой RBD, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Активность GLuc измеряли через 24 часа с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce).

После трансфекции смесью иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и активность GLuc были выявлены в надосадочной жидкости клеток HeLa через 24 ч. После трансфекции первой кольцевой РНК антиген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, был выявлен, однако активность GLuc не была выявлена. После трансфекции второй кольцевой РНК активность GLuc была выявлена, однако иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, не был выявлен. Это демонстрирует, что как иммуноген, представляющий собой RBD SAR-CoV-2, так и иммуноген, представляющий собой GLuc, экспрессировались в клетках млекопитающего из комбинированной смеси кольцевых РНК.

Эксперимент 3

Первую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, содержащую N-концевую сигнальную последовательность Gluc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 32), и вторую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой гемагглютинин (HA) из вируса гриппа A H1N1, A/California/07/2009 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 35; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 34), сконструировали и получали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали вместе с получением смеси. Смесью (1 пикомоль каждой кольцевой РНК) трансфицировали клетки HeLa (100000 клеток на лунку в 24-луночном планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015). В качестве контролей первой кольцевой РНК и второй кольцевой РНК также по отдельности трансфицировали клетки HeLa с применением MessengerMax.

Экспрессию иммуногена, представляющего собой RBD, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Уровень экспрессии иммуногена, представляющего собой HA, измеряли через 24 часа с использованием иммуноблоттинга. Если вкратце, для иммуноблоттинга через 24 часа после трансфекции клетки лизировали и выполняли вестерн-блоттинг для выявлением иммуногена, представляющего собой HA, с использованием моноклонального антитела к HA вируса гриппа A H1N1 (A/California/07/2009) (MA5-29920 (Thermo Fisher)) в качестве первичного антитела и козье антитело к мышиному IgG H+L (HRP) в качестве вторичного антитела (Abcam, ab 97023). Для контроля загрузки использовали альфа-тубулин с антителом мыши к альфа-

тубулину (DM1A) в качестве первичного антитела (Cell Signaling Technology, CST № 3873) и антителом козы к IgG мыши H+L (HRP) в качестве вторичного антитела (Abcam, ab 97023).

После трансфекции смесью был выявлен как иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, так и иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа. После трансфекции первой кольцевой РНК RBD SARS-CoV-2 был выявлен, а иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа, не был выявлен. После трансфекции второй кольцевой РНК иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа, был выявлен, а иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, не был выявлен. Это демонстрирует, что как иммуноген, представляющий собой RBD SAR-CoV-2, так и иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа, экспрессировались в клетках млекопитающего из комбинированной смеси кольцевых РНК.

Эксперимент 4

Первую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 31; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 30), и вторую кольцевую РНК, кодирующую гемагглютинин (HA) из вируса гриппа A H1N1, A/California/07/2009 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 35; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 34), сконструировали и получали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали вместе с получением смеси. Смесью (1 пикомоль каждой из кольцевых РНК) трансфицировали клетки HeLa (100000 клеток на лунку в 24-луночном планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015). В качестве контролей первой кольцевой РНК и второй кольцевой РНК также по отдельности трансфицировали клетки HeLa с применением MessengerMax.

Экспрессию иммуногена, представляющего собой шиповидный белок, измеряли через 24 часа посредством проточной цитометрии. Экспрессию иммуногена, представляющего собой HA, измеряли через 24 часа посредством иммуноблоттинга, как это описано выше в эксперименте 3.

После трансфекции смесью был выявлен как иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, так и иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа. После трансфекции первой кольцевой РНК иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, был выявлен, а иммуноген, представляющий собой HA

вируса гриппа, не был выявлен. После трансфекции второй кольцевой РНК иммуноген, представляющий собой НА вируса гриппа, был выявлен, а иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, не был выявлен. Это демонстрирует, что как иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SAR-CoV-2, так и антиген, представляющий собой НА вируса гриппа, экспрессировались в клетках млекопитающего из комбинированной смеси кольцевых РНК.

В данном примере показано, что несколько иммуногенов экспрессировались в клетках млекопитающего из препаратов на основе кольцевой РНК, содержащих отличающиеся комбинации кольцевых РНК.

Пример 47. Экспрессия нескольких иммуногенов из кольцевой РНК

В данном примере продемонстрирована экспрессия нескольких иммуногенов из кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

Эксперимент 1

В данном примере кольцевую РНК разрабатывали таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая полипептид GLuc, стоп-кодон, спейсер, IRES, ORF, кодирующая иммуноген, представляющий собой RBD SARS-Cov-2, и стоп-кодон. Кольцевую РНК получали и очищали в соответствии со способами, описанными в данном документе. В качестве контролей получали следующие кольцевые РНК, как это описано выше: (i) кольцевая РНК с IRES и ORF, кодирующей иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2; (ii) кольцевая РНК с IRES и ORF, кодирующей полипептид GLuc.

Кольцевыми РНК (0,1 пикомоль) трансфицировали клетки HeLa (10000 клеток на лунку в 96-луночном планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015).

Экспрессию иммуногена, представляющего собой RBD, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Активность GLuc измеряли через 24 часа с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce).

Экспрессия иммуногена, представляющего собой RBD, была выявлена из кольцевых РНК, кодирующих иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и полипептид GLuc (**фиг. 31A**). Активность GLuc была выявлена в случае кольцевых РНК, кодирующих иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и полипептид GLuc

фиг. 31B). Это демонстрирует, что как иммуноген, представляющий собой RBD SAR-CoV-2, так и иммуноген, представляющий собой GLuc, экспрессировались в клетках млекопитающего из кольцевой РНК, кодирующей как иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, так и иммуноген, представляющий собой GLuc.

Эксперимент 2

В данном примере кольцевую РНК конструировали таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, стоп-кодон, спейсер, IRES, ORF, кодирующая иммуноген, представляющий собой RBD коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS), и стоп-кодон. Кольцевую РНК получают и очищают в соответствии со способами, описанными в данном документе.

Кольцевыми РНК в различных концентрациях трансфицируют клетки HeLa (10000 клеток на лунку в 96-луночном планшете) с применением Lipofectamine MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA015).

Экспрессию иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, измеряли через 24 часа с применением ELISA со специфичностью в отношении иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2. Экспрессию иммуногена, представляющего собой RBD MERS, измеряют через 24 часа с применением поддающегося выявлению антитела, специфического в отношении иммуногена, представляющего собой RBD MERS.

Пример 48. Иммуногенность нескольких иммуногенов из кольцевых РНК в мышиной модели

В данном примере описана экспрессия нескольких иммуногенов у субъекта посредством введения нескольких молекул кольцевой РНК.

Эксперимент 1

В мышиной модели оценивали иммуногенность препарата на основе кольцевой РНК, содержащего (a) кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и (b) кольцевую РНК, кодирующую полипептид GLuc в качестве модельного иммуногена, составленные в липидных наночастицах. Выработка антител к иммуногену, представляющему собой RBD SARS-CoV-2, и активность GLuc также оценивали в мышиной модели.

Первую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2,содержащую N-концевую сигнальную последовательность Gluc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 32), и вторую кольцевую РНК, кодирующую полипептид люциферазы GLuc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 37; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 36) конструировали и очищали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали вместе с получением смеси. Затем данную смесь составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 16**, с получением первого препарата на основе кольцевой РНК. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности составляли с липидными наночастицами, как это описано в **примере 16**, а затем смешивали с получением второго препарата на основе кольцевой РНК.

Трех мышей внутримышечно вакцинировали первым препаратом на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг RBD + 10 мкг GLuc) в день 0 и вторым препаратом на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг RBD + 10 мкг GLuc) в день 12. Дополнительных мышей (3 или 4 на группу) также внутримышечно вакцинировали в день 0 и день 12 с введением (i) первой кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; (ii) второй кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; или (iii) PBS.

Отбор крови у каждой мыши осуществляли посредством забора крови из поднижнечелюстной области. Кровь отбирали в сухие пробирки без антикоагулянта через 2 и 17 дней после примирования первым препаратом на основе кольцевой РНК. Сыворотку крови отделяли от цельной крови посредством центрифугирования при 1200 g в течение 30 минут при 4^0C. Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия RBD-специфического IgG посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96-луночные, Nunc) покрывали с помощью RBD SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40592-V08B; 100 нг) в 100 мкл 1X покрывающего буфера (Biolegend, 421701). Затем планшеты блокировали в течение 1 часа с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% BSA и 0,05% Tween 20). Затем разбавления сыворотки крови (1:500, 1:1500, 1:4500 и 1:13500) добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-буферного солевого раствора с детергентом Tween® (TBS-T) планшеты инкубировали с детектирующим антителом к IgG мыши, конъюгированным с HRP

(Abcam, ab97023), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, после чего добавляли тетраметилбензол (Biolegend, 421101). В планшете для ELISA обеспечивали протекание реакции в течение 10-20 минут, а затем гасили посредством 0,2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (OD) определяли при 450 нм.

Значение оптической плотности для каждого образца сыворотки крови делили на такое значение для фона (планшетов, покрытых RBD, инкубированных только со вторичным антителом). Кратность изменения показателей для каждого образца по сравнению с фоном наносили на график.

Активность GLuc тестировали с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific Pierce). 50 мкл 1x субстрата GLuc добавляли к 10 мкл сыворотки крови для осуществления анализа активности люциферазы Gluc. Планшеты считывали на люминометре (Promega) непосредственно после смешивания.

Результаты показывали, что антитела к RBD образовывались через 17 дней после примирования (т. е. через 17 дней после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК) (**фиг. 32A**), и активность GLuc была выявлена через 2 дня после примирования (т. е. через 2 дня после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК) (**фиг. 32B**).

Данные результаты показывают, что препараты на основе кольцевой РНК, содержащие две кольцевые РНК, кодирующие отличающиеся иммуногены, индуцировали иммуноген-специфические иммунные ответы.

Эксперимент 2

В мышиной модели оценивали иммуногенность препарата на основе кольцевой РНК, содержащего (a) кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и (b) кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой гемагглютинин (HA) вируса гриппа, составленные в липидных наночастицах. Выработка антител к иммуногенам, представляющим собой RBD SARS-CoV-2 и HA вируса гриппа, также оценивали в мышиной модели.

Первую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, содержащую N-концевую сигнальную последовательность Gluc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 32), и вторую кольцевую РНК, кодирующую гемагглютинин (HA) из вируса гриппа A H1N1, A/California/07/2009 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 35; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 34), сконструировали и получали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Первую кольцевую РНК и

вторую кольцевую РНК смешивали вместе с получением смеси. Затем данную смесь составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 16**, с получением первого препарата на основе кольцевой РНК. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности составляли с липидными наночастицами, как это описано в **примере 16**, а затем смешивали с получением второго препарата на основе кольцевой РНК.

Трех мышей внутримышечно вакцинировали первым препаратом на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг RBD + 10 мкг HA) в день 0 и вторым препаратом на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг RBD + 10 мкг HA) в день 12. Дополнительных мышей (3 или 4 на группу) также внутримышечно вакцинировали в день 0 и день 12 с введением (i) первой кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; (ii) второй кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; или (iii) PBS.

Отбор крови осуществляли так, как это описано в эксперименте 1. Наличие RBD-специфического IgG определяли посредством ELISA так, как это описано в эксперименте 1.

Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия HA-специфического IgG посредством ELISA. Планшеты для ELISA покрывали в течение ночь при 4°C рекомбинантным белком HA (Sino Biological, 11085-V08B; 100 нг), и планшеты обрабатывали так, как это описано в эксперименте 1. Значение оптической плотности для каждого образца сыворотки крови делили на такое значение для фона (планшетов, покрытых HA, инкубированных только со вторичным антителом). Кратность изменения показателей для каждого образца по сравнению с фоном наносили на график.

Результаты показали, что антитела к RBD и антитела к HA образовывались через 17 дней после примирования (т. е. через 17 дней после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК (**фиг. 33A** и **фиг. 33B**).

Результаты также показали, что препараты на основе кольцевой РНК, содержащие две кольцевые РНК, кодирующие отличающиеся иммуногены, экспрессировались in vivo и индуцировали иммуноген-специфические иммунные ответы.

Эксперимент 3

Иммуногенность препарата на основе кольцевой РНК, содержащего (a) кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, и (b) кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой гемагглютинин

(HA) вируса гриппа, составленные в липидных наночастицах, оценивали в мышиной модели. Выработка антител к иммуногенам, представляющим собой шиповидный белок SARS-CoV-2 и HA вируса гриппа, также оценивали в мышиной модели.

Первую кольцевую РНК, кодирующую иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2, (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 31; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 30), и вторую кольцевую РНК, кодирующую гемагглютинин (HA) из вируса гриппа A H1N1, A/California/07/2009 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 35; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 34), сконструировали и получали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали вместе с получением смеси. Затем данную смесь составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 16**, с получением первого препарата на основе кольцевой РНК. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК также по отдельности составляли с липидными наночастицами, как это описано в **примере 16**, а затем смешивали с получением второго препарата на основе кольцевой РНК.

Трех мышей внутримышечно вакцинировали первым препаратом на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг шиповидного белка + 10 мкг HA) в день 0 и вторым препаратом на основе кольцевой РНК (с получением общей дозы, составляющей 10 мкг шиповидного белка + 10 мкг HA) в день 12. Дополнительных мышей (3 или 4 на группу) также внутримышечно вакцинировали в день 0 и день 12 с введением (i) первой кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; (ii) второй кольцевой РНК в дозе 10 мкг, составленной с липидными наночастицами; или (iii) PBS.

Отбор крови осуществляли так, как это описано в эксперименте 1. Сыворотку крови отделяли от цельной крови центрифугированием при 1200 g в течение 30 минут при 40°C. Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия специфического в отношении RBD (т. е. RBD из шиповидного белка) IgG посредством ELISA, как описано в эксперименте 1.

Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия HA-специфического IgG посредством ELISA. Планшеты для ELISA покрывали в течение ночь при 4°C рекомбинантным белком HA (Sino Biological, 11085-V08B; 100 нг), и планшеты обрабатывали так, как это описано в эксперименте 1. Значение оптической плотности для каждого образца сыворотки крови делили на такое значение для фона (планшетов,

покрытых HA, инкубированных только со вторичным антителом). Кратность изменения показателей для каждого образца по сравнению с фоном наносили на график.

Результаты показывали, что антитела к RBD и антитела к HA образовывались через 17 дней после примирования (т. е. через 17 дней после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК (**фиг. 34A** и **фиг. 34B**).

Результаты также показывали, что препараты на основе кольцевой РНК, содержащие две кольцевые РНК, кодирующие отличающиеся иммуногены, индуцировали иммуноген-специфические иммунные ответы у мышей.

Пример 49. Иммуногенность кольцевой РНК, предусматривающей несколько иммуногенов, в мышиной модели

В данном примере описана иммуногенность кольцевой РНК, предусматривающей несколько иммуногенов. В данном примере также описано выработку антител в мышиной модели к нескольким антигенам, кодируемым одной кольцевой РНК.

Эксперимент 1

В данном примере описана иммуногенность кольцевой РНК, предусматривающей несколько иммуногенов. В данном примере также описано выработку антител в мышиной модели к нескольким антигенам, кодируемым одной кольцевой РНК.

В данном примере кольцевую РНК разрабатывали таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая полипептид GLuc, стоп-кодон, спейсер, IRES, ORF, кодирующая иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, и стоп-кодон, получали и подвергали очистке так, как это описано в **примере 47** Следующие кольцевые РНК также получали, как это описано выше: (i) вторая кольцевая РНК с IRES и ORF, кодирующую полипептид Gluc, и (ii) третья кольцевая РНК с IRES и ORF, кодирующая иммуноген RBD SARS-CoV-2.

Каждую из первой кольцевой РНК и второй кольцевой РНК составляли с липидными наночастицами, как описано в **примере 16**, с получением первого препарата на основе кольцевой РНК и второго препарата на основе кольцевой РНК соответственно. Вторую кольцевую РНК и третью кольцевую РНК также по отдельности составляли с липидными наночастицами и затем смешивали вместе для получения третьего препарата на основе кольцевой РНК.

Три мыши на группу вакцинировали внутримышечно в день 0 и день 28 с введением (i) первого препарата на основе кольцевой РНК (доза 40 мкг на инъекцию), или

(ii) второго препарата на основе кольцевой РНК (доза 10 мкг на инъекцию), или (iii) третьего препарата на основе кольцевой РНК (доза 10 мкг Gluc + 10 мкг RBD на инъекцию).

Отбор крови у каждой мыши осуществляли посредством забора крови из поднижнечелюстной области. Кровь отбирали у каждой мыши в сухие пробирки без антикоагулянта в дни 2, 14, 28, 35, 43, 49, 61, 62 и 63 после примирования с помощью кольцевых РНК. Сыворотку крови отделяли от цельной крови посредством центрифугирования при 1200 g в течение 30 минут при 4°C. Отдельные образцы сыворотки крови анализировали в отношении наличия RBD-специфического IgG посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Планшеты для ELISA (MaxiSorp 442404, 96-луночные, Nunc) в течение ночи при 4°C покрывали с помощью RBD SARS-CoV-2 (Sino Biological, 40592-V08B; 100 нг) в 100 мкл 1X покрывающего буфера (Biolegend, 421701). Затем планшеты блокировали в течение 1 часа с помощью блокирующего буфера (TBS с 2% BSA и 0,05% Tween 20). Сыворотку серийно разбавляли (4-кратно, 8 раз: от 1:500 до 1: 8192000) и затем добавляли в каждую лунку в 100 мкл блокирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После трехкратной промывки с помощью 1X Tris-буферного солевого раствора с детергентом Tween® (TBS-T) планшеты инкубировали с детектирующим антителом к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Abcam, ab97023), в течение 1 часа с последующими тремя промывками с помощью TBS-T, затем добавляли субстрат TMB ELISA (Pierce, 34021). В планшете для ELISA обеспечивали протекание реакции в течение 10-20 минут, а затем останавливали посредством 2 н. серной кислоты. Значение оптической плотности (OD) определяли при 450 нм. Титр сыворотки крови определяли как величину, обратную самому высокому разведению сыворотки крови, которое дает значение O.D., которое в 5-кратно выше фонового уровня.

Активность Gluc тестировали с применением анализа активности люциферазы Gaussia (Thermo Scientific, 16159). 50 мкл 1x субстрата Gluc добавляли к 10 мкл сыворотки крови для осуществления анализа активности люциферазы Gluc. Планшеты считывали на люминометре (Promega) непосредственно после смешивания.

Результаты показали, что активность Gluc была обнаружена через 2 дня после примирования (т. е. через 2 дня после инъекции первого, второго или третьего препарата на основе кольцевой РНК) (**фиг. 36**), и что антитела к RBD образовывались через 14 дней после примирования (т. е. через 14 дней после инъекции первого, второго или третьего препарата на основе кольцевой РНК) (**фиг. 37A**). Антитела к RBD также образовывались

через 28, 35, 43, 49, 61, 62 и 63 дня после примирования кольцевой РНК (данные не показаны).

Сывороточные антитела в день 63 после введения доз характеризовали с помощью анализа для измерения относительных изотипов IgG1 по сравнению с IgG2a, и способность сывороточных антител нейтрализовать вирус характеризовали с помощью анализа реакции нейтрализации бляшкообразования. Результаты показали, что нейтрализующие антитела были получены у мышей, которым вводили первый препарат на основе кольцевой РНК и третий препарат на основе кольцевой РНК (**фиг. 37B**).

Эти результаты показывают, что отельная кольцевая РНК, кодирующая два иммуногена, может примировать иммуноген-специфический иммунный ответ. Кроме того, результаты показывают, что кольцевые РНК, содержащие ORF, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, обладали нейтрализующей способностью.

Эксперимент 2

В мышиной модели оценивают иммуногенность препарата на основе кольцевой РНК, содержащего кольцевую РНК, сконструированную таким образом, чтобы она содержала IRES, за которым следует ORF, кодирующая иммуноген, представляющий собой RBD SARS-CoV-2, стоп-кодон, спейсер, IRES, ORF, кодирующая иммуноген, представляющий собой RBD MERS, и стоп-кодон, составленную в липидных наночастицах. Выработка антител к иммуногенам, представляющим собой RBD SARS-CoV-2 и RBD MERS, также оценивали в мышиной модели.

Затем данную кольцевую РНК составляют с липидными наночастицами, как это описано в **примере 16**, с получением препарата на основе кольцевой РНК.

Мышей вакцинируют внутримышечно или внутрикожно препаратом на основе кольцевой РНК в количестве 5 мкг, 10 мкг, 20 мкг или 50 мкг в день 0 и снова через по меньшей мере один день после начального введения.

Отбор крови осуществляют так, как описано в эксперименте 1. Наличие IgG, специфических в отношении RBD SARS-CoV-2 и RBD MERS определяют посредством ELISA так, как это описано в эксперименте 1.

Отдельные образцы сыворотки крови оценивают в отношении наличия связывающих антител к RBD SARS-CoV-2, связывающих антител к RBD MERS, нейтрализующих антител к иммуногену, представляющему собой RBD SARS-CoV-2, нейтрализующих антител к иммуногену, представляющему собой RBD MERS, клеточного

ответа на иммуноген SARS-CoV-2 и клеточного ответа на иммуноген, представляющий собой RBD MERS.

Пример 50. Оценка Т-клеточных ответов

Эксперимент 1

Анализ ELISpot применяют для выявления наличия Т-клеток, специфических в отношении шиповидного белка или RBD SARS-CoV-2, или Т-клеток, специфических в отношении HA вируса гриппа. Данный анализ выполняют на следующих группах мышей из **примера 48**:

1. RBD
2. GLuc
3. HA
4. Шиповидный белок
5. RBD+HA
6. Шиповидный белок + HA
7. PBS

Селезенки мышей отбирают в день 30 после буста (т. е. через 30 дней после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК) и обрабатывают с получением суспензии отдельных клеток. Спленоциты высевают при 0,5 М клеток на лунку в планшеты ELISpot IFN-гамма или IL-4 (ImmunoSpot). Спленоциты либо оставляют без стимуляции, либо стимулируют с помощью пула пептидов SARS CoV-2 и HA (JPT, PM-WCPV-SRB и PM-IFNA_HACal). Планшеты ELISPOT обрабатывают в соответствии с протоколом производителя.

Эксперимент 2

Анализ ELISpot применяли для обнаружения наличия Т-клеток, специфических в отношении RBD SARS-CoV-2. Данный анализ выполняли на группах мышей из **примера 49**.

Селезенки мышей отбирали в день 63 после примирования (т. е. через 63 дня после инъекции первого, второго или третьего препарата на основе кольцевой РНК) и обрабатывали с получением суспензии отдельных клеток. Спленоциты высевали при 0,5 М клеток на лунку на IFN-γ (Mabtech). Спленоциты либо не стимулировали, либо стимулировали пептидным пулом RBD SARS CoV-2 (JPT, PM-WCPV-SRBD). Планшеты ELISPOT обрабатывали в соответствии с протоколом производителя.

Результаты показали, что препарат на основе кольцевой РНК, содержащий одну кольцевую РНК, кодирующую два разных иммуногена, индуцировал иммуноген-специфические Т-клеточные ответы (**фиг. 38**).

Пример 51. **Оценка гуморального ответа у мышей, которым вводили кольцевую РНК, кодирующую несколько иммуногенов**

В данном примере продемонстрирован гуморальный ответ, полученный в результате введения кольцевой РНК, кодирующей экспрессию нескольких иммуногенов.

Реакцию торможения гемагглютинации (HAI) использовали для измерения уровня антител к HA вируса гриппа, которые предотвращают гемагглютинацию в сыворотке крови, полученной от мышей. Мышам вводили препарат на основе кольцевой РНК, каждую из которых конструировали и получали способами, описанными в данном документе, и которые кодируют экспрессию иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, иммуногена, представляющего собой шиповидный белок SARS-CoV-2, иммуногена, представляющего собой HA вируса гриппа, иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, и иммуногена, представляющего собой HA вируса гриппа, иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, и полипептида GLuc или иммуногена, представляющего собой RBD SARS-CoV-2, и иммуногена, представляющего собой шиповидный белок SARS-CoV-2. Отбор крови осуществляли так, как это описано в **примере 47** в эксперименте 1, и его выполняли в день 2 и день 17 после инъекции.

Готовили двукратные серийные разведения образца, отобранного у мышей в день 2 и день 17. Фиксированное количество вируса гриппа с известным титром гемагглютинина (HA) добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета с получением концентрации, эквивалентной 4 единицам гемагглютинина, за исключением контрольных лунок с сывороткой крови, в которые вирус не добавляли. Планшет оставляли при комнатной температуре на 60 минут, после чего добавляли образцы эритроцитов и оставляли для инкубации при 4°C в течение 30 минут. Наивысшее разведение сыворотки крови, которое предотвращало гемагглютинацию, определяли как титр HAI сыворотки крови. Образец, отобранный в день 17, демонстрировал титр HAI в образцах, где вводили препараты на основе кольцевой РНК, кодирующей иммуноген, представляющий собой HA вируса гриппа, при их введении по отдельности или при введении в комбинации с иммуногенами SARS-CoV-2, представляющими собой, например, RBD или шиповидный белок (**фиг. 35**). Титры HAI в день 17 не выявлялись в образцах, где не был введен иммуноген, представляющий собой HA, например в образцах, где был введен отдельно иммуноген,

представляющий собой RBD SARS-CoV-2, или отдельно иммуноген, представляющий собой шиповидный белок SARS-CoV-2.

