



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021001343-1 A2



(22) Data do Depósito: 24/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 04/05/2021

(54) **Título:** COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO POLIRIBONUCLEOTÍDEOS CIRCULARES E SEUS USOS

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

(30) **Prioridade Unionista:** 19/06/2019 US 62/863,670; 24/07/2018 US 62/702,714; 25/03/2019 US 62/823,569.

(71) **Depositante(es):** FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI, LLC.

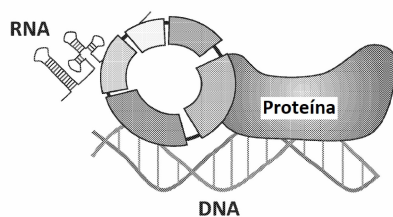
(72) **Inventor(es):** AVAK KAHVEJIAN; NICHOLAS MCCARTNEY PLUGIS; ALEXANDRA SOPHIE DE BOER; MORAG HELEN STEWART; CATHERINE CIFUENTES-ROJAS; KI YOUNG PAEK.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019043272 de 24/07/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/023655 de 30/01/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 25/01/2021

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO POLIRIBONUCLEOTÍDEOS CIRCULARES E SEUS USOS. Esta invenção se relaciona geralmente com composições farmacêuticas e preparações de polirribonucleotídeos circulares e seus usos.



- Motivo de Ligação a RNA Específico de Sequência
- Motivo de Ligação a DNA Específico de Sequência
- Motivo de Ligação Específico de Proteína

**"COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO POLIRIBONUCLEOTÍDEOS CIRCULARES
E SEUS USOS"**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] O presente pedido reivindica prioridade e beneficia dos Pedidos Provisórios U.S. Nos. 62/702,714, depositado a 24 de julho de 2018; 62/823,569, depositado a 25 de março de 2019; e 62/863,670, depositado a 19 de junho de 2019, todo o conteúdo de cada um dos quais é aqui incorporado por referência.

ANTECEDENTES

[0002] Certos polirribonucleotídeos circulares estão ubiquamente presentes em tecidos e células humanos, incluindo tecidos e células de indivíduos saudáveis.

SUMÁRIO

[0003] A presente invenção aqui descrita inclui composições compreendendo polirribonucleotídeos circulares e métodos de seu uso.

[0004] Em alguns aspectos, um método de ligação a um alvo em uma célula compreende o fornecimento de um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao alvo; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o alvo detectável pelo menos 5 dias após a entrega. Em algumas modalidades, o alvo é selecionado do grupo que consiste em uma molécula de ácido nucleico, uma molécula pequena, uma proteína, um carboidrato e um lipídeo. Em algumas modalidades, o alvo é uma proteína de regulação gênica. Em

algumas modalidades, a proteína de regulação gênica é um fator de transcrição. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é uma molécula de DNA ou uma molécula de RNA. Em algumas modalidades, o complexo modula a expressão gênica. Em algumas modalidades, o complexo modula a transcrição direcionada da molécula de DNA, a remodelação epigenética da molécula de DNA ou a degradação da molécula de DNA. Em algumas modalidades, o complexo modula a degradação do alvo, a translocação do alvo ou a transdução do sinal alvo. Em algumas modalidades, a expressão gênica está associada à patogênese de uma doença ou afeção. Em algumas modalidades, o complexo é detectável pelo menos 7, 8, 9 ou 10 dias após a entrega. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução está presente pelo menos cinco dias após a entrega. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução está presente pelo menos 6, 7, 8, 9 ou 10 dias após a entrega. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução é um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução não modificado. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução tem uma estrutura secundária quase de dupla cadeia. Em algumas modalidades, a sequência de aptâmero tem ainda uma estrutura terciária que se liga ao alvo. Em algumas modalidades, a célula é uma célula eucariótica. Em algumas modalidades, a célula eucariótica é uma célula humana.

[0005] Em alguns aspectos, um método de ligação a um fator de transcrição em uma célula compreende o fornecimento de um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução

compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o fator de transcrição e modula a expressão gênica.

[0006] Em alguns aspectos, um método de sequestrar um fator de transcrição em uma célula compreende o fornecimento de um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução sequestra o fator de transcrição ligando-se ao fator de transcrição para formar um complexo na célula. Em algumas modalidades, a viabilidade celular diminui após a formação do complexo.

[0007] Em alguns aspectos, um método de sensibilização de uma célula a um agente citotóxico compreende fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga a um fator de transcrição; e entregar o agente citotóxico e o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o fator de transcrição na célula; sensibilizando assim a célula para o agente citotóxico em comparação com uma célula sem o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução. Em algumas modalidades, a sensibilização da célula ao agente citotóxico resulta em viabilidade celular diminuída após a

distribuição do agente citotóxico e do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução. Em algumas modalidades, a viabilidade celular diminuída é diminuída em 40% ou mais pelo menos dois dias após a entrega do agente citotóxico e do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

[0008] Em alguns aspectos, um método de ligação de uma proteína patogênica em uma célula compreende: fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga à proteína patogênica; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a proteína patogênica para degradar a proteína patogênica.