Пример 52. Экспрессия адъюванта из кольцевой РНК в клетках млекопитающих

В данном примере продемонстрирована экспрессия полипептидного адъюванта из кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

В данном примере кольцевую РНК разрабатывали таким образом, чтобы она содержала IRES, ORF, кодирующую адъювантный IL-12 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 38; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 39), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF. В качестве контроля применяли кольцевую РНК, содержащую IRES, ORF, кодирующую иммуноген RBD SARS-CoV-2, и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF. Кольцевые РНК получали и очищали в соответствии со способами, описанными в данном документе.

Очищенные кольцевые РНК (0,1 и 1 пикомоль) трансфицировали в клетки HeLa (10000 клеток на лунку) с применением Lipofectamine MessengerMax (Invitrogen LMRNA001) в соответствии с инструкциями производителя.

Экспрессию IL-12 оценивали количественно с применением специфической в отношении IL-12 ELISA (ThermoFisher, BMS6004) в супернатанте клеточной культуры. Данные показаны как значения среднего и стандартной ошибки среднего для двух повторов.

Результаты показали, что IL-12, кодируемый кольцевой РНК, экспрессировался клетками HeLa, и не экспрессировался в контроле (**фиг. 39**). Данный пример показывает, что адъювант IL-12 экспрессировался из кольцевой РНК в клетках млекопитающих.

Пример 53. Экспрессия *in vivo* адъюванта из кольцевой РНК в мышиной модели

В данном примере продемонстрирована экспрессия *in vivo* полипептидного адъюванта из кольцевой РНК.

В данном примере в соответствии со способами, описанными в данном документе, были получены и очищены следующие кольцевые РНК: (i) первая кольцевая РНК с IRES и ORF, кодирующая адъювант IL-12 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 38; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 39), и (ii) вторая кольцевая РНК с IRES и ORF, кодирующая иммуноген RBD SARS-CoV-2 с N-концевой сигнальной последовательностью Gluc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 32). Каждую из первой

кольцевой РНК и второй кольцевой РНК по отдельности составляли с липидными наночастицами, как описано в примере 16, и затем смешивали вместе с получением первого препарата на основе кольцевой РНК.

Трех мышей вакцинировали внутримышечно в день 0 первым препаратом на основе кольцевой РНК (доза 10 мкг). В качестве контролей трех мышей в каждой группе вакцинировали внутримышечно с помощью (i) второй кольцевой РНК, составленной с липидными наночастицами (доза 10 мкг) (т. е. второй препарат на основе кольцевой РНК), или (ii) PBS. Отбор крови у каждой мыши осуществляли посредством забора крови из поднижнечелюстной области. Кровь отбирали у каждой мыши в сухие пробирки без антикоагулянта через 2 дня после введения кольцевой РНК или PBS. Сыворотку крови отделяли от цельной крови посредством центрифугирования при 1200 g в течение 30 минут при 4^0C. Отдельные образцы сыворотки крови анализировали на наличие IL-12 с применением анализа цитокинов на гранулах (Biolegend, 749622). Данные показаны как значения среднего и стандартной ошибки среднего трех повторов.

Результаты показали, что экспрессия IL-12 была обнаружена в сыворотке крови через 2 дня после инъекции первого препарата на основе кольцевой РНК, но не была обнаружена после инъекции ни одного из контролей (**фиг. 40A**).

Чтобы определить, является ли экспрессированный IL12 функциональным, выработку IFN-γ (непосредственно после передачи сигнала IL12) в сыворотке крови оценивали количественно через 2 дня после инъекции препаратов на основе кольцевой РНК. Выработка IFN-γ была обнаружена в сыворотке крови с помощью того же анализа цитокинов на гранулах, описанного в данном документе (Biolegend, 749622). Данные показаны как значения среднего и стандартной ошибки среднего для 3 повторов.

Результаты показали увеличение IFN-γ в сыворотке крови, что указывает на то, что кольцевая РНК, экспрессирующая IL12, является функциональной (**фиг. 40B**).

Пример 54. Индукция иммуногенности в мышиной модели путем совместного введения иммуногена и адъюванта, кодируемых множеством кольцевых РНК

В данном примере продемонстрирована иммуногенность, индуцированная введением субъекту множества кольцевых РНК. Одна введенная кольцевая РНК кодирует иммуноген. Другая введенная кольцевая РНК кодирует полипептидный адъювант.

В данном примере в соответствии со способами, описанными в данном документе, были получены и очищены следующие кольцевые РНК: (i) первая кольцевая РНК с IRES и ORF, кодирующая адъювант IL-12 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID

NO: 38; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 39), и (ii) вторая кольцевая РНК с IRES и ORF, кодирующая иммуноген RBD SARS-CoV-2 с N-концевой сигнальной последовательностью Gluc (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 32). Каждую из первой кольцевой РНК и второй кольцевой РНК по отдельности составляли с липидными наночастицами, как описано в примере 16, и затем смешивали вместе с получением первого препарата на основе кольцевой РНК.

Трех мышей вакцинировали внутримышечно в день 0 и в день 14 первым препаратом на основе кольцевой РНК (доза 2,5 мкг на кольцевую РНК на инъекцию). В качестве контролей трех мышей в каждой группе вакцинировали внутримышечно с помощью (i) второй кольцевой РНК, составленной с липидными наночастицами (доза 2,5 мкг на инъекцию) (т. е. второй препарат на основе кольцевой РНК), или (ii) PBS. Мышей подвергали эвтаназии через 22 дня после введения первой дозы, и спленоциты перерабатывали в суспензию отдельных клеток. Спленоциты либо не стимулировали, либо стимулировали пептидным пулом RBD (JPT, PM-WCPV-S-RBD-2) в течение 1 часа. Затем в среду добавляли ингибиторы транспорта белка ((монензин, BD 554724) и брефельдин A, BD 555029) с последующим культивированием еще в течение 5 часов. Клетки окрашивали с применением набора для фиксации и пермеабилизации BD (BD, 554714) в соответствии с протоколом производителя. Применяемые антитела: краситель для определения жизнеспособности клеток (ThermoFisher, L1011), CD8 (ThermoFisher, MA5-16759) и CD44 (Biolegend, 103026). Окрашенные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии.

Данные показывают, что первый препарат на основе кольцевой РНК увеличивал число RBD-специфических CD4 Т-клеток по сравнению с контролем, т. е. вторым препаратом на основе кольцевой РНК (**фиг. 41A**) и что не наблюдалось никаких изменений в RBD-специфических CD8 Т-клетках (**фиг. 41B**). Кроме того, первый препарат на основе кольцевой РНК увеличивал количество выработки IFN-γ как CD4, так и CD8 Т-клетками (**фиг. 41C, 41D**). Это показывает, что кольцевая РНК, экспрессирующая IL12, действует как адъювант, усиливающий клеточный иммунный ответ, вызванный кольцевой РНК, экспрессирующей иммуноген. Данные показаны как значения среднего и стандартной ошибки среднего для 3 повторов. **Фиг. 41A**: звездочки обозначают статистическую значимость, определенную с помощью двустороннего RM ANOVA, защищенного апостериорным тестом Тьюки. **Фиг. 41C, 41D**: звездочки обозначают статистическую значимость, определенную с помощью непарного t-критерия.

Пример 55. Оценка ответов Т-клеток после совместного введения иммуногена и адъюванта, кодируемых множеством кольцевых РНК

В данном эксперименте в соответствии со способами, описанными в данном документе, были получены и очищены следующие кольцевые РНК: (i) первая кольцевая РНК, содержащая IRES, ORF, кодирующую овальбумин (OVA) (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 40; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 41), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF, и (ii) вторую кольцевую РНК, содержащую IRES, ORF, кодирующую адъювантный IL-12 (последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 38; аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 39), и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF. Первую кольцевую РНК и вторую кольцевую РНК смешивали вместе и образовывали комплекс с Lipofectamine MessengerMax (Invitrogen LMRNA001) с получением смеси. В качестве контроля также получали третью кольцевая РНК, содержащую IRES, ORF, кодирующую полипептид Gluc, и два спейсерных элемента, фланкирующих IRES-ORF.

Трансфицировали в клетки EL4 (10000 клеток на лунку; клетки EL4 были получены от ATCC) с применением Lipofectamine MessengerMax в соответствии с инструкциями производителя следующее:

1) смесь первой кольцевой РНК и второй кольцевой РНК в комплексе с Lipofectamine MessengerMax (0,1 пикомоль eRNA OVA + 0,1 пикомоль eRNA IL12);

2) первая кольцевая РНК (0,1 пикомоль, eRNA OVA);

3) вторая кольцевая РНК (0,1 пикомоль, eRNA IL12);

4) третья кольцевая РНК (0,1 пикомоль, eRNA Gluc);

5) только реагент для трансфекции (трансфекция холостым раствором).

Трансфицированные клетки EL4 совместно культивировали с OT-I CD8 T-клетками (OVA-специфические Т-клетки; выделены из мышей OT-I из The Jackson Laboratory) в течение 2 дней. Статус активации Т-клеток контролировали по продукции IFN-γ. Через 2 дня собирали супернатант и определяли IFN-γ с применением анализа цитокинов на гранулах (Biolegend, 741044). Данные показаны как значения среднего и стандартной ошибки среднего для 3 повторов. Звездочки обозначают статистическую значимость, определенную с помощью двустороннего ANOVA, защищенного апостериорным тестом Тьюки.

На фиг. 42 продемонстрировано, что кольцевая РНК, экспрессирующая OVA, в комбинации с кольцевой РНК, экспрессирующей IL12, индуцирует более сильный ответ CD8 Т-клеток по сравнению с контролем (кольцевая РНК, экспрессирующая только OVA). Это демонстрирует, что кольцевая РНК, экспрессирующая IL12, действует как адъювант.

Последовательности, указанные в примерах

SEQ ID NO: 1

acgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggccc
ggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaag
cagttcctctggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctg
cggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaa
atggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacat
gctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataata

SEQ ID NO: 2

atgaaagcgattctggtggtgctgctgtatacctttgcgaccgcgaacgcggataccctgtgcattggctatcatgcgaacaacagcaccga
taccgtggataccgtgctggaaaaaaacgtgaccgtgacccatagcgtgaacctgctggaagataaacataacggcaaactgtgcaaact
gcgcggcgtggcgccgctgcatctgggcaaatgcaacattgcgggctggattctgggcaacccggaatgcgaaagcctgagcaccgcg
agcagctggagctatattgtggaaaccccgagcagcgataacggcacctgctatccgggcgattttattgattatgaagaactgcgcgaaca
gctgagcagcgtgagcagctttgaacgctttgaaatttttccgaaaaccagcagctggccgaaccatgatagcaacaaaggcgtgaccgcg
gcgtgcccgcatgcgggcgcgaaaagcttttataaaaacctgatttggctggtgaaaaaaggcaacagctatccgaaactgagcaaaagct
atattaacgataaaggcaaagaagtgctggtgctgtggggcattcatcatccgagcaccagcgcggatcagcagagcctgtatcagaacg
cggatgcgtatgtgtttgtgggcagcagccgctatagcaaaaaatttaaaccggaaattgcgattcgcccgaaagtgcgcgatcaggaagg
ccgcatgaactattattggaccctggtggaaccgggcgataaaattacctttgaagcgaccggcaacctggtggtgccgcgctatgcgtttg
cgatggaacgcaacgcgggcagcggcattattattagcgataccccggtgcatgattgcaacaccacctgccagaccccgaaaggcgcg
attaacaccagcctgccgtttcagaacattcatccgattaccattggcaaatgcccgaaatatgtgaaaagcaccaaactgcgcctggcgac
cggcctgcgcaacattccgagcattcagagccgcggcctgtttggcgcgattgcgggctttattgaaggcggctggaccggcatggtggat
ggctggtatggctatcatcatcagaacgaacagggcagcggctatgcggcggatctgaaaagcacccagaacgcgattgatgaaattacc
aacaaagtgaacagcgtgattgaaaaaatgaacacccagtttaccgcggtgggcaaagaatttaaccatctggaaaaacgcattgaaaacc
tgaacaaaaaagtggatgatggctttctggatatttggacctataacgcggaactgctggtgctgctggaaaacgaacgcaccctggattatc
atgatagcaacgtgaaaaacctgtatgaaaaagtgcgcagccagctgaaaaacaacgcgaaagaaattggcaacggctgctttgaattttat
cataaatgcgataacacctgcatggaaagcgtgaaaaacggcacctatgattatccgaaatatagcgaagaagcgaaactgaaccgcgaa
gaaattgatggcgtgaaactggaaagcacccgcatttatcagattctggcgatttatagcaccgtggcgagcagcctggtgctggtggtgag
cctgggcgcgattagcttttggatgtgcagcaacggcagcctgcagtgccgcatttgcatt

SEQ ID NO: 3

atgaaagcgaacctgctggtgctgctgtgcgcgctggcggcggcggatgcggataccatttgcattggctatcatgcgaacaacagcacc
gataccgtggataccgtgctggaaaaaaacgtgaccgtgacccatagcgtgaacctgctggaagatagccataacggcaaactgtgccgc

ctgaaaggcattgcgccgctgcagctgggcaaatgcaacattgcgggctggctgctgggcaacccggaatgcgatccgctgctgccggt
gcgcagctggagctatattgtggaaaccccgaacagcgaaaacggcatttgctatccgggcgattttattgattatgaagaactgcgcgaac
agctgagcagcgtgagcagctttgaacgctttgaaatttttccgaaagaaagcagctggccgaaccataacaccaacggcgtgaccgcgg
cgtgcagccatgaaggcaaaagcagcttttatcgcaacctgctgtggctgaccgaaaaagaaggcagctatccgaaactgaaaaacagct
atgtgaacaaaaaaggcaaagaagtgctggtgctgtggggcattcatcatccgccgaacagcaaagaacagcagaacctgtatcagaacg
aaaacgcgtatgtgagcgtggtgaccagcaactataaccgccgctttaccccggaaattgcggaacgcccgaaagtgcgcgatcaggcg
ggccgcatgaactattattggaccctgctgaaaccgggcgataccattatttttgaagcgaacggcaacctgattgcgccgatgtatgcgttt
gcgctgagccgcggctttggcagcggcattattaccagcaacgcgagcatgcatgaatgcaacaccaaatgccagaccccgctgggcgc
gattaacagcagcctgccgtatcagaacattcatccggtgaccattggcgaatgcccgaaatatgtgcgcagcgcgaaactgcgcatggtg
accggcctgcgcaacattccgagcattcagagccgcggcctgtttggcgcgattgcgggctttattgaaggcggctggaccggcatgattg
atggctggtatggctatcatcatcagaacgaacagggcagcggctatgcggcggatcagaaaagcacccagaacgcgattaacggcatta
ccaacaaagtgaacaccgtgattgaaaaaatgaacattcagtttaccgcggtgggcaaagaatttaacaaactggaaaaacgcatggaaaa
cctgaacaaaaaagtggatgatggctttctggatatttggacctataacgcggaactgctggtgctgctggaaaacgaacgcaccctggattt
tcatgatagcaacgtgaaaaacctgtatgaaaaagtgaaaagccagctgaaaaacaacgcgaaagaaattggcaacggctgctttgaatttt
atcataaatgcgataacgaatgcatggaaagcgtgcgcaacggcacctatgattatccgaaatatagcgaagaaagcaaactgaaccgcg
aaaaagtggatggcgtgaaactggaaagcatgggcatttatcagattctggcgatttatagcaccgtggcgagcagcctggtgctgctggtg
agcctgggcgcgattagcttttggatgtgcagcaacggcagcctgcagtgccgcatttgcatt

SEQ ID NO: 4

aaaaaacaaaaaacaaaacggctattaatagccgaaaaacaaaaaacaaaaaaaacaaaaaaaaaaccaaaaaaacaaaacaca

SEQ ID NO: 30

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS
NVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIV
NNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMD
LEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT
LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSET
KCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISN
CVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIA
DYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGST
PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKN
KCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS
VITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEH
VNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPT

NFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDK
NTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQY
GDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIP
FAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQN
AQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA
EIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKN
FTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVN
NTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLN
ESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCC
KFDEDDSEPVLKGVKLHYT

SEQ ID NO: 31

atgtttgtttttcttgttttattgccactagtctctagtcagtgtgttaatcttacaaccagaactcaattacccccctgcatacactaattctttcacacg
tggtgtttattaccctgacaaagttttcagatcctcagttttacattcaactcaggatttgttcttacctttcttttccaatgttacttggttccatgctat
acatgtctctgggaccaatggtactaagaggtttgataaccctgtcctaccatttaatgatggtgtttatttttgcttccactgagaagtctaacata
ataagaggctggatctttggtactactttagattcgaagacccagtccctacttattgttaataacgctactaatgttgttattaaagtctgtgaatttt
caattttgtaatgatccatttttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaaagttggatggaaagtgagttcagagtttattctagtgcgaataatt
gcacttttgaatatgtctctcagccttttcttatggaccttgaaggaaaacagggtaatttcaaaaatcttagggaatttgtgtttaagaatattgat
ggttatttaaaatatattctaagcacacgcctattaatttagtgcgtgatctccctcagggtttttcggctttagaaccattggtagatttgccaata
ggtattaacatcactaggtttcaaactttacttgctttacatagaagttatttgactcctggtgattcttcttcaggttggacagctggtgctgcagc
ttattatgtgggttatcttcaacctaggacttttctattaaaatataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcacttgaccctctct
cagaaacaaagtgtacgttgaaatccttcactgtagaaaaaggaatctatcaaacttctaactttagagtccaaccaacagaatctattgttaga
tttcctaatattacaaacttgtgccctttggtgaagtttttaacgccaccagatttgcatccgtgtatgcttggaacaggaagagaatcagcaact
gtgttgctgattattctgtcctatataattccgcatcattttccacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaaatgatctctgctttactaatg
tctatgcagattcatttgtaattagaggtgatgaagtcagacaaatcgctccagggcaaactggaaagattgctgattataattataaattacca
gatgattttacaggctgcgttatagcttggaattctaacaatcttgattctaaggttggtggtaattataattacctgtatagattgtttaggaagtct
aatctcaaacctttgagagagatatttcaactgaaatctatcaggccggtagcacaccttgtaatggtgttgaaggttttaattgttactttccttt
acaatcatatggtttccaacccactaatggtgttggttaccaaccatacagagtagtagtactttcttttgaacttctacatgcaccagcaactgtt
tgtggacctaaaaagtctactaatttggttaaaaacaaatgtgtcaatttcaacttcaatggtttaacaggcacaggtgttcttactgagtctaaca
aaaagtttctgcctttccaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttgagattcttgacattacac
catgttcttttggtggtgtcagtgttataacaccaggaacaaatacttctaaccaggttgctgttctttatcaggatgttaactgcacagaagtccc
tgttgctattcatgcagatcaacttactcctacttggcgtgtttattctacaggttctaatgtttttcaaacacgtgcaggctgtttaataggggctg
aacatgtcaacaactcatatgagtgtgacatacccattggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagactaattctcctcggcgggcacg
tagtgtagctagtcaatccatcattgcctacactatgtcacttggtgcagaaaattcagttgcttactctaataactctattgccatacccacaaatt

ttactattagtgttaccacagaaattctaccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgtggtgattcaactgaatgcag
caatcttttgttgcaatatggcagtttttgtacacaattaaaccgtgctttaactgggatagctgttgaacaagacaaaaacacccaagaagttttt
gcacaagtcaaacaaatttacaaaacaccaccaattaaagattttggtggttttaatttttcacaaatattaccagatccatcaaaaccaagcaa
gaggtcatttattgaagatctacttttcaacaaagtgacacttgcagatgctggcttcatcaaacaatatggtgattgccttggtgatattgctgct
agggacctcatttgtgcacaaaagtttaacggccttactgttttgccacctttgctcacagatgaaatgattgctcaatacacttctgcactgttag
cgggtacaatcacttctggttggacctttggtgcaggtgctgcattacaaataccatttgctatgcaaatggcttataggtttaatggtattggag
ttacacagaatgttctctatgagaaccaaaaattgattgccaaccaatttaatagtgccattggcaaaattcaagactcactttcttccacagcaa
gtgcacttggaaaacttcaagatgtggtcaaccaaaatgcacaagctttaaacacgcttgttaaacaacttagctccaattttggtgcaatttca
agtgttttaaatgatatcctttcacgtcttgaccctcccgaggctgaagtgcaaattgataggttgatcacaggcagacttcaaagtttgcagac
atatgtgactcaacaattaattagagctgcagaaatcagagcttctgctaatcttgctgctactaaaatgtcagagtgtgtacttggacaatcaaa
aagagttgatttttgtggaaagggctatcatcttatgtccttccctcagtcagcacctcatggtgtagtcttcttgcatgtgacttatgtccctgcac
aagaaaagaacttcacaactgctcctgccatttgtcatgatggaaaagcacactttcctcgtgaaggtgtctttgtttcaaatggcacacactgg
tttgtaacacaaaggaatttttatgaaccacaaatcattactacagacaacacatttgtgtctggtaactgtgatgttgtaataggaattgtcaaca
acacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcattcaaggaggagttagataaatattttaagaatcatacatcaccagatgttgatttagg
tgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgaggttgccaagaatttaaatgaatctctcatcga
tctccaagaacttggaaagtatgagcagtatataaaatggccatggtacatttggctaggttttatagctggcttgattgccatagtaatggtga
caattatgctttgctgtatgaccagttgctgtagttgtctcaagggctgttgttcttgtggatcctgctgcaaatttgatgaagacgactctgagcc
agtgctcaaaggagtcaaattacattacaca

SEQ ID NO: 32

MGVKVLFALICIAVAEAKRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISN
CVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIA
DYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGST
PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKN
KCVNF

SEQ ID NO: 33

atgggagtcaaagttctgtttgccctgatctgcattgctgtggccgaggccaagagagtccaaccaacagaatctattgttagatttcctaatat
tacaaacttgtgccctttggtgaagtttttaacgccaccagatttgcatccgtgtatgcttggaacaggaagagaatcagcaactgtgttgctg
attattctgtcctatataattccgcatcattttccacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaaatgatctctgctttactaatgtctatgcag
attcatttgtaattagaggtgatgaagtcagacaaatcgctccagggcaaactggaaagattgctgattataattataaattaccagatgatttta
caggctgcgttatagcttggaattctaacaatcttgattctaaggttggtggtaattataattacctgtatagattgtttaggaagtctaatctcaaa
ccttttgagagagatatttcaactgaaatctatcaggccggtagcacaccttgtaatggtgttgaaggttttaattgttactttcctttacaatcatat

ggtttccaacccactaatggtgttggttaccaaccatacagagtagtagtactttcttttgaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggaccta
aaaagtctactaatttggttaaaaacaaatgtgtcaatttc

SEQ ID NO: 34

MKAILVVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKL
CKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEEL
REQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPK
LSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKV
RDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTC
QTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGW
TGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN
HLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNN
AKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAI
YSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

SEQ ID NO: 35

ATGAAAGCAATACTAGTAGTTCTTCTATATACATTTGCAACCGCTAACGCTGATACA
TTGTGTATAGGATATCACGCGAACAACTCCACCGATACAGTAGATACAGTACTAGA
GAAGAACGTAACAGTAACACATTCTGTTAATCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGCA
AACTGTGCAAACTAAGAGGTGTAGCCCCATTGCATCTAGGAAAGTGTAATATAGCT
GGCTGGATTTTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCATTAAGTACAGCAAGCTCCTGGTCC
TATATAGTGGAAACACCTAGTAGTGATAACGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTTATA
GATTACGAGGAGCTAAGAGAGCAGCTGTCGTCAGTATCATCATTTGAAAGGTTTGA
AATTTTCCCGAAAACATCCTCCTGGCCCAATCACGATAGTAACAAAGGAGTAACAG
CAGCCTGTCCTCACGCTGGAGCAAAAAGCTTCTATAAAAATTTAATCTGGCTAGTGA
AGAAGGGAAATTCATATCCAAAGCTAAGTAAAAGTTATATAAACGATAAGGGCAAG
GAAGTACTCGTACTGTGGGGCATTCATCATCCATCTACTAGTGCTGATCAACAAAGT
TTATATCAAAACGCAGACGCATACGTTTTTGTGGGGTCAAGTAGATATAGCAAGAA
ATTTAAACCAGAAATAGCAATAAGACCTAAAGTAAGGGATCAAGAAGGCAGAATG
AACTATTATTGGACACTAGTAGAACCGGGAGATAAAATAACTTTTGAAGCAACAGG
AAATCTAGTGGTTCCCAGGTACGCATTTGCAATGGAAAGAAACGCTGGATCAGGCA
TCATTATATCTGATACACCAGTCCACGATTGTAATACAACTTGTCAAACACCTAAAG
GAGCTATAAACACCAGCTTACCATTTCAAAATATTCATCCTATCACAATTGGAAAGT
GTCCAAAATACGTAAAAAGTACAAAATTGAGATTGGCCACAGGATTACGAAATATT

CCATCAATTCAATCTAGAGGACTTTTTGGTGCAATTGCAGGTTTCATAGAAGGAGGC
TGGACTGGGATGGTAGACGGCTGGTACGGTTATCATCATCAAAACGAACAGGGAAG
TGGATACGCAGCTGATCTTAAAAGTACACAAAACGCAATTGACGAGATTACTAATA
AAGTAAATTCTGTAATTGAAAAAATGAATACTCAGTTTACAGCAGTAGGGAAAGAG
TTTAACCACCTGGAAAAAAGAATAGAAAATTTAAATAAAAAAGTAGACGACGGATT
TCTTGACATTTGGACTTATAACGCCGAACTATTGGTATTACTAGAAAACGAAAGAAC
TCTAGATTATCACGATTCAAACGTAAAAAATTTATACGAAAAAGTAAGAAGCCAAC
TTAAAAATAACGCAAAAGAAATAGGAAACGGCTGTTTTGAATTTTATCACAAGTGT
GATAATACCTGCATGGAAAGTGTTAAAAACGGGACATACGATTATCCAAAATACTC
AGAAGAAGCAAAATTAAATAGAGAAGAAATAGACGGCGTAAAATTAGAATCAACA
AGGATATATCAAATATTAGCAATATATTCAACTGTCGCTTCTTCATTGGTACTGGTA
GTTTCTCTAGGTGCAATATCATTTTGGATGTGCTCTAACGGCTCCCTACAGTGTAGA
ATTTGTATA

SEQ ID NO: 36
MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDLDADRGKLPGKKLPLEVLKE
MEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPG
FKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDK
IKGAGGD

SEQ ID NO: 37
ATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGCTGTGGCCGAGGCCAAGCCC
ACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGTGGCCGTGGCCAGCAACTTCGCGACCAC
GGATCTCGATGCTGACCGCGGGAAGTTGCCCGGCAAGAAGCTGCCGCTGGAGGTGC
TCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCGGAAAGCTGGCTGCACCAGGGGCTGTCTGATC
TGCCTGTCCCACATCAAGTGCACGCCCAAGATGAAGAAGTTCATCCCAGGACGCTG
CCACACCTACGAAGGCGACAAAGAGTCCGCACAGGGCGGCATAGGCGAGGCGATC
GTCGACATTCCTGAGATTCCTGGGTTCAAGGACTTGGAGCCCATGGAGCAGTTCATC
GCACAGGTCGATCTGTGTGTGGACTGCACAACTGGCTGCCTCAAAGGGCTTGCCAAC
GTGCAGTGTTCTGACCTGCTCAAGAAGTGGCTGCCGCAACGCTGTGCGACCTTTGCC
AGCAAGATCCAGGGCCAGGTGGACAAGATCAAGGGGGCCGGTGGTGACTAA

SEQ ID NO: 38

atggctccccaaaagctgaccatcagctggttcgccatcgtgctgctcgtgagccccctgatggccatgtgggagctggagaaggacgtgt
acgtggtcgaggtggactggaccccgacgccccccggcgaaacagtgaacctgacctgcgacacccccgaggaagacgatatcacctg
gacaagcgaccagcggcacggcgtgatcggcagcggcaagaccctgaccatcaccgtgaaggagttcctggacgccggccagtacac
ctgccacaagggcggagaaacactgagccacagccacctgctgttgcacaagaaagagaacggcatctggagcaccgagatcctcaag
aatttcaagaacaagaccttcctgaagtgcgaggcccccaactacagcggccggttcacctgcagctggctggtgcagcggaacatggac
ctgaagttcaacatcaagagctccagctctagccccgacagccgggccgtgacctgcggcatggccagcctgagcgccgagaaggtga
ccctggaccagcgggactacgagaagtacagcgtgagctgccaggaggacgtgacctgccctaccgctgaggaaacactgcccatcga
gctggccctggaggcccggcagcaaaacaagtacgagaactacagcaccagcttctttatccgggacatcattaagcccgacccccctaa
gaacctgcagatgaagcccctgaagaacagccaggtggaggtgagctgggagtaccccgacagctggagcacccccccacagctacttc
agcctgaagttcttcgtgcggatccagcggaagaaggagaagatgaaggaaacagaggagggctgcaaccagaagggcgccttcctgg
tggaaaagacaagcacagaggtgcagtgcaagggcggcaacgtgtgcgtgcaggcccaggaccggtactataacagcagctgcagca
agtgggcctgcgtgccctgccgggtgcggagtgtgcctggcgtcggcgtgcccggcgtgggccgggtgatccccgtgagcggccccg
cccggtgcctgagccagagccggaacctgctgaagaccacagacgacatggtgaagaccgcccgggagaagctgaagcactacagct
gcaccgccgaggacatcgaccacgaggacatcacccgggaccagaccagcaccctgaagacctgcctccccctggagctgcacaaga
acgagagctgcctggccacccgggaaacaagctctaccacacggggcagctgcctgcctcctcagaagaccagcctgatgatgaccctg
tgcctgggcagcatctacgaggacctgaagatgtaccagaccgagttccaggccatcaacgccgctctgcagaaccacaaccaccagca
gatcatcctggacaagggcatgctggtggccatcgacgagctgatgcagagcctgaaccacaacggcgaaacactgcggcagaagccc
ccagtgggcgaggccgacccctaccgggtgaagatgaagctgtgcatcctgctgcacgccttcagcacccgggtggtgaccatcaaccg
ggtgatgggctacctgagcagcgcc

SEQ ID NO: 39

MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDI
TWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEIL
KNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEK
VTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPK
NLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFL
VEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSVPGVGVPGVGRVIPVSGP
ARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKN
ESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQI
ILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRV
MGYLSSA

SEQ ID NO: 40

atgggcagcatcggcgccgctagcatggagttctgctttgacgtcttcaaagagctgaaggtgcaccacgccaacgagaacatcttctactg
ccctattgccatcatgagcgccctggccatggtgtacctgggcgccaaggacagcacccggacccagatcaacaaggtggtccggttcga
caagctgcccggcttcggcgacagcatcgaggcccagtgcggcaccagcgtgaacgtgcacagctccctgcgggacatcctgaaccag
atcaccaagcccaacgacgtgtacagcttcagcctggccagccggctgtacgccgaggaacggtaccccatcctgcccgagtacctgca
gtgcgtgaaggagctgtaccggggcggactggagcccatcaacttccagaccgccgccgaccaggcccgggagctgatcaacagctgg
gtggagagccagaccaacggcatcattcggaacgtgctgcagcccagcagcgtggacagccagaccgccatggtgctggtgaacgcca
tcgtgttcaagggcctgtgggagaaggccttcaaggacgaggacacccaggccatgcccttccgggtgaccgagcaggagagcaagcc
cgtgcagatgatgtaccagatcggcctgttccgggtggccagcatggccagcgagaagatgaagatcctggagctgcccttcgccagcg
gcaccatgagcatgctggtgctgctccccgacgaggtgagcggcctggagcagctggagagcatcatcaacttcgagaagctgaccgag
tggaccagctctaacgtgatggaggagcggaagatcaaggtgtacctgccccggatgaagatggaggagaagtacaacctgaccagcgt
gctgatggccatgggcatcaccgacgtgttcagcagcagcgccaacctgagcggcatcagctccgccgagagcctgaagatcagccag
gccgtgcacgccgcacacgccgagatcaacgaggccggccgggaggtggtgggcagcgccgaggccggcgtggacgccgccagcg
tgagcgaggagttccgggccgaccacccccttcctgttctgcatcaagcatattgccaccaacgccgtgctgttctttggccggtgcgtgagc
ccc

SEQ ID NO: 41

MGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVR
FDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQ
CVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIV
FKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASG
TMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSV
LMAMGITDVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSE
EFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSP

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий (a) последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и (b) последовательность, кодирующую адъювант, или последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

2. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 1, где последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, функционально связана с IRES.

3. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 1 или п. 2, где последовательность, кодирующая адъювант, функционально связана с IRES.

4. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 1-3, где адъювант представляет собой полипептид.

5. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где полипептидный иммуноген и полипептид, представляющий собой адъювант, кодируются одной открытой рамкой считывания, функционально связанной с одним IRES, при этом в результате экспрессии открытой рамки считывания вырабатывается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность каждого из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант.

6. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 5, где каждый из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант, отделен полипептидным линкером.

7. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 5, где каждый из полипептидного иммуногена и полипептида, представляющего собой адъювант, отделен доменом расщепления.

8. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 6, где домен расщепления представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A.

9. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 4, где кольцевой полирибонуклеотид содержит множество IRES.

10. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 9, где первый IRES функционально связан с последовательностью, кодирующей полипептидный иммуноген, и второй IRES функционально связан с последовательностью, кодирующей полипептид, представляющий собой адъювант.

11. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 1-10, где экспрессия последовательности, кодирующей полипептидный иммуноген, является по меньшей мере 2-кратно более высокой, чем экспрессия последовательности, кодирующей адъювант.

12. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 11, где экспрессия последовательности, кодирующей полипептидный иммуноген, является по меньшей мере 5-кратно, 10-кратно или 100-кратно более высокой, чем экспрессия последовательности, кодирующей адъювант.

13. Иммуногенная композиция, содержащая множество кольцевых полирибонуклеотидов, где композиция содержит (a) по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген, и (b) по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую адъювант, или последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

14. Иммуногенная композиция по п. 13, где адъювант представляет собой полипептид.

15. Иммуногенная композиция по п. 13 или п. 14, где каждый из полипептидного иммуногена и адъюванта функционально связан с IRES.

16. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по любому из пп. 1-15, где адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции,

рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

17. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где цитокин представляет собой провоспалительный цитокин.

18. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 17, где провоспалительный цитокин выбран из GM-CSF, IL-1-альфа, IL-1-бета, TGF-бета, TNF-альфа и TNF-бета.

19. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-1.

20. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 19, где цитокин, индуцирующий Th-1, выбран из IFN-гамма, IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18.

21. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где цитокин представляет собой цитокин, индуцирующий Th-2.

22. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 21, где цитокин, индуцирующий Th-2, выбран из IFN-гамма, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13.

23. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где хемокин выбран из MCP-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, Rantes и TCA-3.

24. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где костимулирующая молекула выбрана из CD80, CD86, CD40-L, CD70 и CD27.

25. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где стимулятор врожденного иммунитета выбран из STING, TLR3, TLR4, TLR9, TLR7, TLR8, TLR7, RIG-I/DDX58 и MDA-5/IFIH1.

26. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 25, где стимулятор врожденного иммунитета представляет собой конститутивно активный мутант.

27. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где сигнальная молекула выбрана из STING, TRIF, TRAM, MyD88, IPS1, ASC, MAVS, MAPK, IKK-альфа, комплекса IKK, TBK1, B-катенина и каспазы 1.

28. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где активатор транскрипции выбран из AP1, NF-каппа-B, IRF3, IRF7, IRF1 и IRF5.

29. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где рецептор цитокина выбран из IL-2-бета-R, IFN-гамма-R и IL-6R.

30. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 16, где бактериальный компонент выбран из флагеллина и MBL.

31. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по любому из пп. 1-30, где последовательность, кодирующая адъювант, дополнительно кодирует сигнальную последовательность.

32. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по любому из пп. 1-31, где последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, дополнительно кодирует сигнальную последовательность.

33. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по любому из пп. 1-31, где последовательность, кодирующая полипептидный иммуноген, не кодирует сигнальную последовательность.

34. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по п. 1 или п. 13, где последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы, выбрана из GU-богатого мотива, AU-богатого мотива, структурированной области, содержащей dsRNA, или аптамера.

35. Кольцевой полирибонуклеотид, содержащий множество последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген, где по меньшей мере два полипептидных иммуногена характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности.

36. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 35, где кольцевой полирибонуклеотид содержит по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь или по меньшей мере девять последовательностей, при этом каждая последовательность кодирует полипептидный иммуноген.

37. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 35 или п. 36, где каждая из последовательностей, кодирующих каждый из полипептидных иммуногенов, функционально связана с участком внутренней посадки рибосомы (IRES).

38. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 37, где кольцевой полирибонуклеотид содержит один IRES.

39. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 38, где каждый из полипептидных иммуногенов кодируется одной открытой рамкой считывания, функционально связанной с одним IRES, при этом в результате экспрессии открытой рамки считывания вырабатывается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность каждого полипептидного иммуногена.

40. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 39, где каждый из полипептидных иммуногенов отделен полипептидным линкером.

41. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 39, где каждый из полипептидных иммуногенов отделен доменом расщепления.

42. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 41, где домен расщепления представляет собой саморасщепляющийся пептид 2A.

43. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 37, где кольцевой полирибонуклеотид содержит множество IRES.

44. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 43, где каждый IRES функционально связан с открытой рамкой считывания, содержащей последовательность, кодирующую полипептидный иммуноген.

45. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 35-44, где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую адъювант.

46. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 45, где по меньшей мере одна последовательность, кодирующая адъювант, функционально связана с IRES.

47. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 45 или п. 46, где адъювант представляет собой полипептид.

48. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 47, где адъювант представляет собой цитокин, хемокин, костимуляторную молекулу, стимулятор врожденного иммунитета, сигнальную молекулу, активатор транскрипции, рецептор цитокина, бактериальный компонент или компонент врожденной иммунной системы.

49. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 35-48, где кольцевой полирибонуклеотид дополнительно содержит последовательность, которая представляет собой стимулятор врожденной иммунной системы.

50. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 49, где последовательность, которая является стимулятором врожденной иммунной системы, представляет собой GU-богатый мотив, AU-богатый мотив, структурированную область, содержащую dsRNA, или аптамер.

51. Иммуногенная композиция, содержащая (a) по меньшей мере первый кольцевой полирибонуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую первый полипептидный иммуноген, и (b) по меньшей мере второй кольцевой полирибонуклеотид,

содержащий последовательность, кодирующую второй полипептидный иммуноген, где первый и второй полипептидные иммуногены характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности.

52. Иммуногенная композиция по п. 51, где каждый полипептидный иммуноген функционально связан с IRES.

53. Кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенная композиция по любому из пп. 35-52, где каждый из полипептидных иммуногенов характеризуется менее чем 100% идентичностью аминокислотной последовательности.

54. Кольцевой полирибонуклеотид по любому из пп. 35-53, где каждый из полипептидных иммуногенов содержит один или несколько эпитопов, которые идентифицируют мишень.

55. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 54, где мишень представляет собой патоген.

56. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 55, где патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита.

57. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 54, где мишень представляет собой раковую клетку.

58. Кольцевой полирибонуклеотид по п. 55, где мишень представляет собой токсин или аллерген.

59. Фармацевтическая композиция, содержащая кольцевой полирибонуклеотид или иммуногенную композицию по любому из пп. 1-58 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

60. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту кольцевого полирибонуклеотида, или иммуногенной композиции, или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-59.

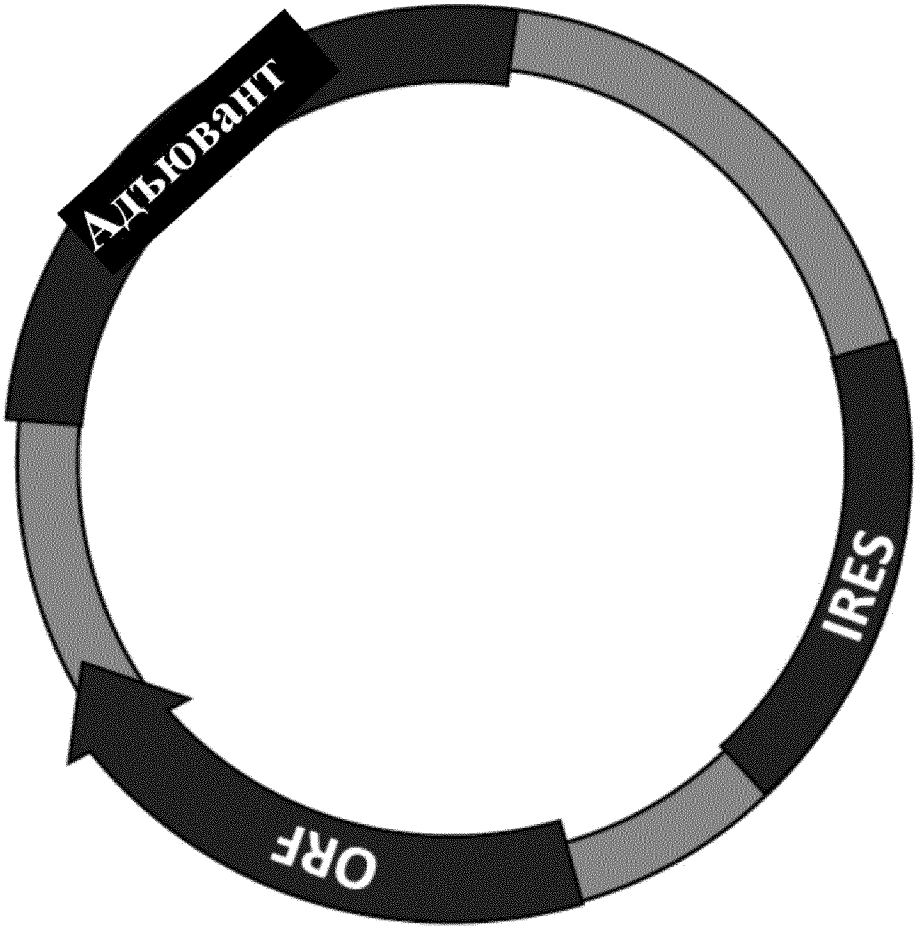
Фиг. 1A

Пример	ORF1	ORF2	Где
A	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 являются мутационными вариантами друг друга.
B	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 получены из отличающихся полипептидов, но идентифицируют одну и ту же мишень.
C	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 получены из отличающихся полипептидов, но идентифицируют отличающиеся мишени.
D	Иммуноген	Адъювант	ORF2 кодирует экспрессию полипептидного адъюванта.
E	Адъювант	Иммуноген	ORF1 кодирует экспрессию полипептидного адъюванта.

Фиг. 1B

Пример	ORF1	ORF2	Где
A	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 являются мутационными вариантами друг друга.
B	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 получены из отличающихся полипептидов, но идентифицируют
C	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 получены из отличающихся полипептидов, но идентифицируют
D	Иммуноген	Адъювант	ORF2 кодирует экспрессию полипептидного адъюванта.
E	Адъювант	Иммуноген	ORF1 кодирует экспрессию полипептидного адъюванта.

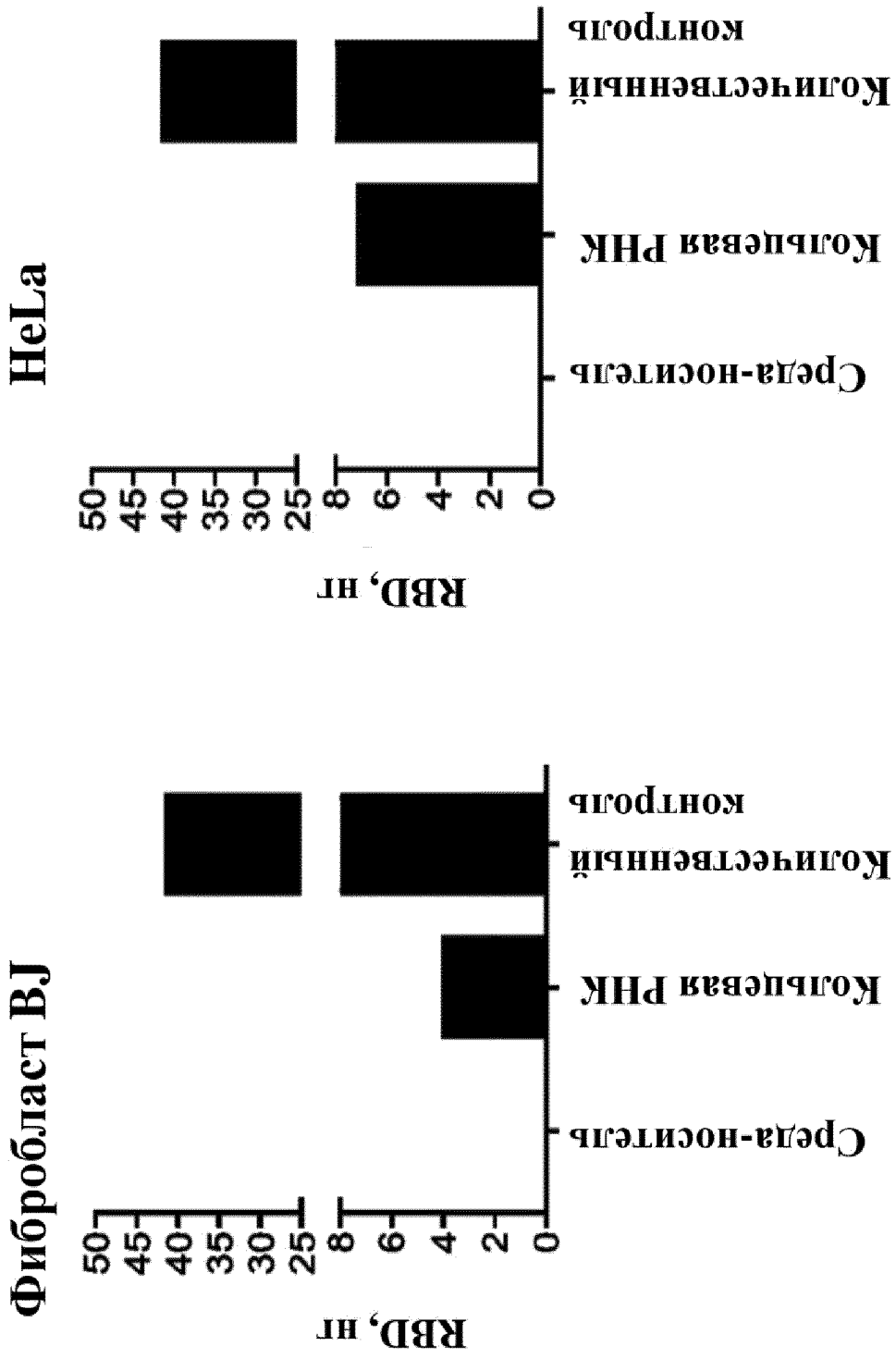
Фиг. 2



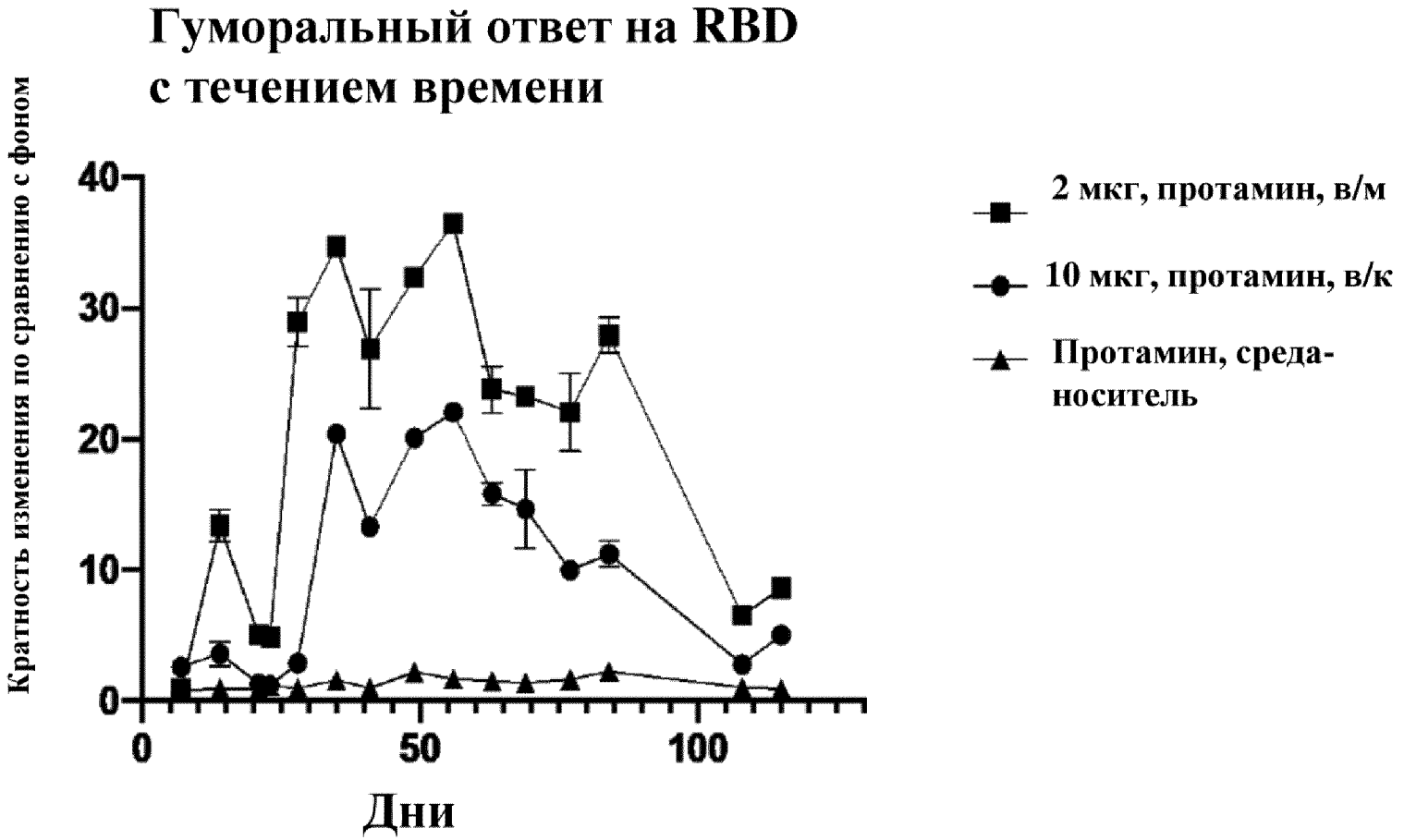
Фиг. 3

Пример	ORF1	ORF2	Где
A	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 являются мутационными вариантами друг друга.
B	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 получены из отличающихся полипептидов, но идентифицируют одну и ту же
C	Иммуноген 1	Иммуноген 2	Иммуноген 1 и иммуноген 2 получены из отличающихся полипептидов, но идентифицируют отличающиеся
D	Иммуноген	Адъювант	ORF2 кодирует экспрессию полипептидного адъюванта.
E	Адъювант	Иммуноген	ORF1 кодирует экспрессию полипептидного адъюванта.