[0009] Em alguns aspectos, um método de ligação de uma molécula de ácido ribonucleico em uma célula compreende: fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência complementar a uma sequência da molécula de ácido ribonucleico; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula de ácido ribonucleico.

[0010] Em alguns aspectos, um método de ligar a molécula de ácido desoxirribonucleico genômico numa célula compreende fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga à molécula de ácido desoxirribonucleico genômico; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular

incompetente para tradução forma um complexo com a molécula de ácido desoxirribonucleico genômico e modula a expressão do gene.

[0011] Em alguns aspectos, um método de ligação de uma molécula pequena numa célula compreende o fornecimento de um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga a pequenas moléculas; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula pequena e modula um processo celular. Em algumas modalidades, a molécula pequena é um composto orgânico com um peso molecular de não mais do que 900 daltons e modula um processo celular. Em algumas modalidades, a molécula pequena é um fármaco. Em algumas modalidades, a molécula pequena é um fluoróforo. Em algumas modalidades, a molécula pequena é um metabólito.

[0012] Em alguns aspectos, uma composição compreende um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga a um alvo.

[0013] Em alguns aspectos, uma composição farmacêutica compreende um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução que compreende uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao alvo; e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0014] Em alguns aspectos, uma célula compreende o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução conforme descrito neste documento.

[0015] Em alguns aspectos, um método de tratamento de um sujeito em necessidade compreende a administração da composição conforme descrito neste documento ou a composição farmacêutica conforme descrito neste documento.

[0016] Em alguns aspectos, um polinucleotídeo é um polinucleotídeo que codifica o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução conforme descrito neste documento.

[0017] Em alguns aspectos, um método é um método de produção do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução, conforme descrito neste documento.

[0018] Em alguns aspectos, uma composição farmacêutica compreende um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, por exemplo, RNA, DNA, proteína, membrana celular, etc.; e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável; em que o alvo e o polirribonucleotídeo circular formam um complexo e em que o alvo não é um microRNA. Em alguns aspectos, uma composição farmacêutica compreende um polirribonucleotídeo circular compreendendo: um primeiro sítio de ligação que se liga a um primeiro alvo, e um segundo sítio de ligação que se liga a um segundo alvo; e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável; em que o primeiro sítio de ligação é diferente do segundo sítio de ligação e em que o primeiro sítio e o segundo sítio são ambos microRNA. Em algumas modalidades, o sítio de ligação compreende uma sequência de aptâmero. Em algumas modalidades, o primeiro

sítio de ligação compreende uma primeira sequência de aptâmero e o segundo sítio de ligação compreende uma segunda sequência de aptâmero. Em algumas modalidades, a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que liga o alvo. Em algumas modalidades, a primeira sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao primeiro alvo e a segunda sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o sítio de ligação é um primeiro sítio de ligação e o alvo é um primeiro alvo. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a um segundo alvo. Em algumas modalidades, o primeiro alvo compreende um primeiro motivo de ligação a polirribonucleotídeo circular (circRNA). Em algumas modalidades, o segundo alvo compreende um segundo motivo de ligação a polirribonucleotídeo circular (circRNA). Em algumas modalidades, o primeiro alvo, o segundo alvo e o polirribonucleotídeo circular formam um complexo. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo alvos interagem um com o outro. Em algumas modalidades, o complexo modula um processo celular. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo alvos são iguais, e o primeiro e o segundo sítios de ligação ligam diferentes sítios de ligação no primeiro alvo e no segundo alvo. Em algumas modalidades, o primeiro alvo e o segundo alvo são diferentes. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um ou mais sítios de ligação adicionais que se ligam a um terceiro ou mais alvos. Em algumas modalidades, um ou mais alvos são iguais e um ou mais sítios de ligação adicionais ligam diferentes sítios de ligação em um ou mais alvos. Em algumas

modalidades, a formação do complexo modula um processo celular. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modula um processo celular associado ao primeiro ou segundo alvo quando em contato com o primeiro e segundo alvos. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo alvos interagem um com o outro no complexo. Em algumas modalidades, o processo celular está associado à patogênese de uma doença ou afeção. Em algumas modalidades, o processo celular é diferente da tradução do ácido polirribonucleotídeo circular. Em algumas modalidades, o primeiro alvo compreende uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) e o segundo alvo compreende uma proteína. Em algumas modalidades, o complexo modula a transcrição direcionada da molécula de DNA, a remodelação epigenética da molécula de DNA ou a degradação da molécula de DNA. Em algumas modalidades, em que o primeiro alvo compreende uma primeira proteína e o segundo alvo compreende uma segunda proteína. Em algumas modalidades, em que o complexo modula a degradação da primeira proteína, translocação da primeira proteína ou transdução de sinal, ou modula uma função de proteína nativa, inibe ou modula a formação de um complexo formado pela interação direta entre a primeira e a segunda proteínas. Em algumas modalidades, o primeiro alvo ou o segundo alvo é uma ubiquitina ligase. Em algumas modalidades, o primeiro alvo compreende uma primeira molécula de ácido ribonucleico (RNA) e o segundo alvo compreende uma segunda molécula de RNA. Em algumas modalidades, o complexo modula a degradação da primeira molécula de RNA. Em algumas modalidades, o primeiro alvo compreende uma proteína e o segundo alvo compreende uma molécula de RNA. Em algumas modalidades, o complexo modula

a translocação da proteína ou inibe a formação de um complexo formado pela interação direta entre a proteína e a molécula de RNA. Em algumas modalidades, o primeiro alvo é um receptor e o segundo alvo é um substrato do receptor. Em algumas modalidades, o complexo inibe a ativação do receptor.