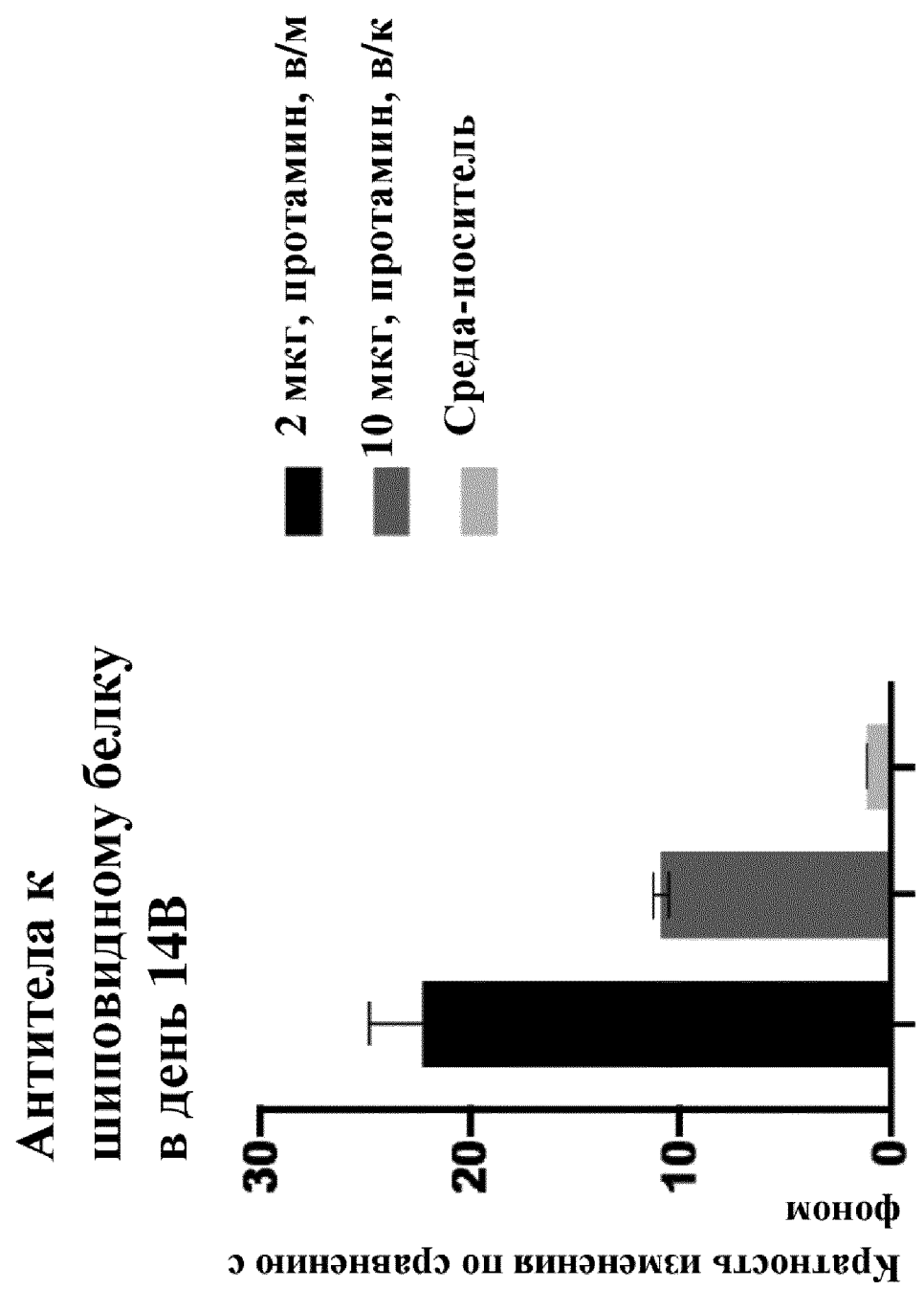
Фиг. 4


HeLa
RBD, нг
50
45
40
35
30
25
8
6
4
2
0
Сред-носитель
Кольцевая РНК
Количественный контроль
Фибробласт BJ
RBD, нг
50
45
40
35
30
25
8
6
4
2
0
Сред-носитель
Кольцевая РНК
Количественный контроль

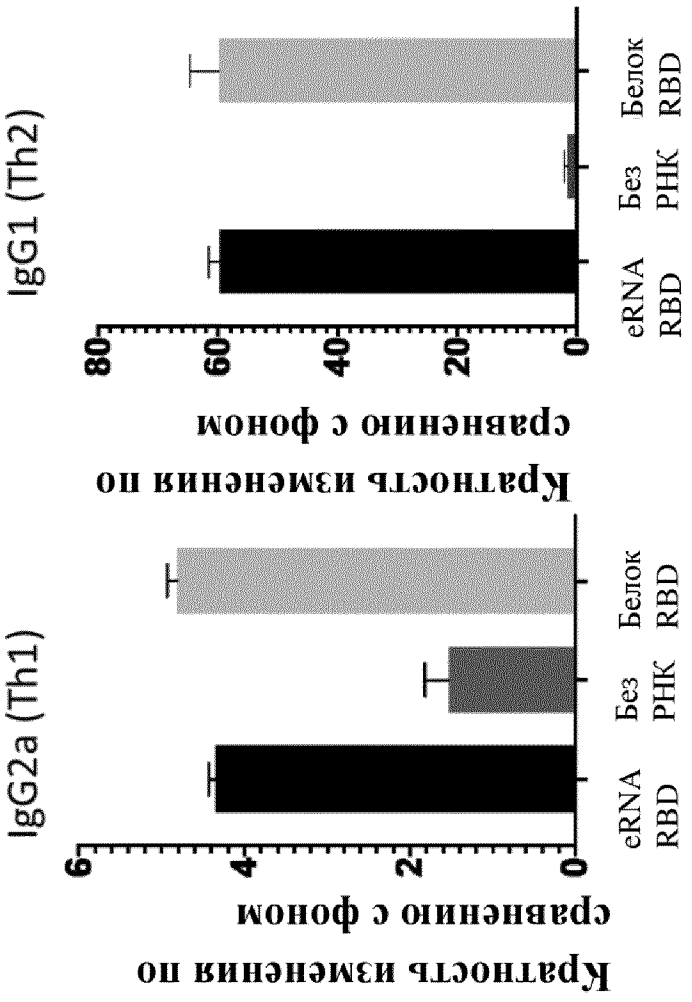
Фиг. 5


Гуморальный ответ на RBD
с течением времени
Кратность изменения по сравнению с фоном
40
30
20
10
0
0
50
100
Дни
2 мкг, протамин, в/м
10 мкг, протамин, в/к
Протамин, среда-
носитель

Фиг. 6

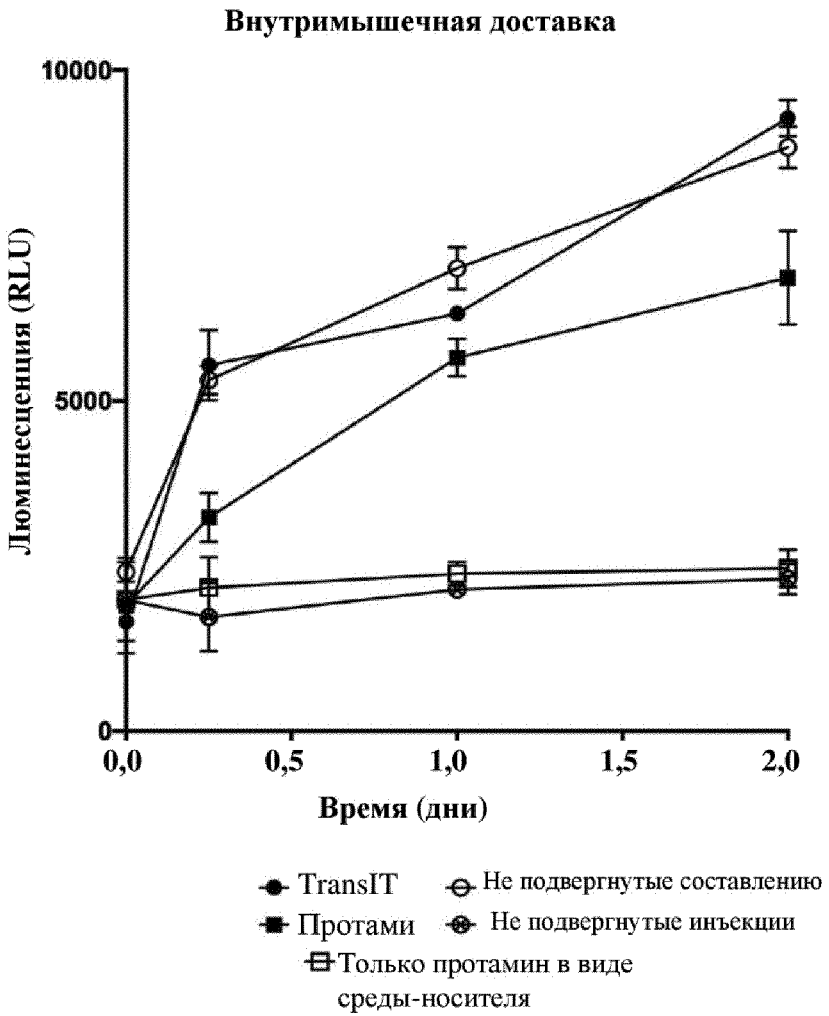

Антитела к шиповидному белку в день 14В
2 мкг, протамин, в/м
10 мкг, протамин, в/к
Среда-носитель
Кратность изменения по сравнению с фоном
0
10
20
30

Фиг. 7



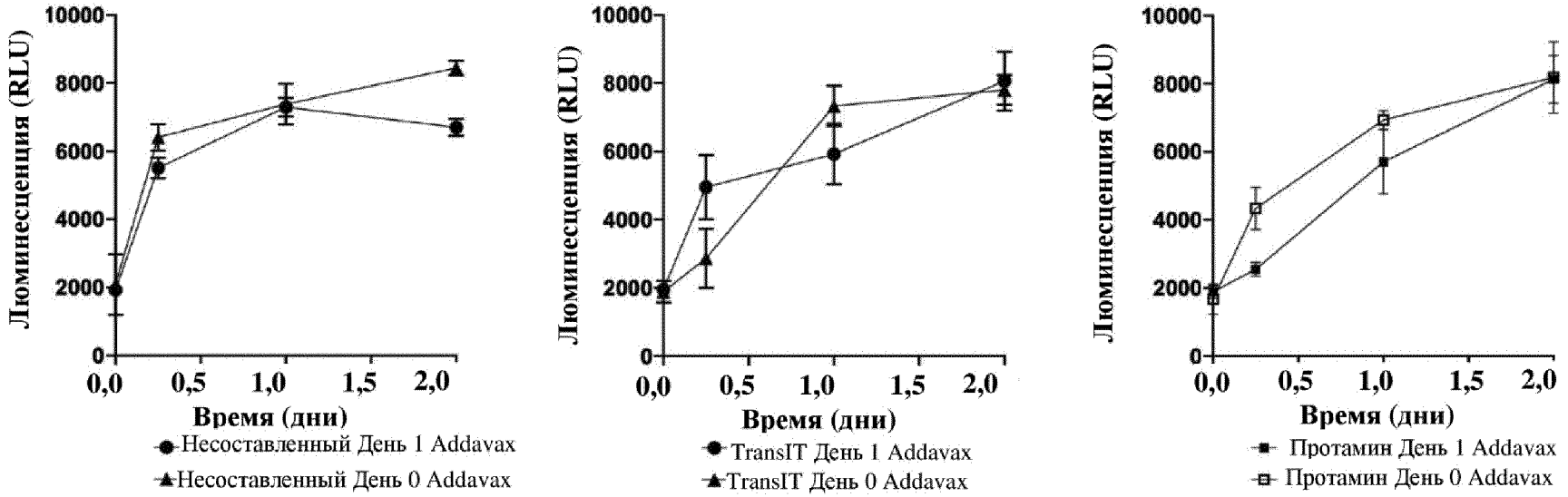
Конструкция	$PRNT_{50}$
eRNA RBD	40
Без РНК (отрицательный контроль)	<10
Белок RBD (положительный контроль)	10

Фиг. 8

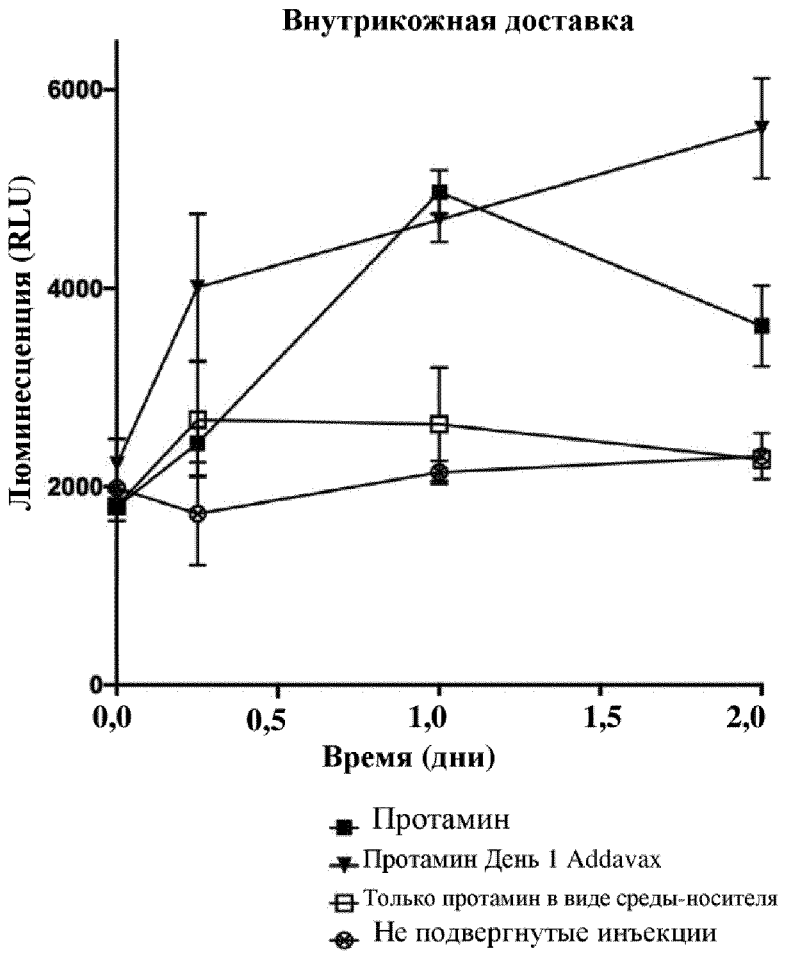

Внутримышечная доставка
Люминесценция (RLU)
10000
5000
0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
Время (дни)
TransIT
Протами
Только протамин в виде среды-носителя
Не подвергнутые составлению
Не подвергнутые инъекции

Фиг. 9

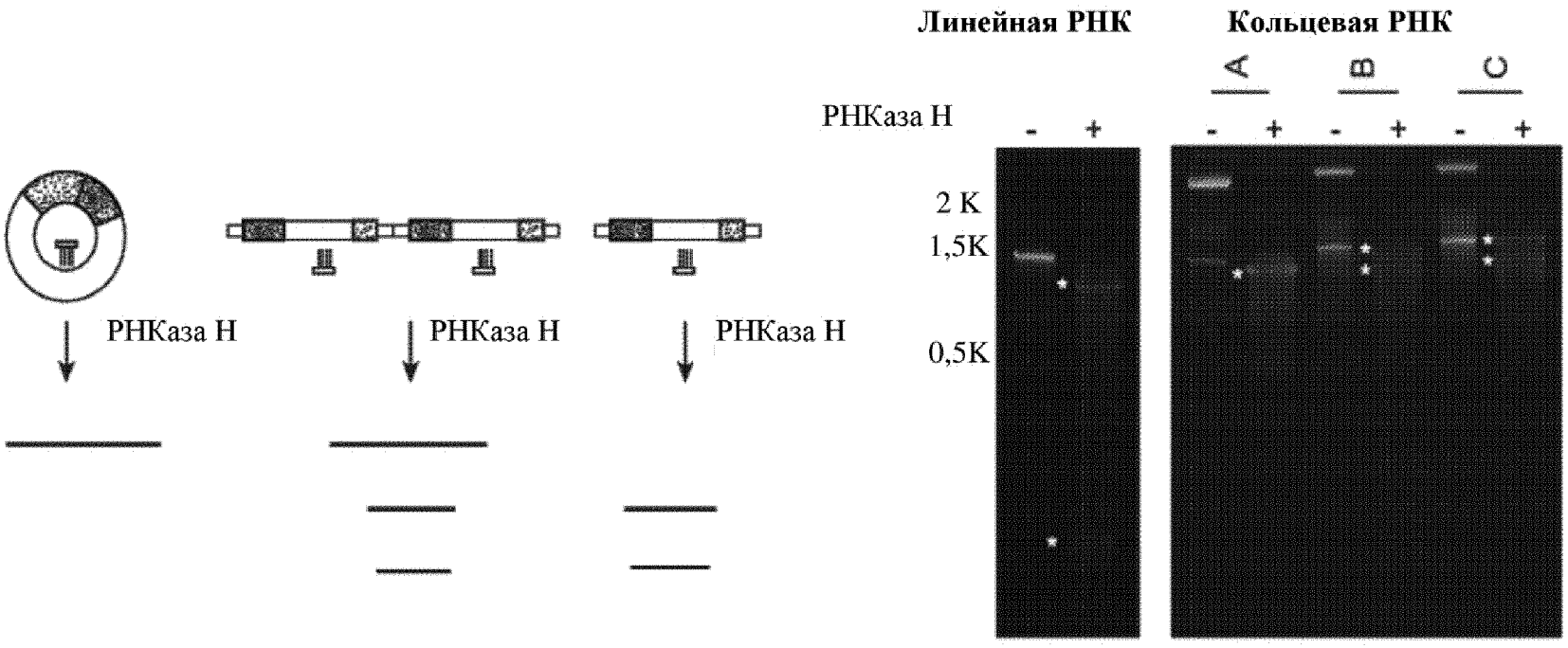
Внутримышечная доставка – время введения адъюванта



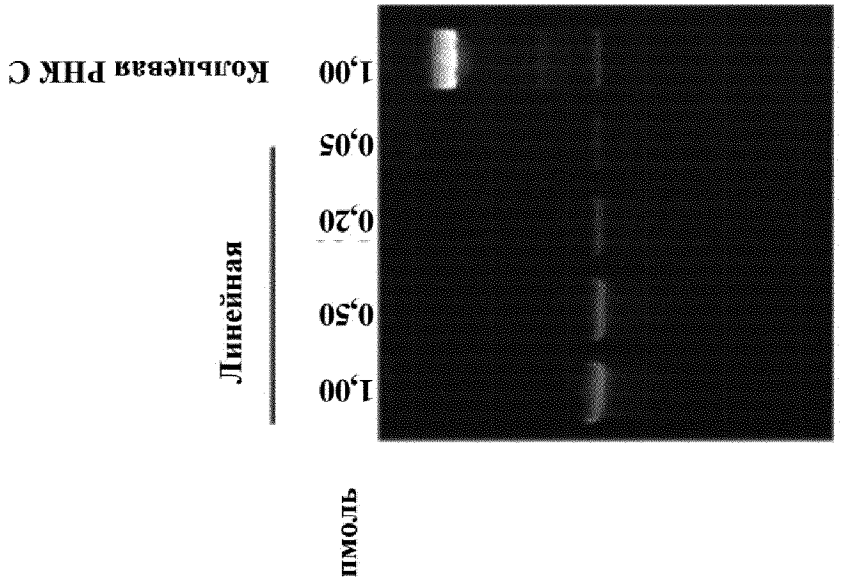
Фиг. 10

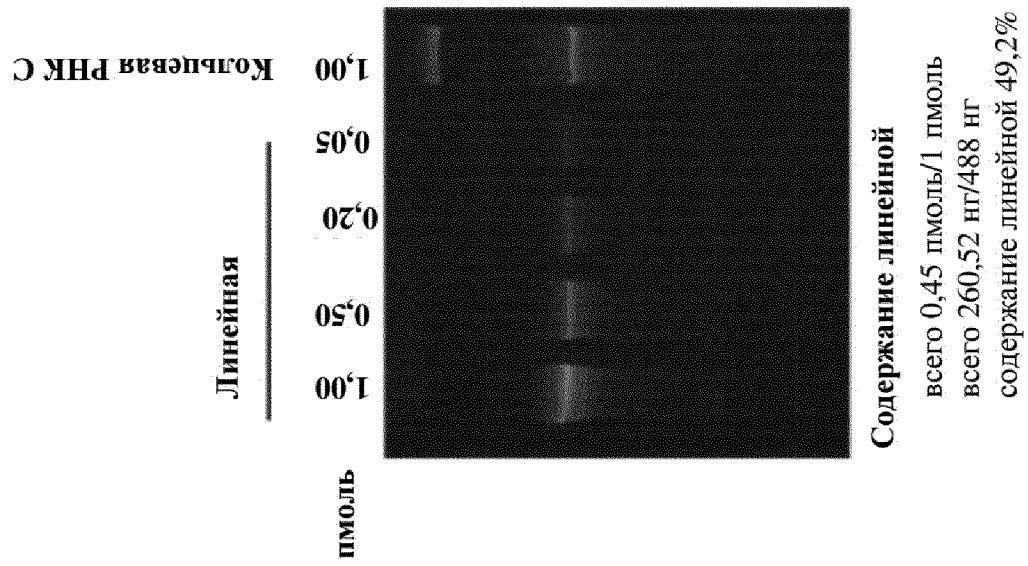

Внутрикожная доставка
Люминесценция (RLU)
6000
4000
2000
0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
Время (дни)
Протамин
Протамин День 1 Addavax
Только протамин в виде среды-носителя
Не подвергнутые инъекции

Фиг. 11

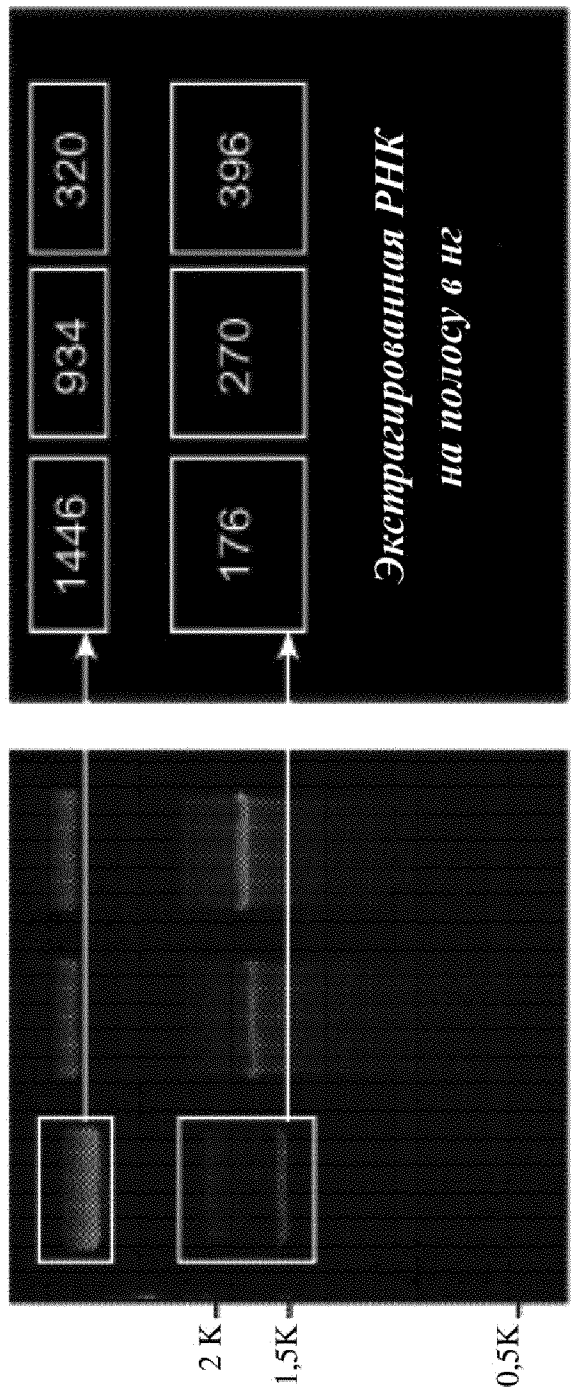

Линейная РНК
Кольцевая РНК
A
B
C
РНКаза H
- + - + - +
2 K
1,5K
0,5K
РНКаза H
РНКаза H
РНКаза H

Фиг. 12


Кольцевая РНК С
Линейная
пмоль
1,00
0,50
0,20
0,05
1,00
Содержание линейной
всего 0,31 пмоль/1 пмоль
всего 115,99 нг/395 нг
содержание линейной 30,2%


Кольцевая РНК С
Линейная
пмоль
1,00
0,50
0,20
0,05
1,00
Содержание линейной
всего 0,45 пмоль/1 пмоль
всего 260,52 нг/488 нг
содержание линейной 49,2%

Фиг. 13


A
B
C
2 K
1,5K
0,5K
A
B
C
1446
934
320
176
270
396
Экстрагированная РНК
на полосу в нг

Фиг. 14

Люцифераза Gaussia
Относительные единицы люминесценции (RLU)
8x10^7
6x10^7
4x10^7
2x10^7
1,4x10^6
1,2x10^6
1,0x10^6
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
0
6
24
48
72
96
120
Время (часы)
кольцевая РНК (чистота 84%)
кольцевая РНК (чистота 71%)
только среда-носитель

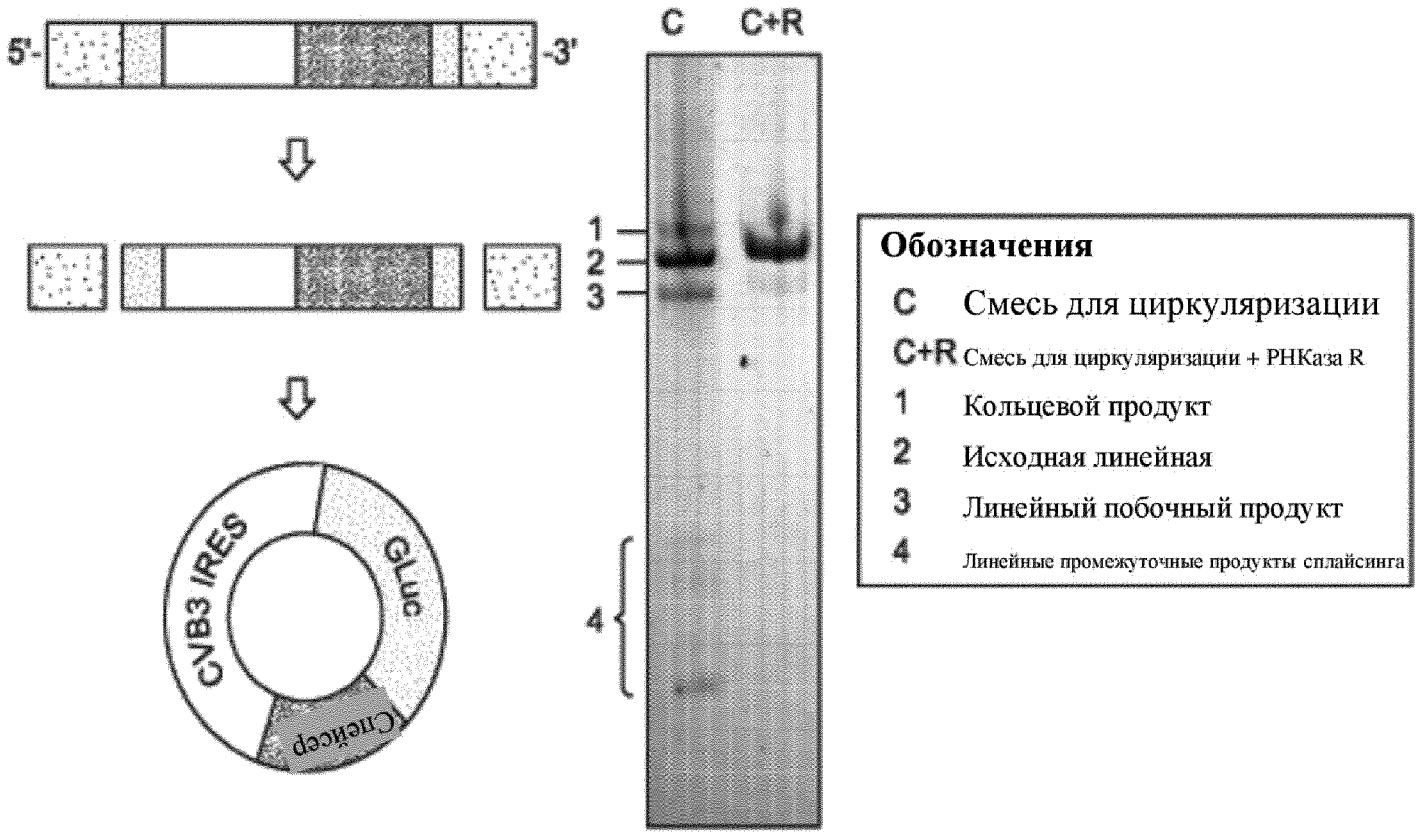
Фиг. 15

RIG-I
MDA-5
OAS
IFN-B
Относительные уровни РНК (Кратность по сравнению с носителем)
Относительные уровни РНК (Кратность по носителем)
6 ч
24 ч
Содержание линейной РНК
Слева направо:
только cirRNA (1,25 нМ)
cirRNA (1,25 нМ), линейная РНК (0,08 нМ)
cirRNA (1,25 нМ), линейная РНК (0,16 нМ)
cirRNA (1,25 нМ), линейная РНК (0,31 нМ)
cirRNA (1,25 нМ), линейная РНК (0,63 нМ)
cirRNA (1,25 нМ), линейная РНК (1,25 нМ)

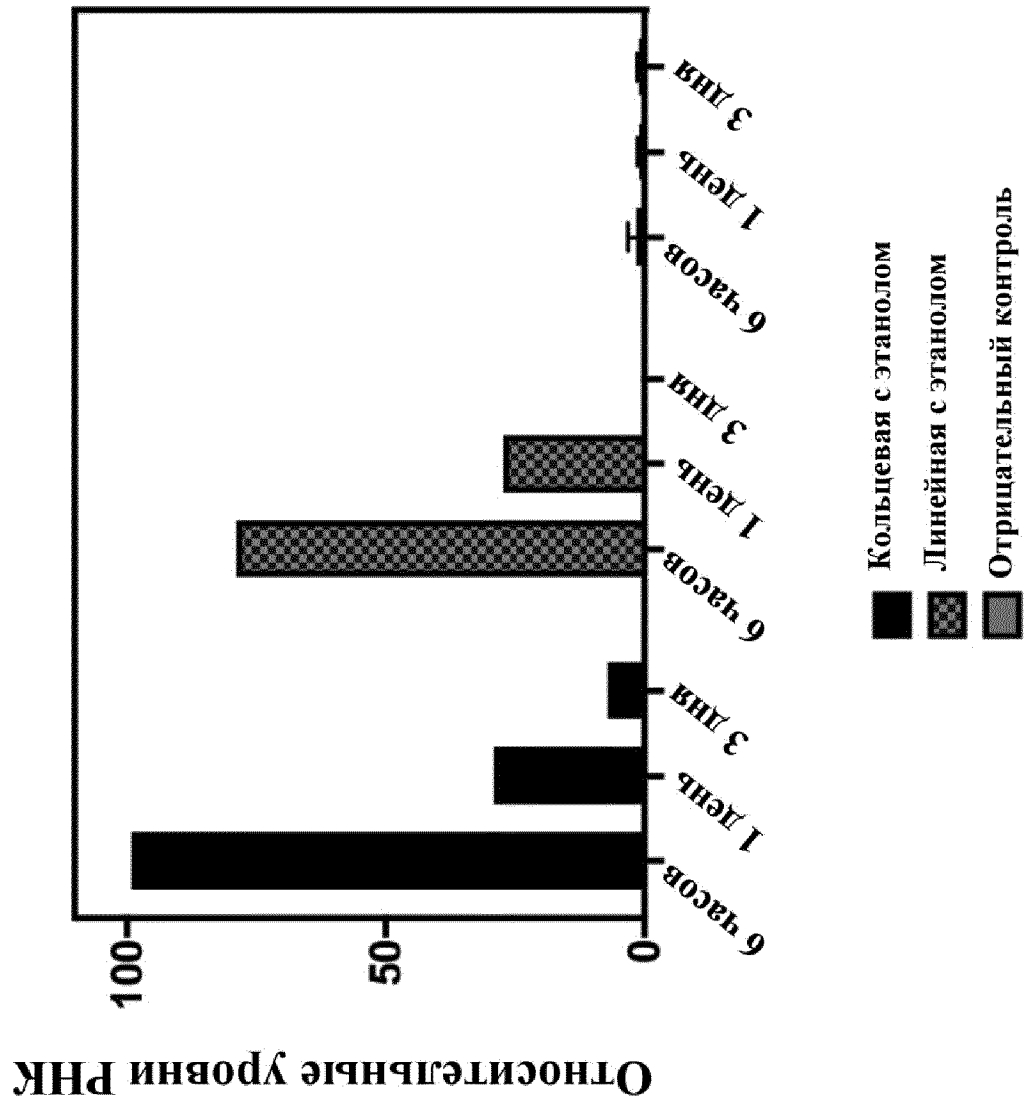
Фиг. 16

кДа
Контроль
Линейная, сдвигающий элемент
Кольцевая, сдвигающий элемент
20
50
Flag (nЛюцифераза)
B-тубулин

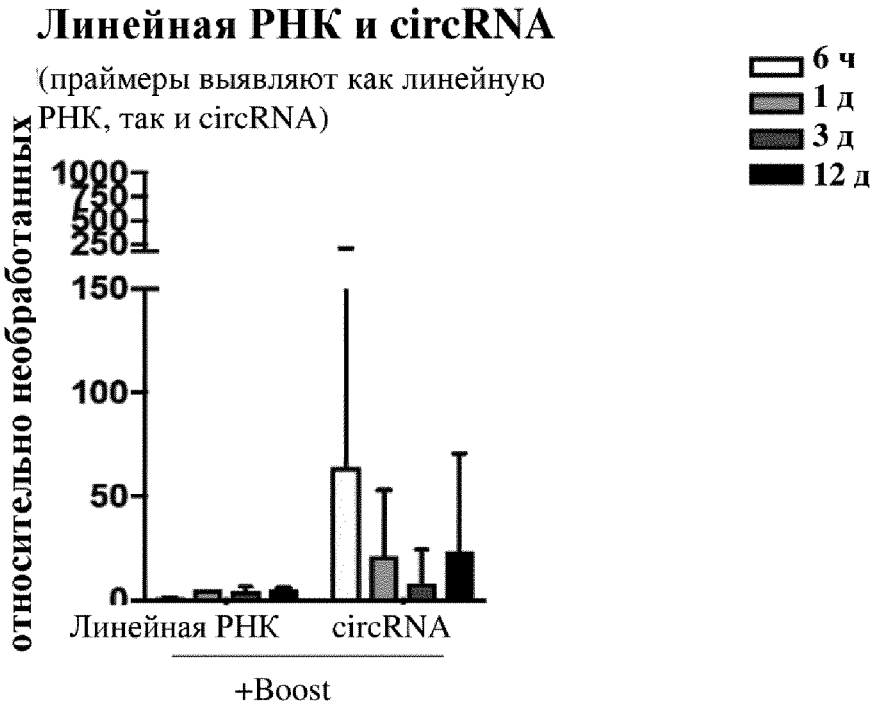
Фиг. 17


5'-
-3'
CVB3 IRES
GLuc
cTeRicep
C
C+R
1
2
3
4
Обозначения
C Смесь для циркуляризации
C+R Смесь для циркуляризации + РНКаза R
1 Кольцевой продукт
2 Исходная линейная
3 Линейный побочный продукт
4 Линейные промежуточные продукты сплайсинга

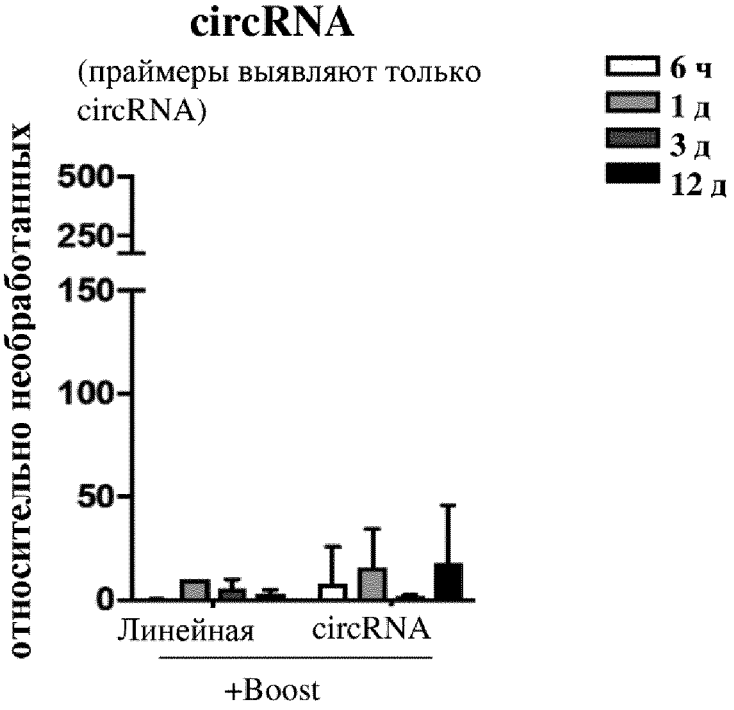
Фиг. 18


Относительные уровни РНК
100
50
0
6 часов
1 День
3 Дня
6 часов
1 День
3 Дня
6 часов
1 День
3 Дня
Кольцевая с этанолом
Линейная с этанолом
Отрицательный контроль

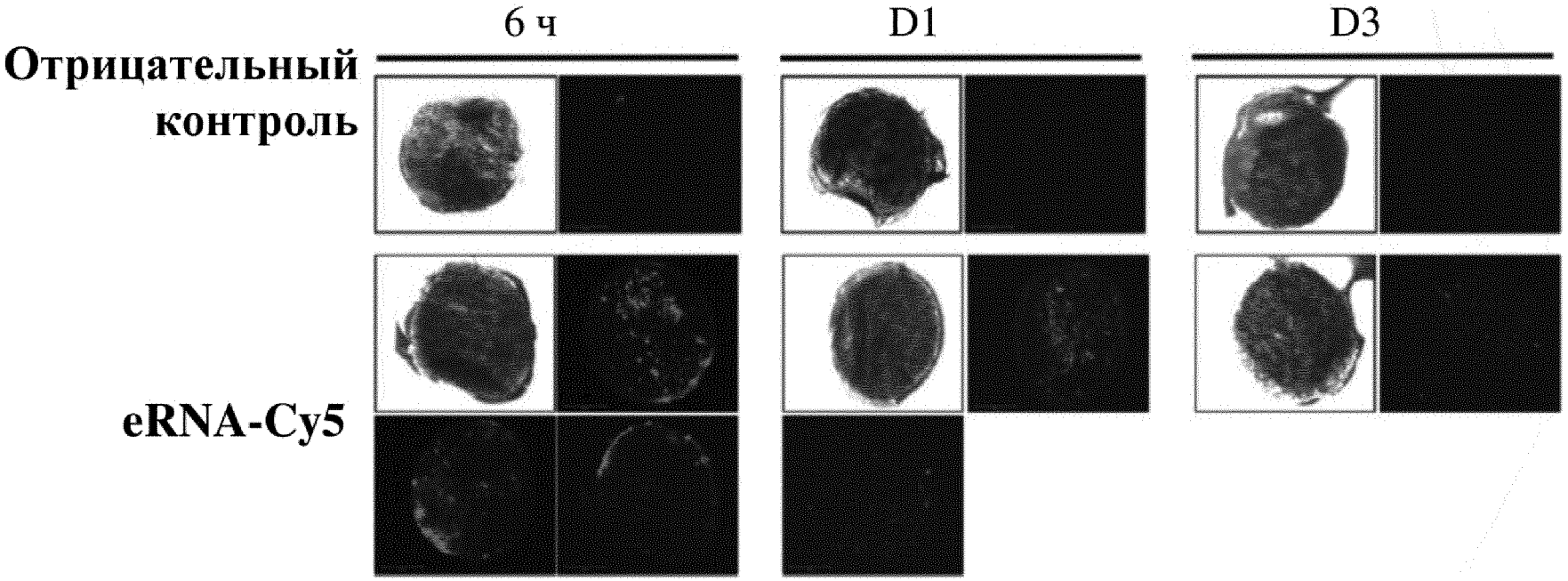
Фиг. 19A



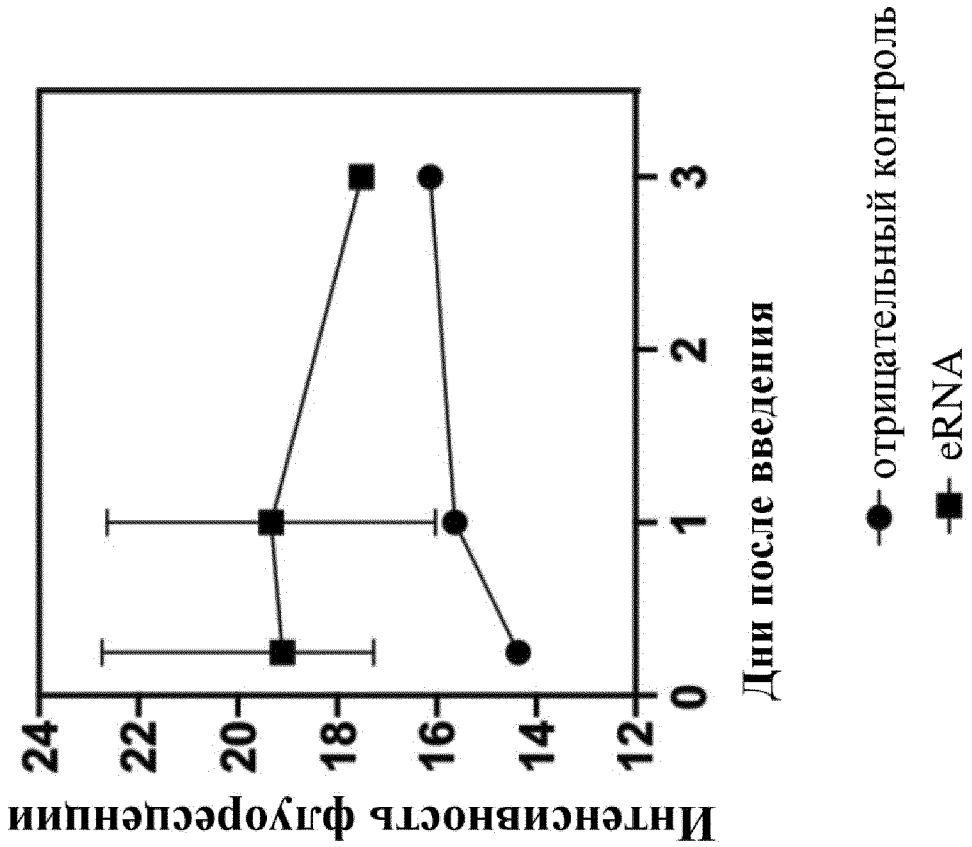
Фиг. 19B



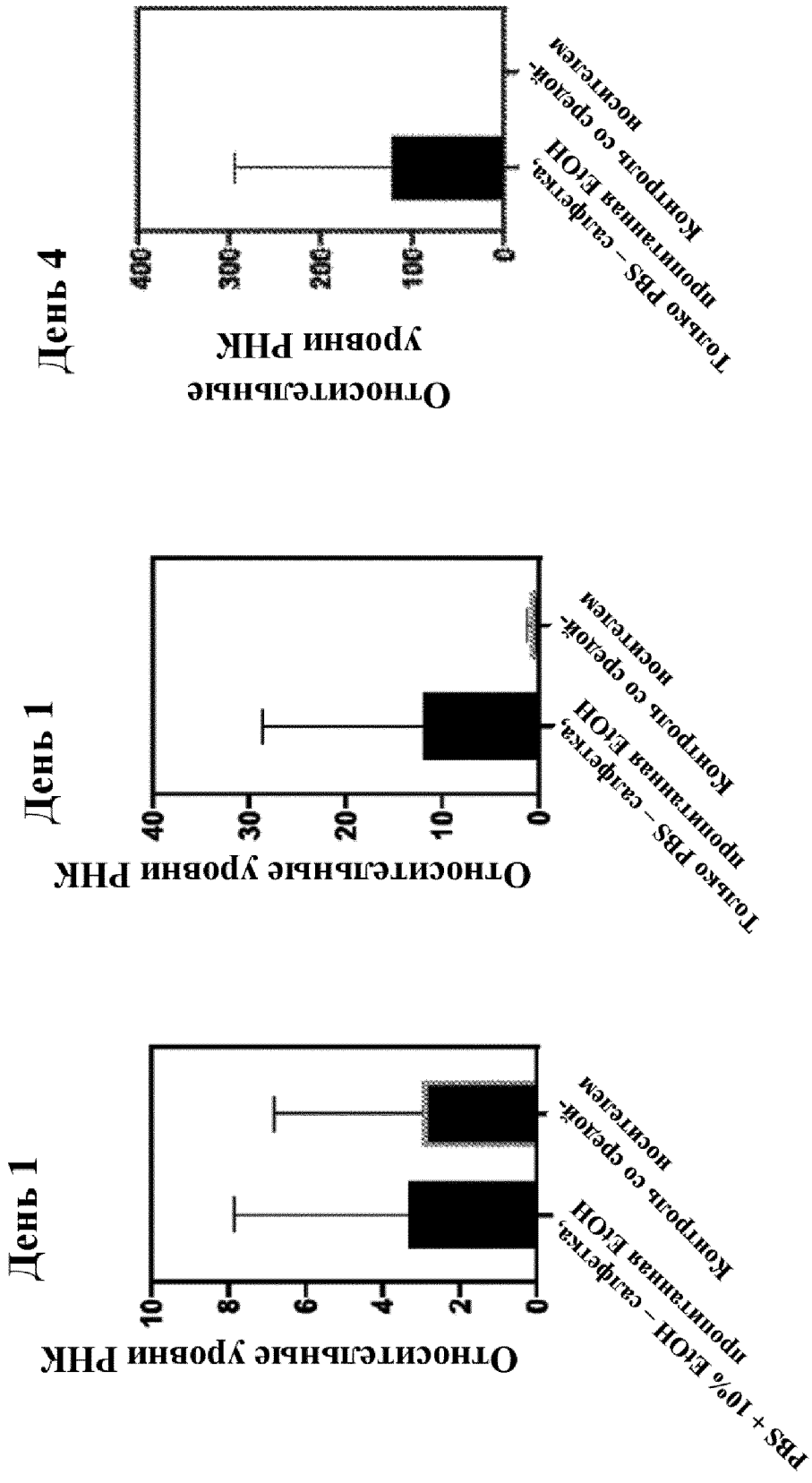
Фиг. 20



Фиг. 21


Интенсивность флуоресценции
24
22
20
18
16
14
12
0
1
2
3
Дни после введения
отрицательный контроль
eRNA

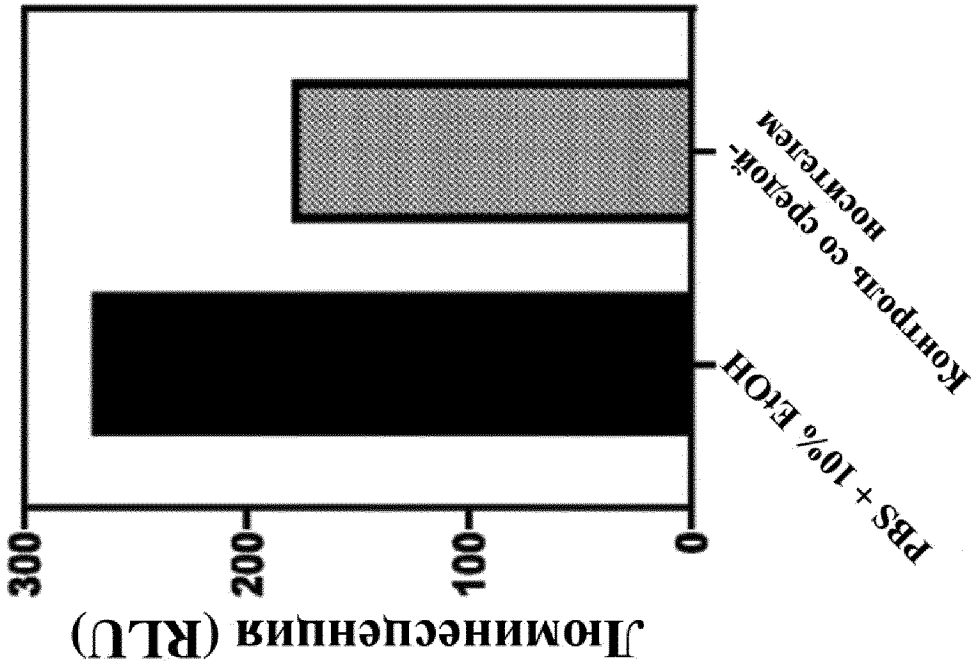
Фиг. 22


День 4
Относительные уровни РНК
0
100
200
300
400
Только PBS – сайленсер, пропитанная EtOH
Контроль со средой-носителем
День 1
Относительные уровни РНК
0
10
20
30
40
Только PBS – сайленсер, пропитанная EtOH
Контроль со средой-носителем
День 1
Относительные уровни РНК
0
2
4
6
8
10
PBS + 10% EtOH – сайленсер, пропитанная EtOH
Контроль со средой-носителем

Фиг. 23

День 1
Относительные уровни РНК
8
6
4
2
0
PBS + салфетка, пропитанная iPrOH
Контроль со средой-носителем
День 4
Относительные уровни РНК
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
PBS + салфетка, пропитанная iPrOH
Контроль со средой-носителем

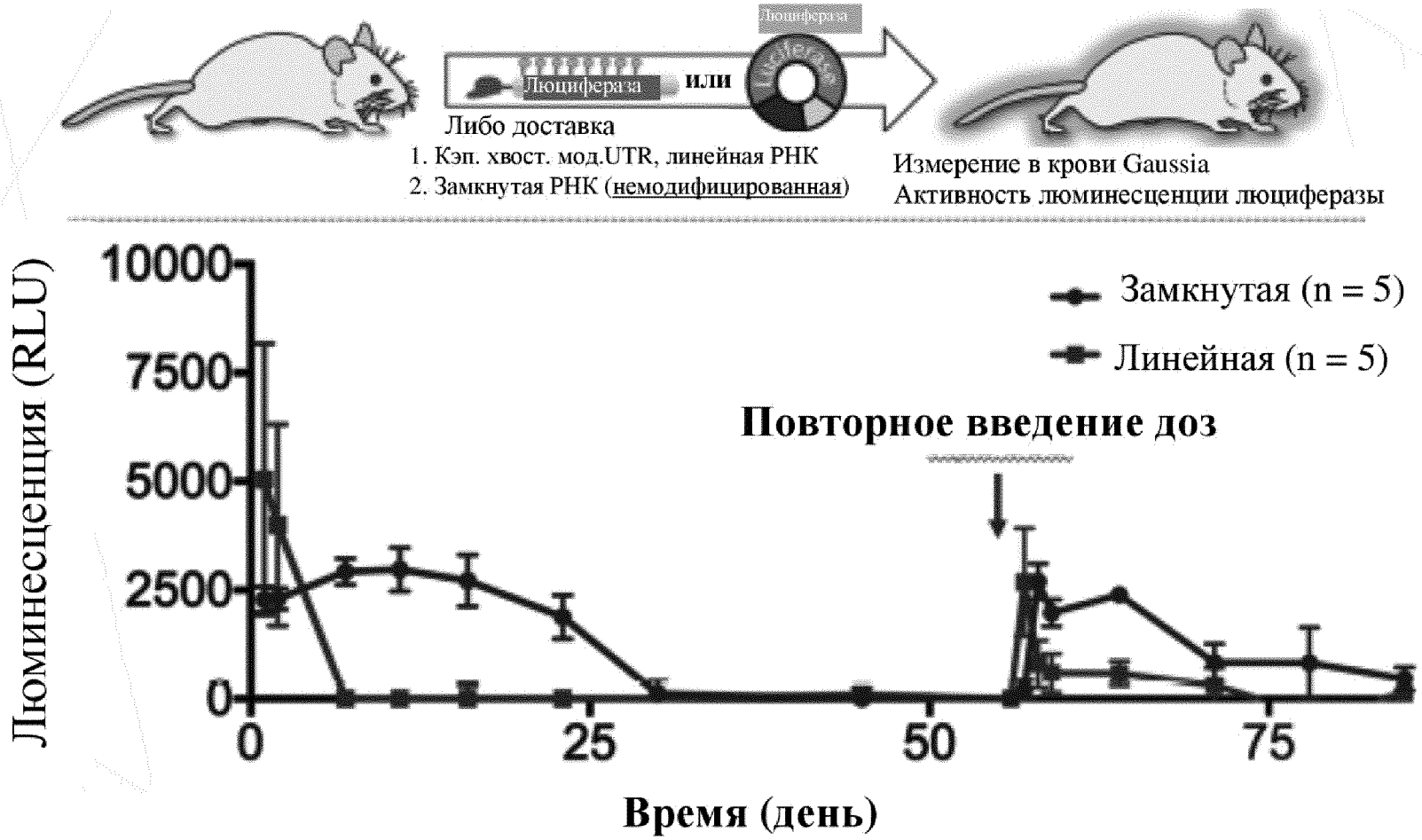
Фиг. 24


Люминесценция (RLU)
300
200
100
0
PBS + 10% EtOH
Контроль со средой-носителем

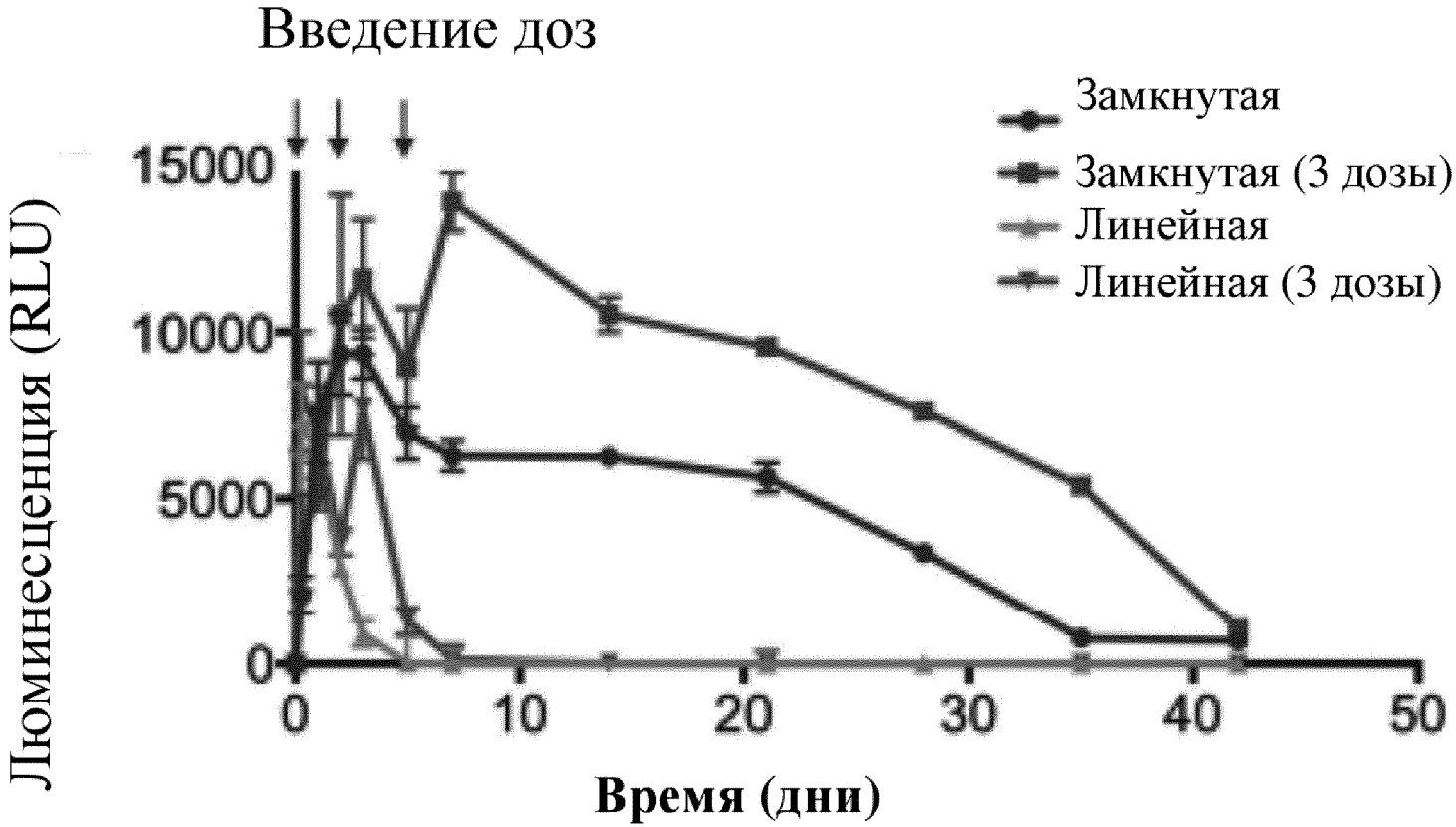
Фиг. 25

Нормализованная кратность изменения
Уровни РНК
1,5
1,0
0,5
0,0
GLuc-кольцевая
Gluc-линейная
Gluc-линейная, модифицированная глобином
6 ч
24 ч
48 ч
72 ч
120 ч
Время после трансфекции

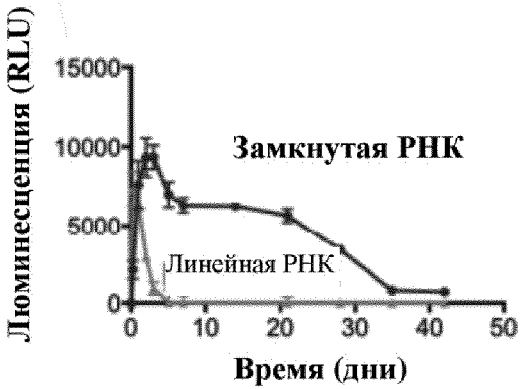
Фиг. 26


Люцифераза
Люцифераза
или
Либо доставка
1. Кэп. хвост. мод.UTR, линейная РНК
2. Замкнутая РНК (немодифицированная)
Измерение в крови Gaussia
Активность люминесценции люциферазы
Люминесценция (RLU)
10000
7500
5000
2500
0
0
25
50
75
Замкнутая (n = 5)
Линейная (n = 5)
Повторное введение доз
Время (день)

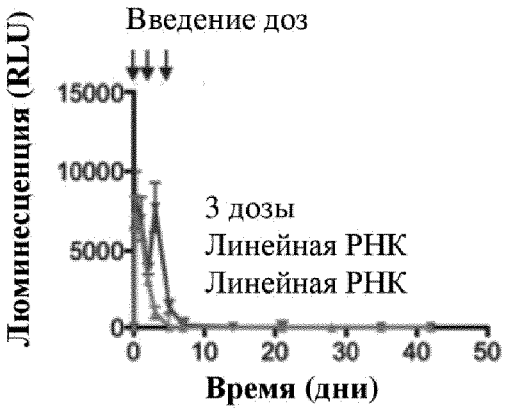
Фиг. 27


Введение доз
Замкнутая
Замкнутая (3 дозы)
Линейная
Линейная (3 дозы)
Люминесценция (RLU)
15000
10000
5000
0
0
10
20
30
40
50
Время (дни)

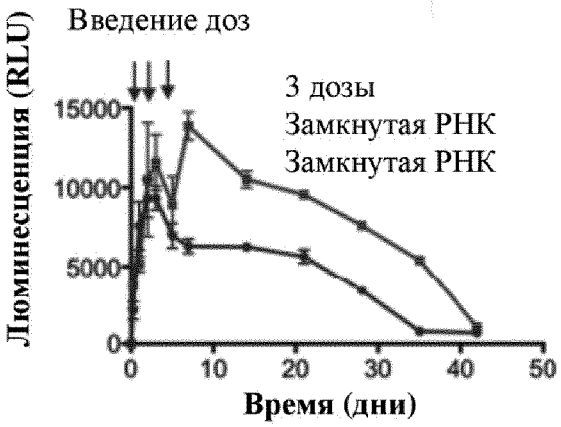
Фиг. 28



Активность замкнутой РНК сохраняется дольше, чем замкнутой РНК

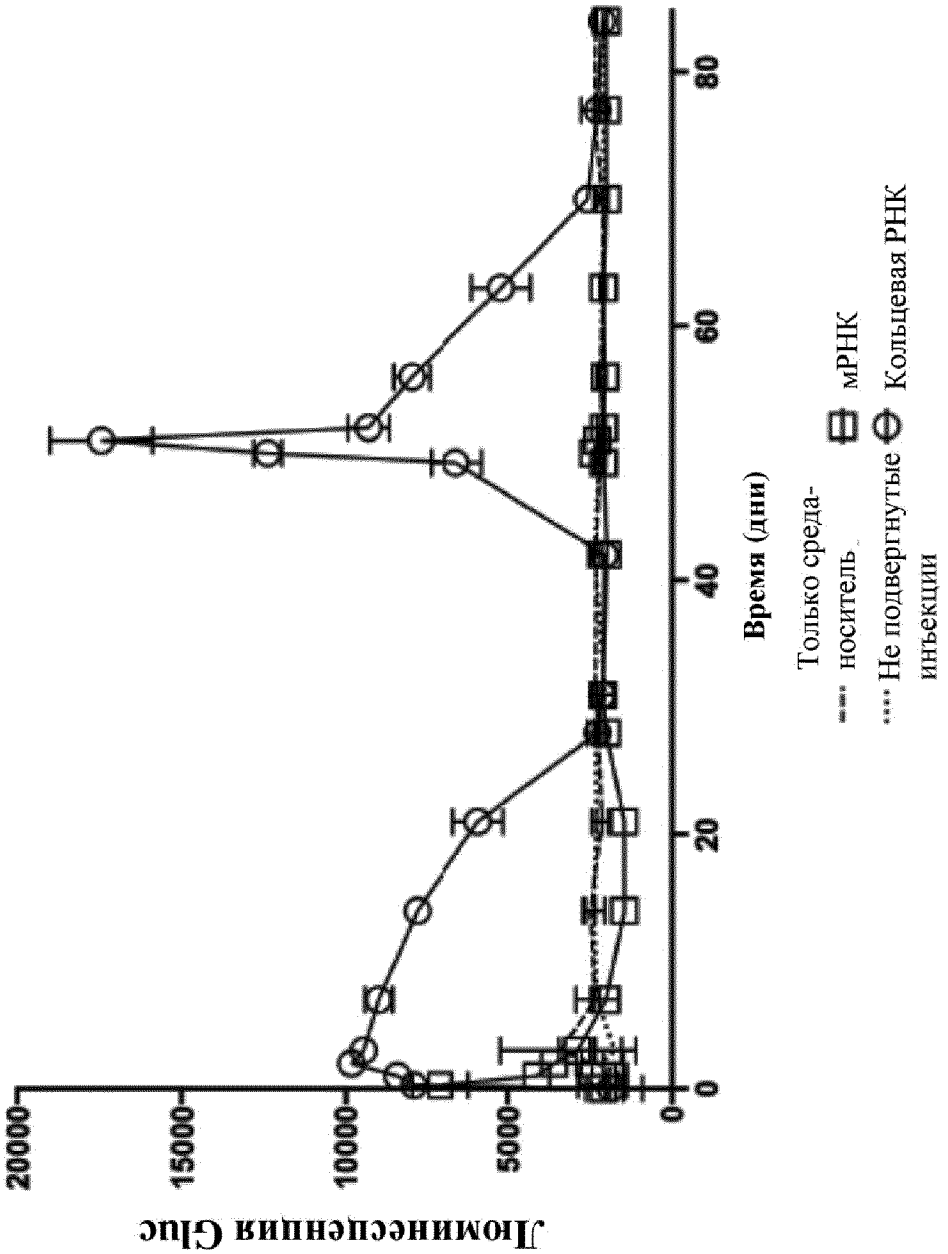


Повторное введение доз линейной РНК не поддерживает экспрессию

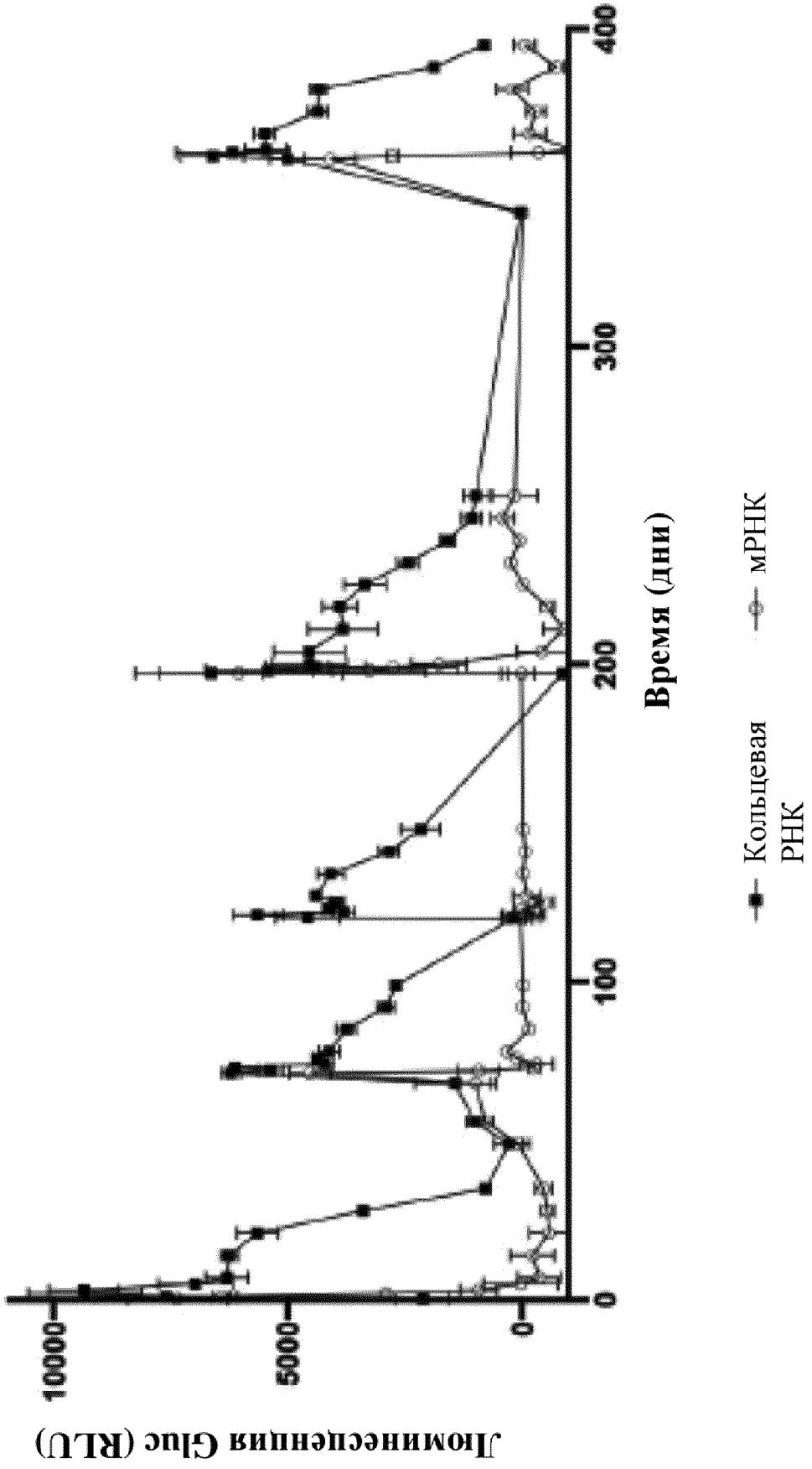


Повторное введение доз замкнутой РНК повышает экспрессию

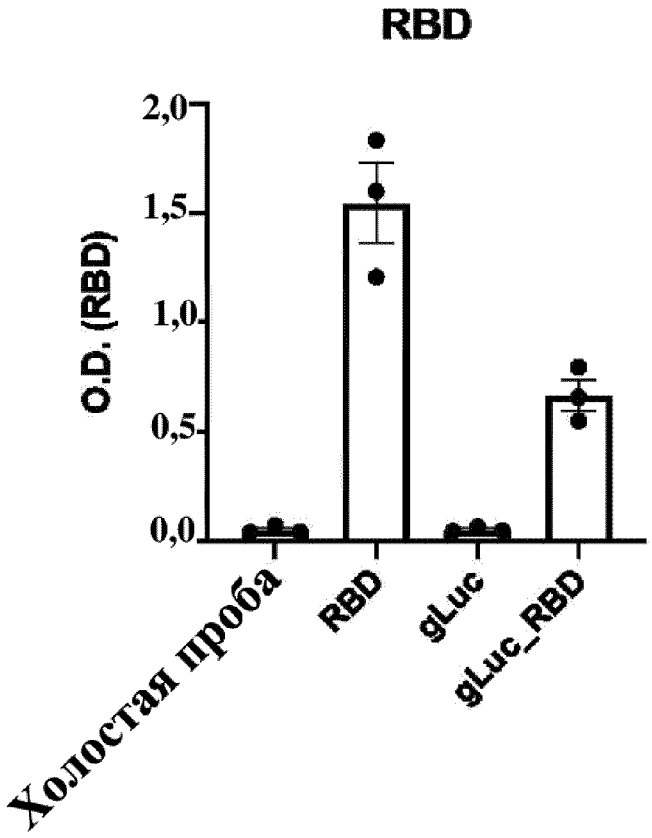
Фиг. 29


Люминесценция Gluc
20000
15000
10000
5000
0
0
20
40
60
80
Время (дни)
Только среда-носитель
мРНК
Не подвергнутые инъекции
Кольцевая РНК

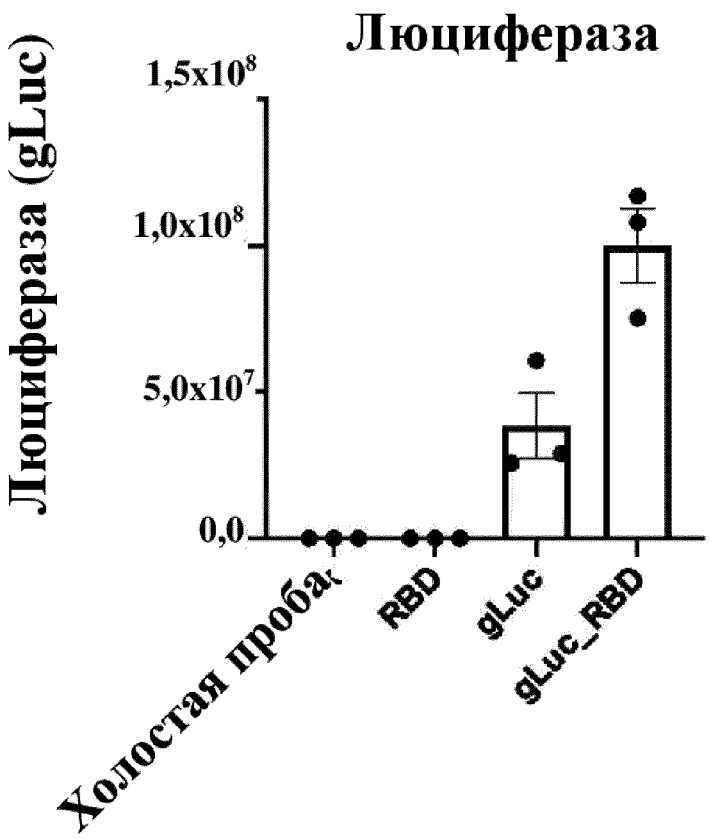
Фиг. 30


Люминесценция Gluc (RLU)
10000
5000
0
0
100
200
300
400
Время (дни)
Кольцевая РНК
мРНК

Фиг. 31A

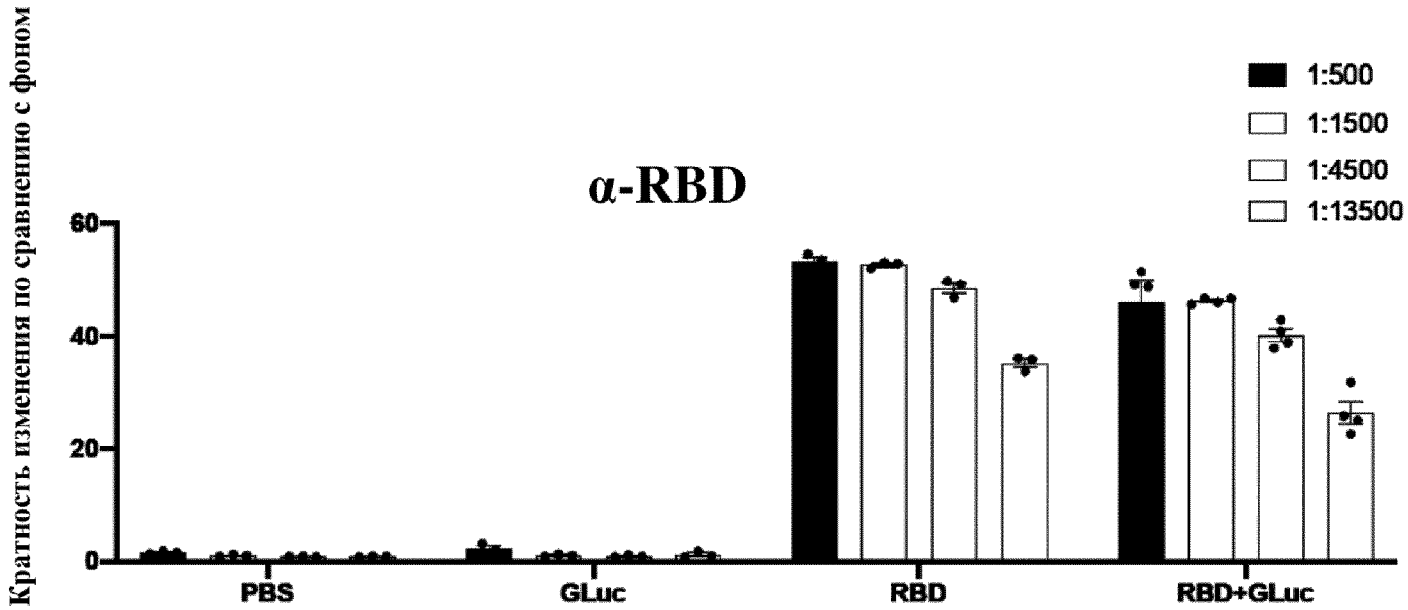


Фиг. 31B



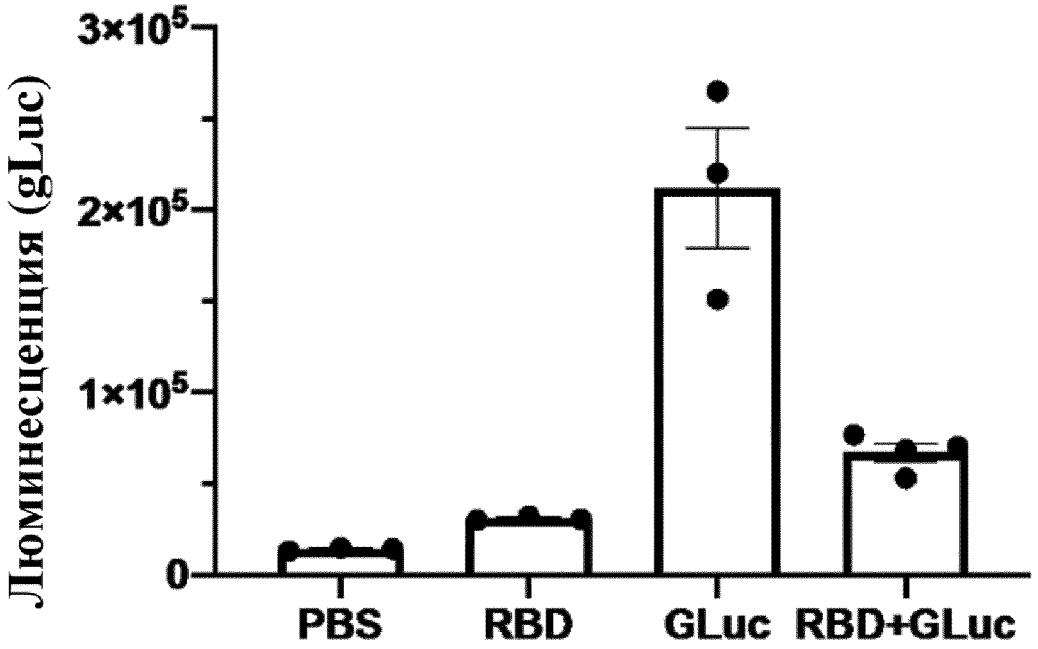
Фиг. 32A

Антитела к α-RBD
В день 17



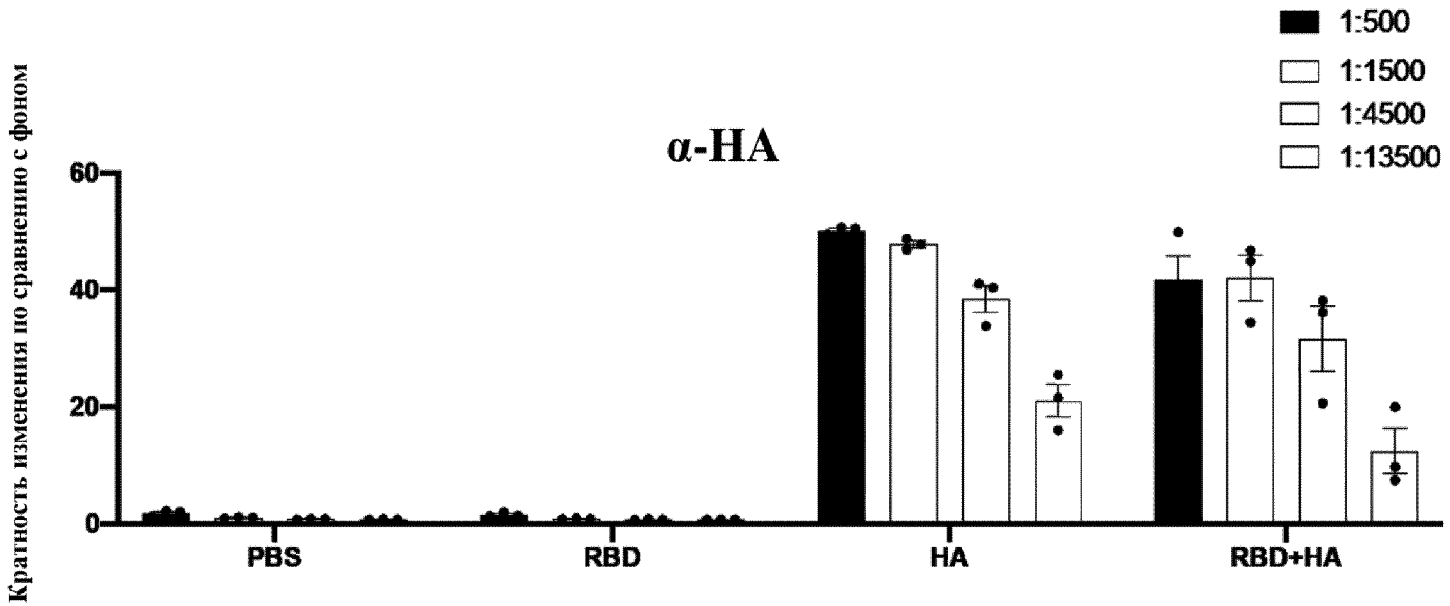
Фиг. 32B

Люцифераза в день 2



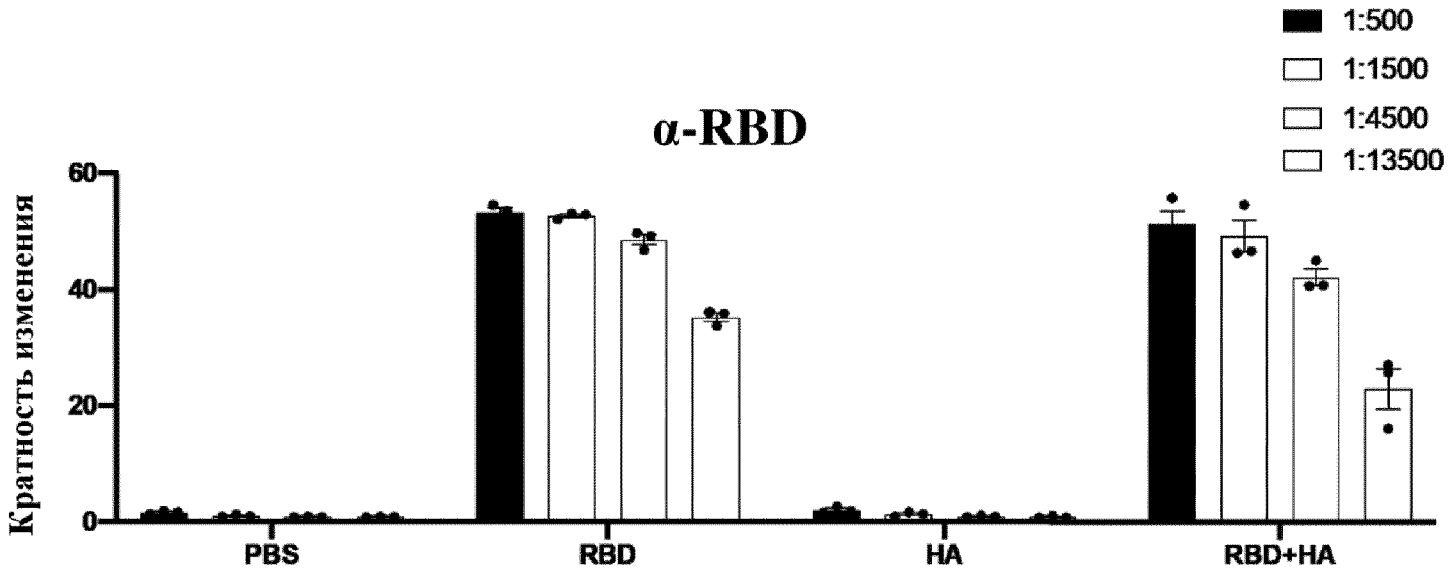
Фиг. 33A

Антитела к α-HA
В день 17



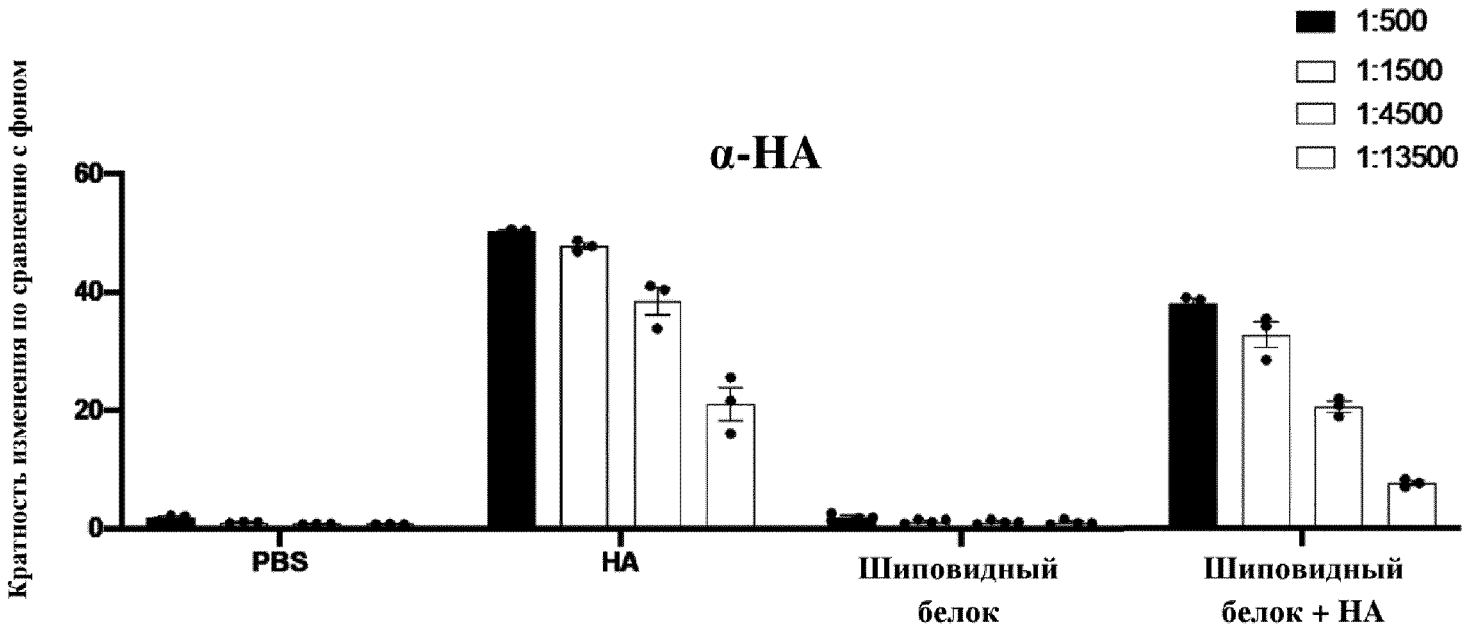
Фиг. 33B

Антитела к α-RBD
В день 17



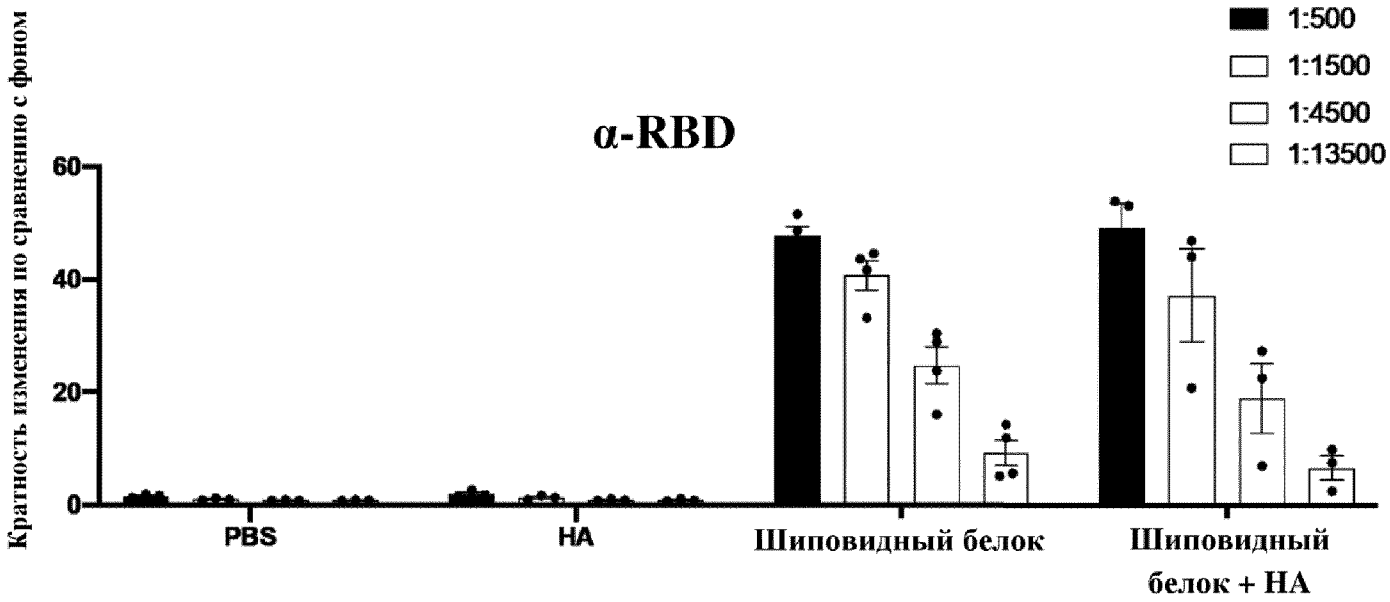
Фиг. 34A

Антитела к α-HA
В день 17

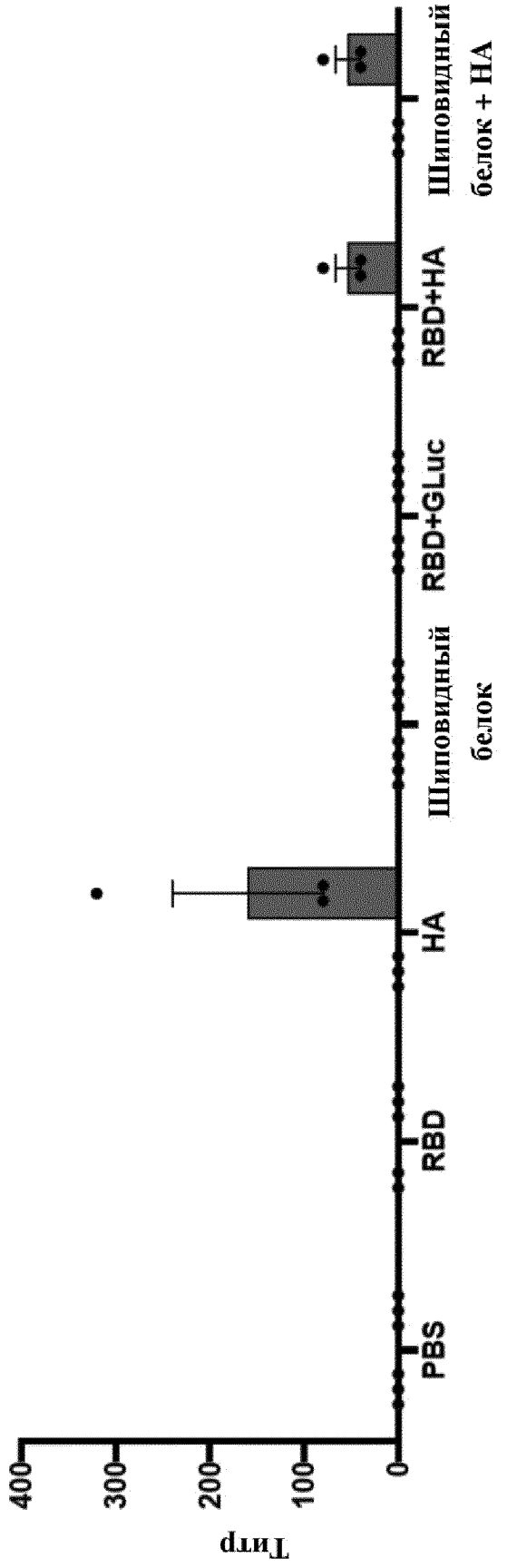


Фиг. 34B

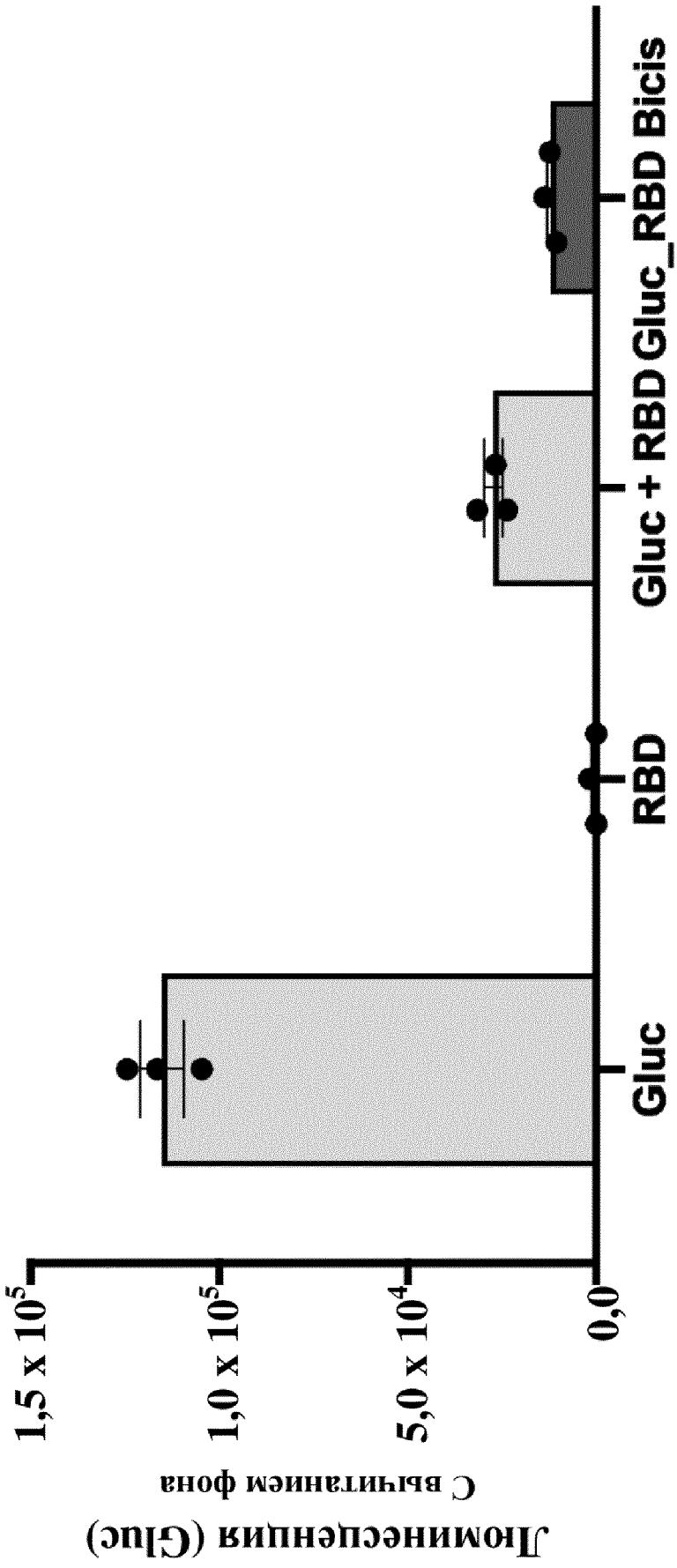
Антитела к α-RBD
В день 17



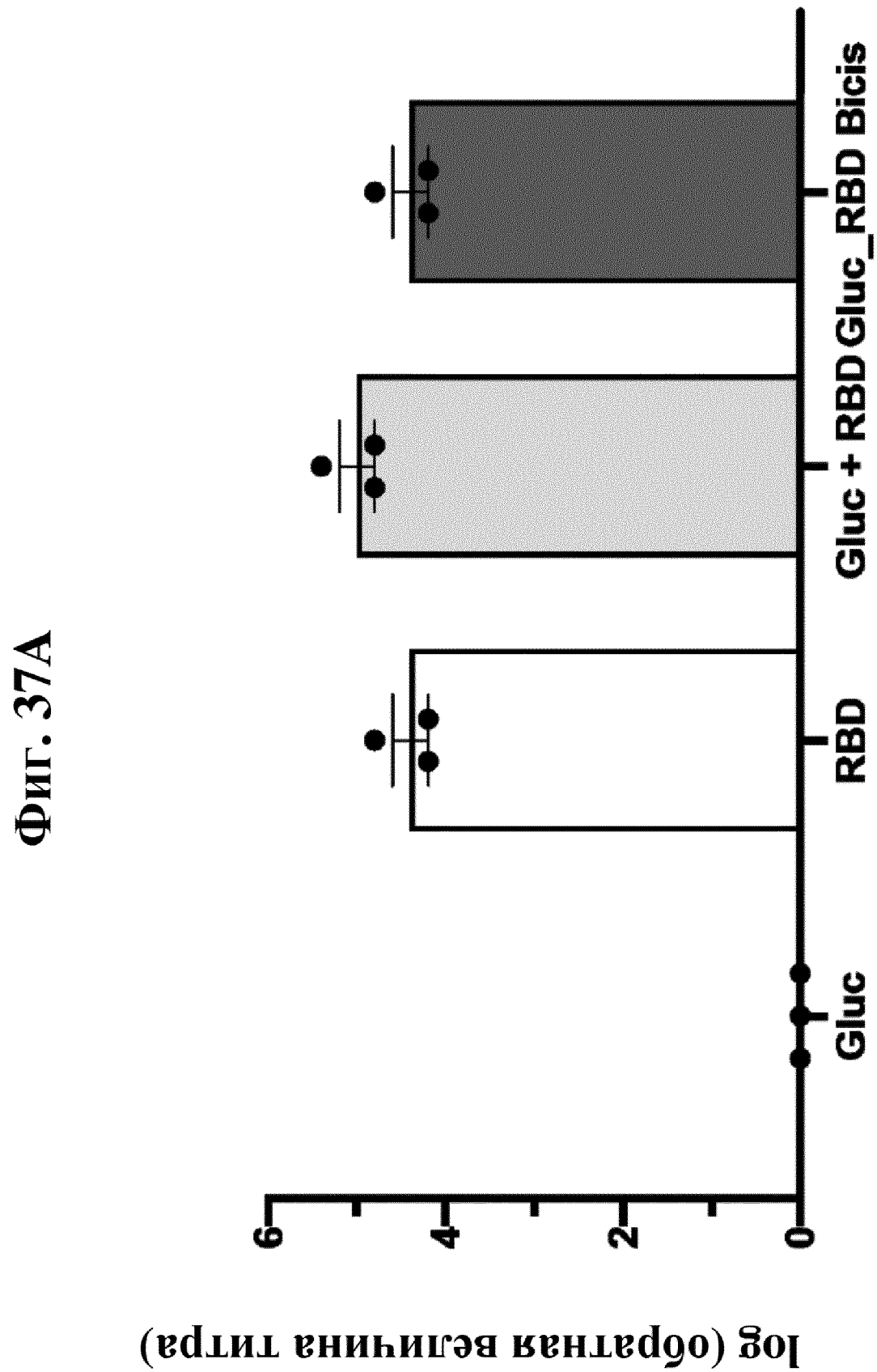
Фиг. 35

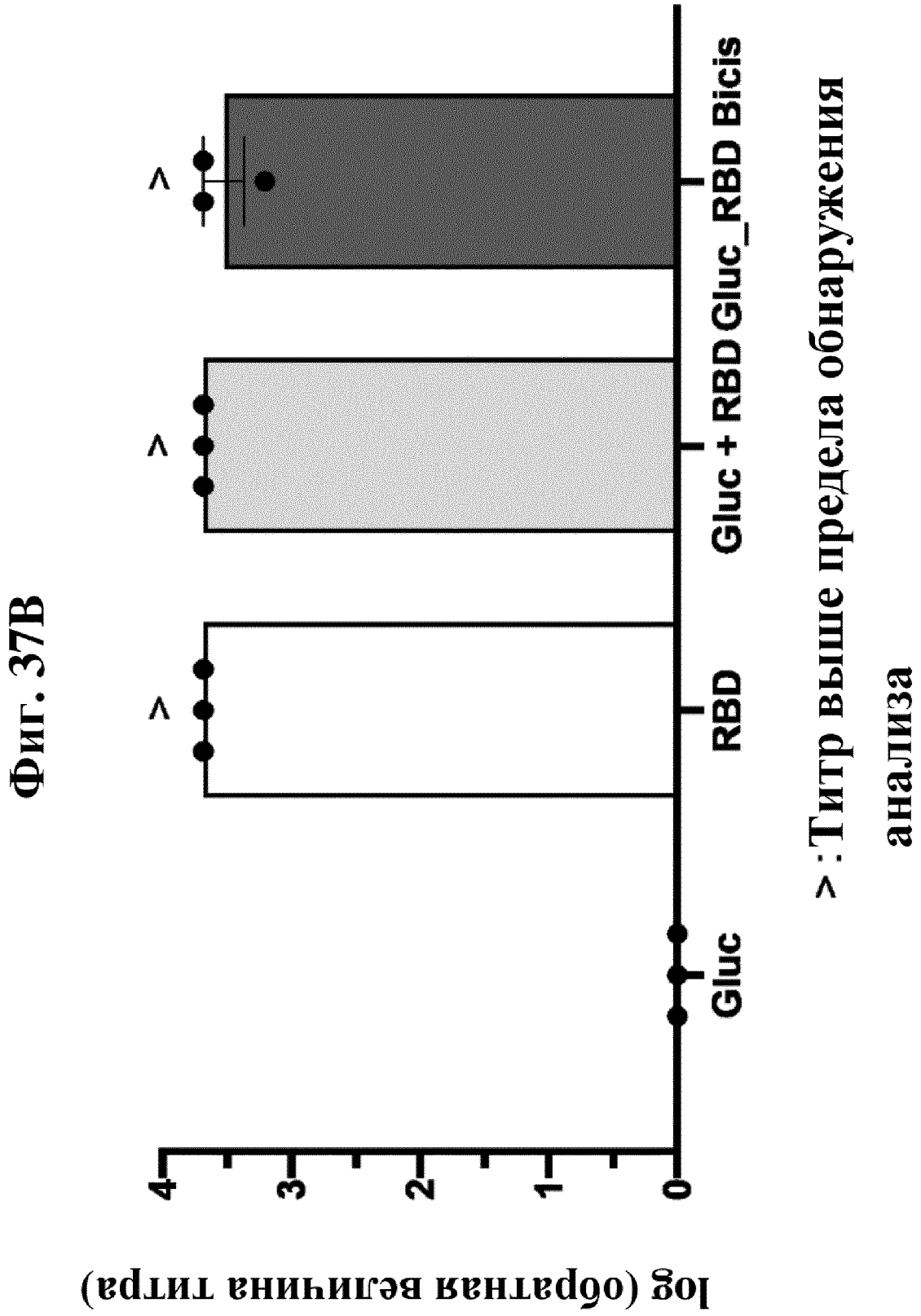

День 2
День 17
Титр
400
300
200
100
0
PBS
RBD
HA
Шиповидный белок
RBD+GLuc
RBD+HA
Шиповидный белок + HA

Фиг. 36


Люминесценция (Gluc)
С вычитанием фона
1,5 x 10^5
1,0 x 10^5
5,0 x 10^4
0,0
Gluc
RBD
Gluc + RBD
Gluc_RBD Bicis

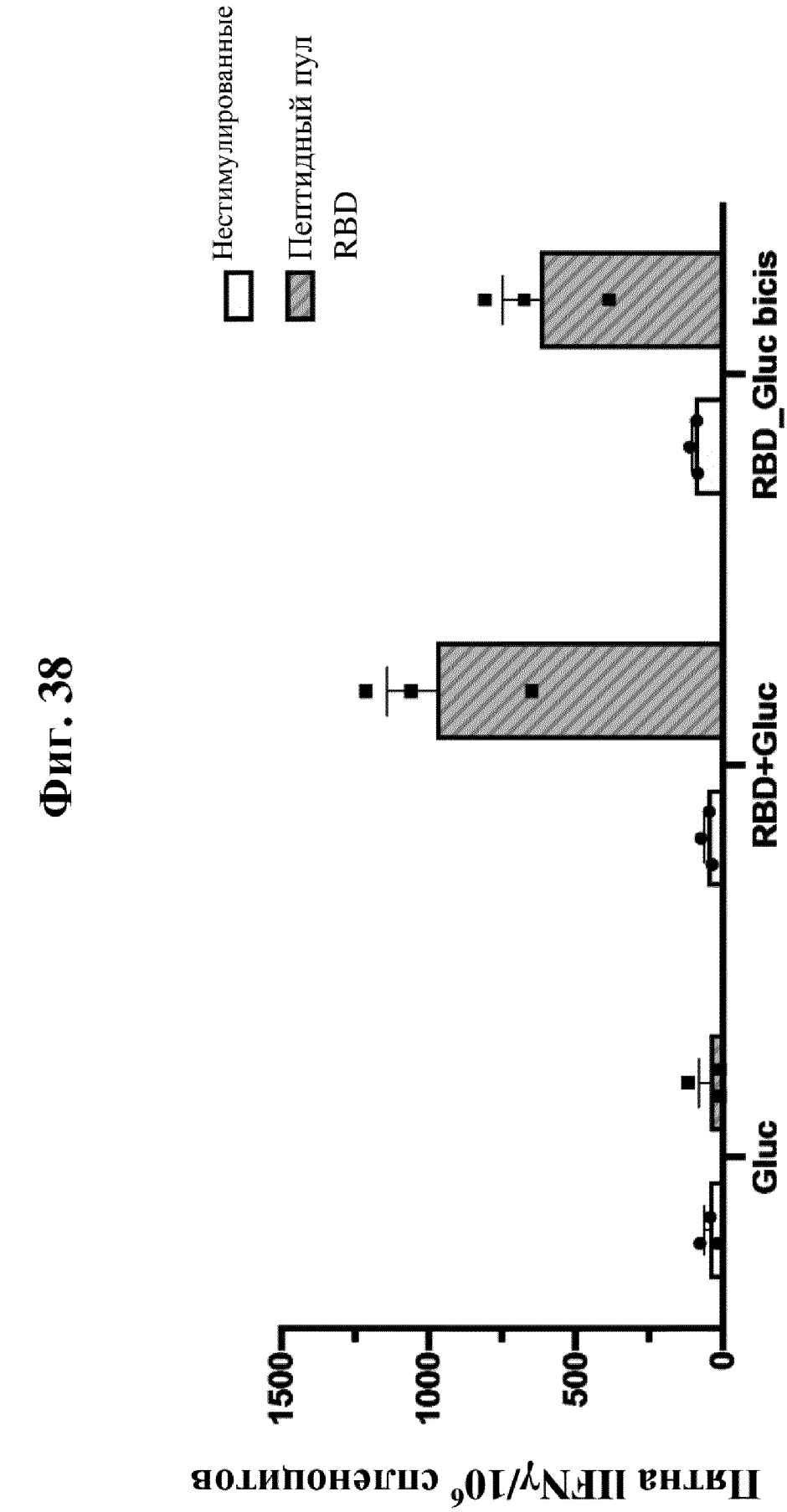
Фиг. 37A


log (обратная величина титра)
6
4
2
0
Gluc
RBD
Gluc + RBD
Gluc_RBD Bicis

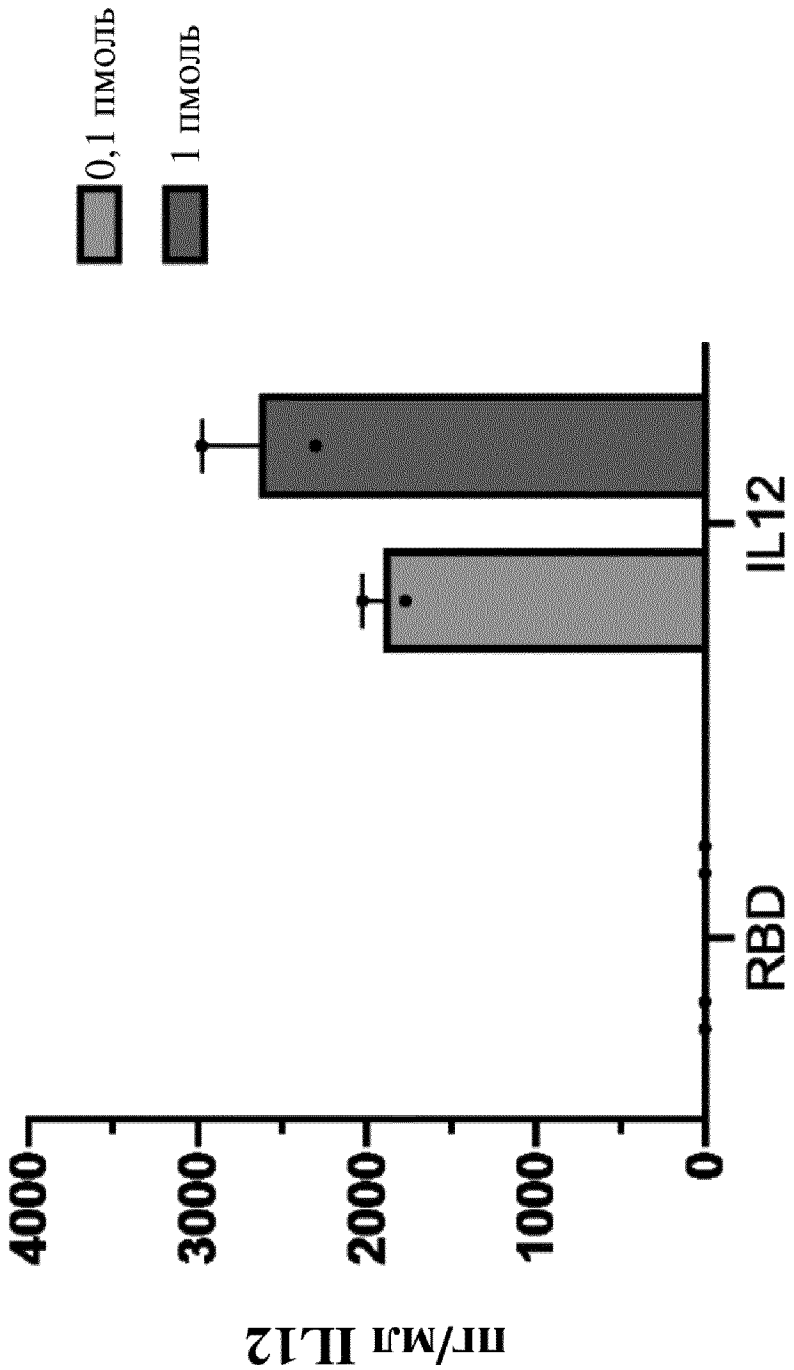

log (обратная величина титра)
4
3
2
1
0
Gluc
RBD
Gluc + RBD
Gluc_RBD Bicis
^
^
^
^: Титр выше предела обнаружения анализа

Фиг. 37B

Фиг. 38

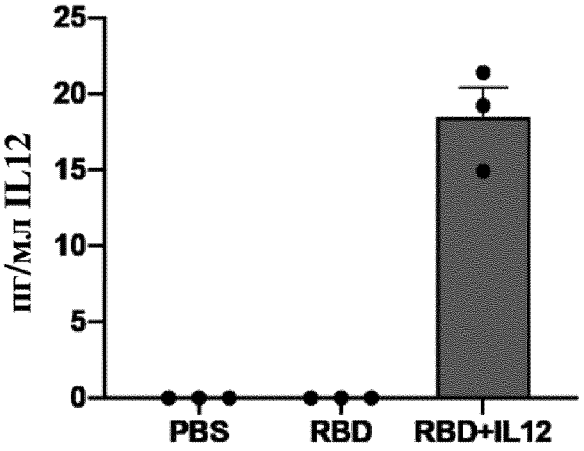

Нестимулированные
Пептидный пул RBD
Пятна IIFNγ/10^6 спленоцитов
1500
1000
500
0
Gluc
RBD+Gluc
RBD_Gluc bicis

Фиг. 39



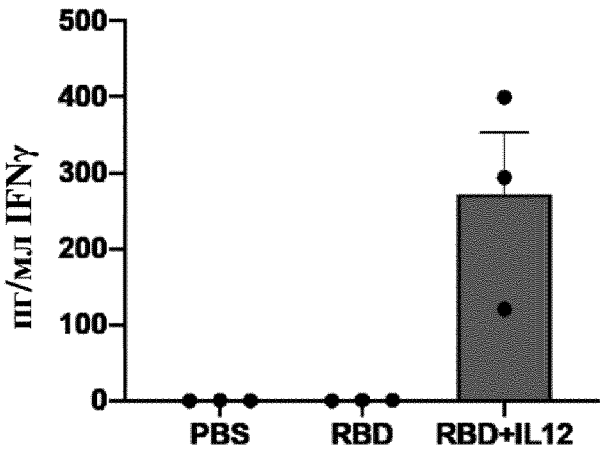
Фиг. 40A

Экспрессия IL12p70 *in vivo*



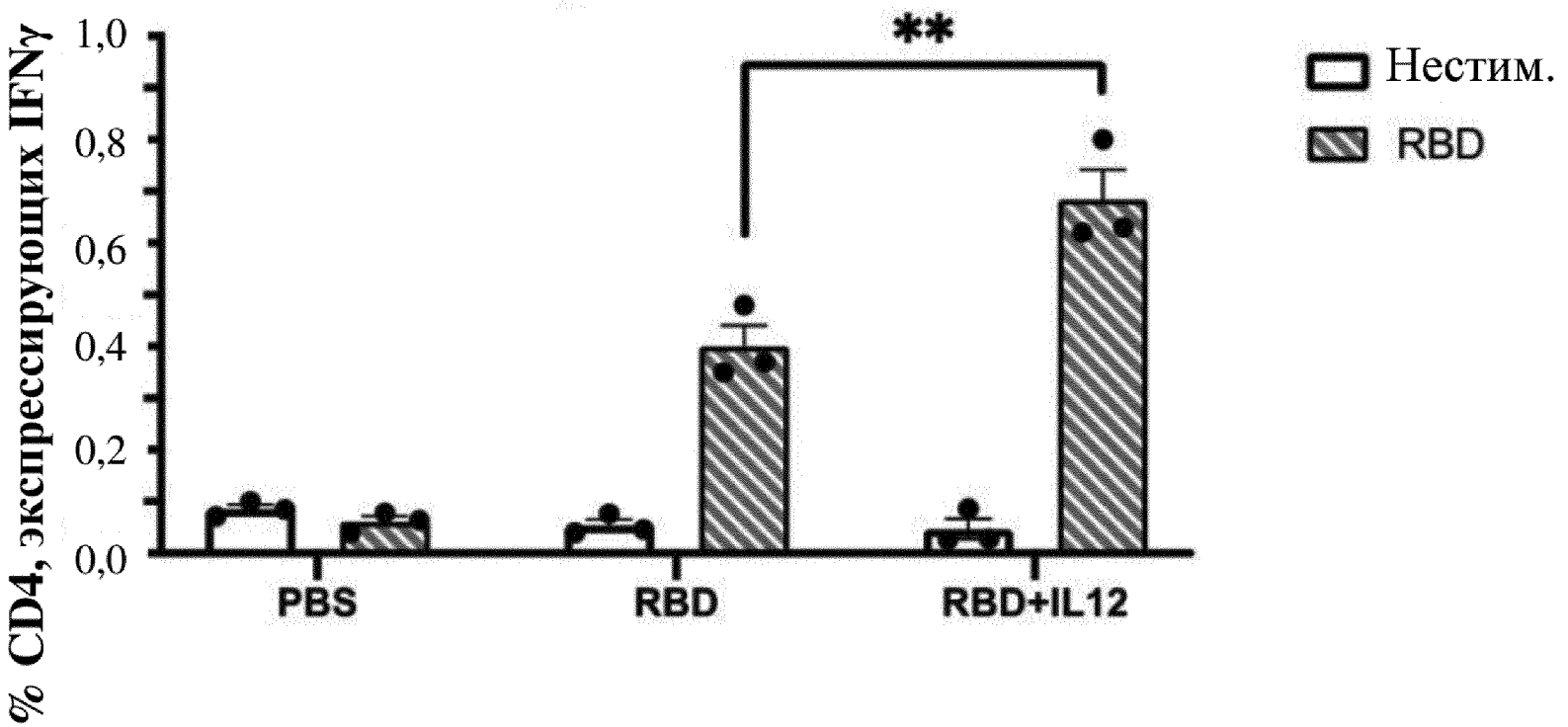
Фиг. 40B

Повышение в сыворотке крови уровня IFNγ демонстрирует, что IL12p70 является функциональным



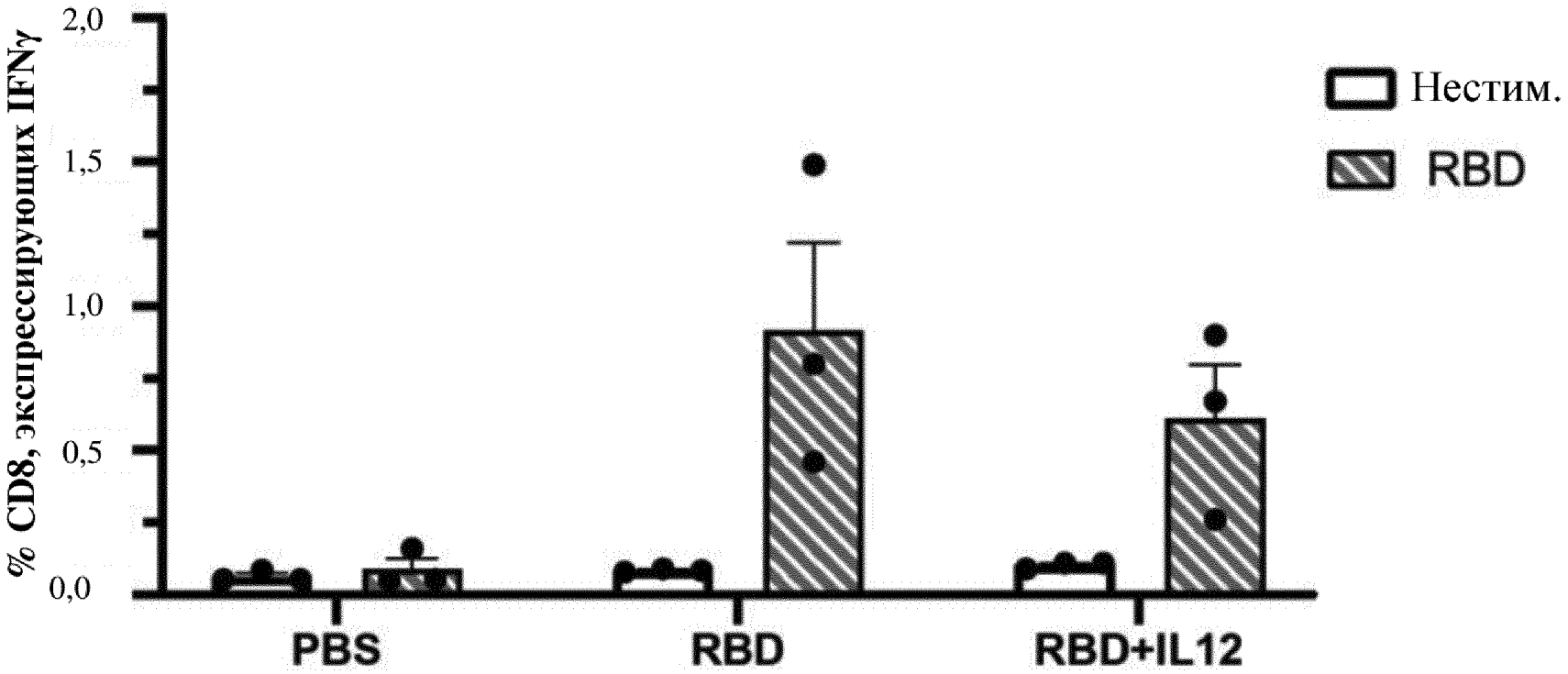
Фиг. 41A

Повышение уровня CD4 Т-клеток, специфических к RBD, с помощью eRNA-IL12



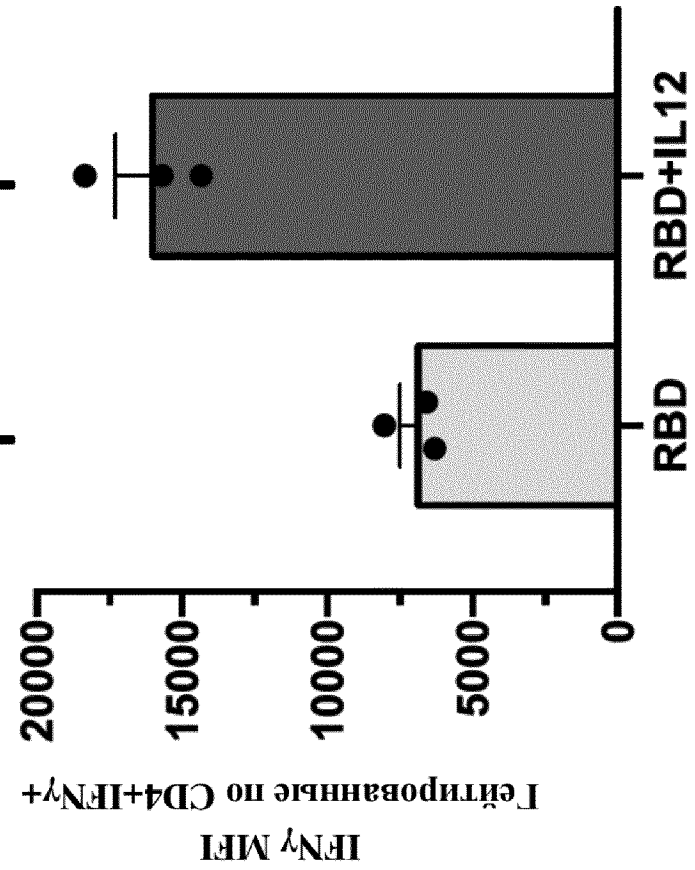
Фиг. 41B

Не наблюдали изменений в отношении CD8 Т-клеток, специфических к RBD



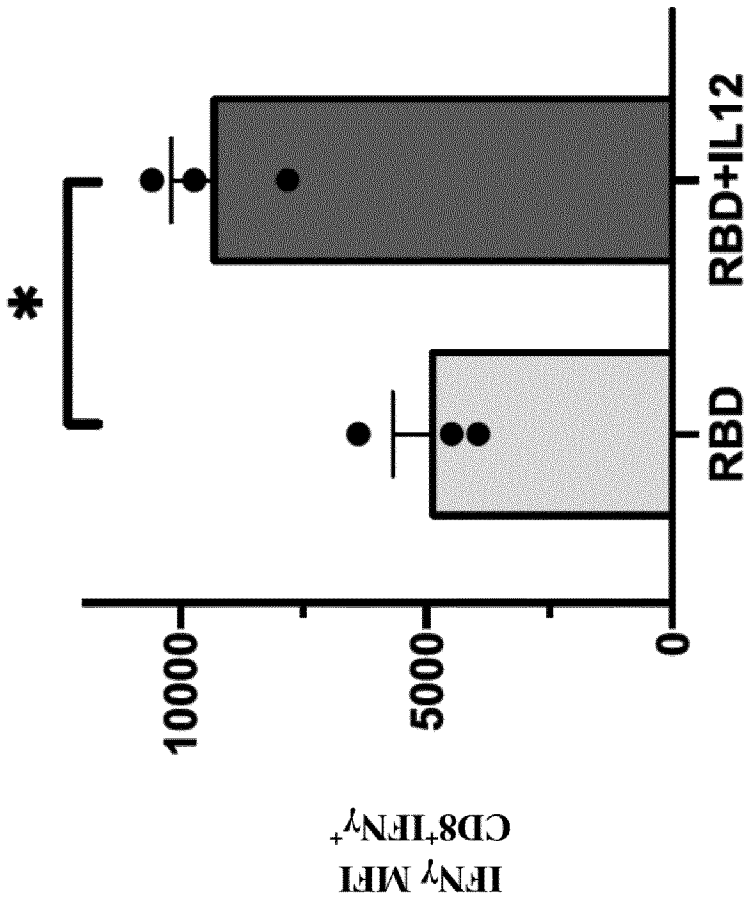
Фиг. 41C

CD4, специфические к RBD, экспрессируют более высокий уровень IFNγ с помощью eRNA-IL12

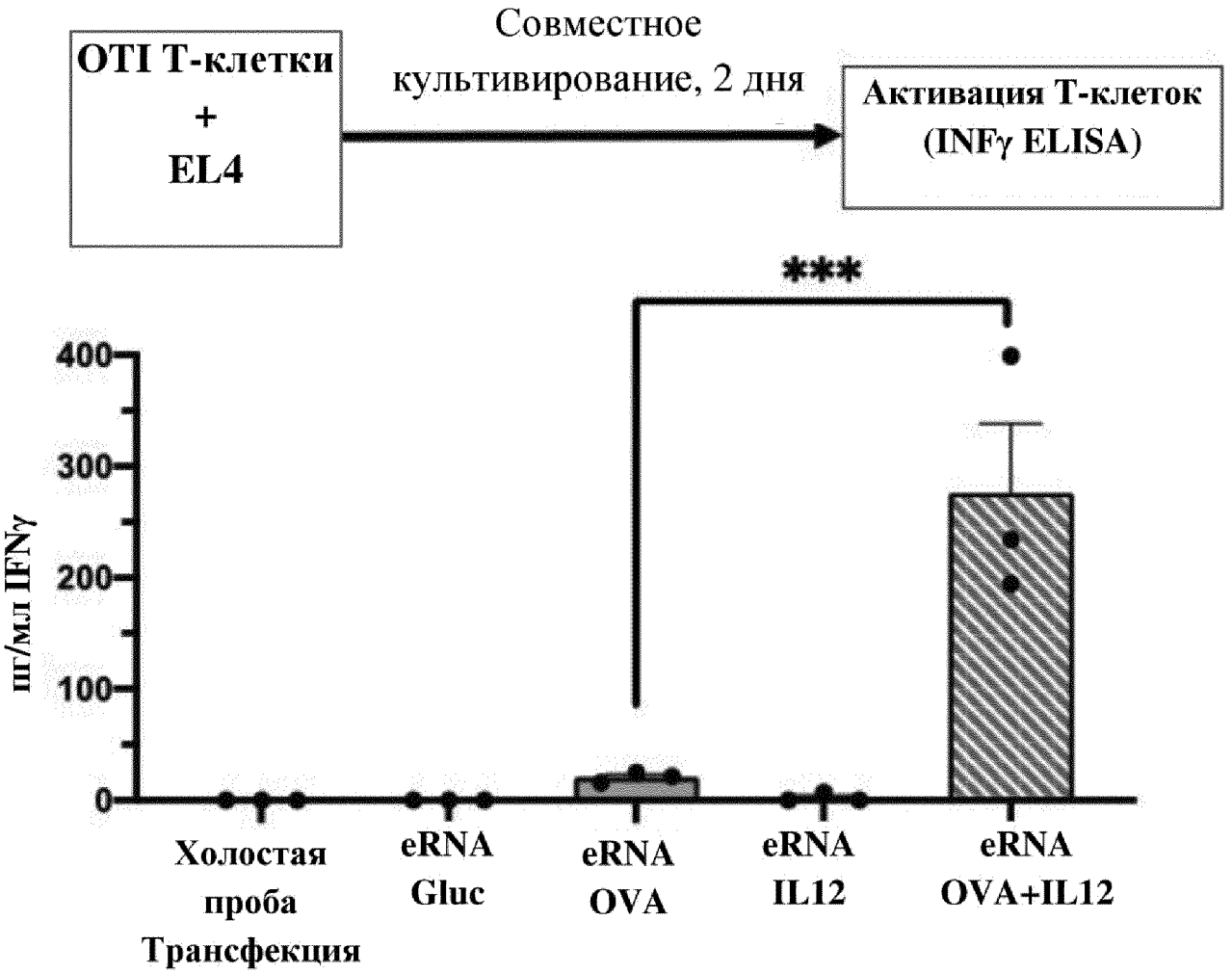


Фиг. 41D

CD4, специфические к RBD, экспрессируют более высокий уровень IFNγ с помощью eRNA-IL12



Фиг. 42


OTI Т-клетки
+
EL4
Совместное
культивирование, 2 дня
Активация Т-клеток
(INFγ ELISA)
***
400
300
200
100
0
пг/мл IFNγ
Холостая
проба
Трансфекция
eRNA
Gluc
eRNA
OVA
eRNA
IL12
eRNA
OVA+IL12