[0019] Em alguns aspectos, uma composição farmacêutica compreende um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo; e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável; em que o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou com defeito na tradução e em que o alvo não é um microRNA. Em alguns aspectos, uma composição farmacêutica compreende um ácido polirribonucleico circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, em que o alvo compreende um motivo de ligação ao ácido ribonucleico (RNA); e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável; em que o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou com defeito na tradução e em que o alvo é um microRNA. Em algumas modalidades, o sítio de ligação compreende uma sequência de aptâmero com uma estrutura secundária que se liga ao alvo. Em algumas modalidades, o alvo compreende uma molécula de DNA. Em algumas modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interferência da transcrição de uma molécula de DNA. Em algumas modalidades, o alvo compreende uma proteína. Em algumas modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interação da proteína com outras moléculas. Em algumas modalidades, a proteína é um receptor e a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular ativa o receptor. Em algumas modalidades, a proteína é uma primeira enzima, em que o

polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a uma segunda enzima, e em que a ligação da primeira e da segunda enzimas ao polirribonucleotídeo circular modula a atividade enzimática da primeira e da segunda enzimas. Em algumas modalidades, a proteína é uma ubiquitina ligase. Em algumas modalidades, o alvo compreende uma molécula de RNA mensageiro (mRNA). Em algumas modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interferência da tradução da molécula de mRNA. Em algumas modalidades, o alvo compreende um ribossomo. Em algumas modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interferência de um processo de tradução. Em algumas modalidades, o alvo compreende uma molécula de RNA circular. Em algumas modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular sequestra a molécula de RNA circular. Em algumas modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular sequestra a molécula de microRNA.

[0020] Em alguns aspectos, uma composição farmacêutica compreende um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a uma membrana de uma célula (por exemplo, a membrana da parede celular, membrana de organelo, etc), em que a membrana da célula compreende um motivo de ligação de ácido ribonucleico (RNA); e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o sítio de ligação compreende uma sequência de aptâmero com uma estrutura secundária que se liga à membrana da célula (por exemplo, membrana da parede celular, membrana de organelo, etc.). Em algumas

modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a um segundo alvo, em que o segundo alvo compreende um segundo motivo de ligação a RNA. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular se liga à membrana da célula e ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a uma segunda célula alvo, e em que a ligação da célula alvo e da segunda célula alvo ao polirribonucleotídeo circular induz uma mudança conformacional na célula alvo, induzindo assim a transdução de sinal a jusante da célula alvo. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou defeituoso na tradução. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende ainda pelo menos um elemento estrutural selecionado do grupo que consiste em: a) um criptogênico; b) um elemento de *splicing*; c) uma sequência regulatória; d) uma sequência de replicação; e) uma estrutura secundária de cadeia quase dupla ; f) uma estrutura quase helicoidal; e g) uma sequência de expressão. Em algumas modalidades, a estrutura quase helicoidal compreende pelo menos um segmento de RNA de cadeia dupla com pelo menos um segmento de cadeia não dupla. Em algumas modalidades, a estrutura quase helicoidal compreende uma primeira sequência e uma segunda sequência ligadas a uma sequência repetitiva. Em algumas modalidades, o criptogênico compreende um elemento de *splicing*. Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular compreende pelo menos um ácido nucleico modificado. Em algumas modalidades, o pelo menos um ácido nucleico modificado é selecionado do grupo que consiste em 2'-O-metil,

2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido nucleico de 1',5'-anidrohexitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e um 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidito. Em algumas modalidades, o criptogênico compreende pelo menos um ácido nucleico modificado. Em algumas modalidades, o criptogênico compreende um sítio de ligação de proteína. Em algumas modalidades, o criptogênico compreende um sítio de ligação de imunoproteína. Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular tem pelo menos 2x menor imunogenicidade do que uma contraparte sem o criptogênio, conforme avaliado pela expressão, sinalização ou ativação de pelo menos um de RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR e IFN-beta. Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular tem um tamanho de cerca de 20 bases a cerca de 20 kb. Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular é sintetizado através da circularização de um polinucleotídeo linear. Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular é substancialmente resistente à degradação.

[0021] Em alguns aspectos, uma composição farmacêutica, compreende um polirribonucleotídeo circular, que compreende um sítio de ligação que se liga a um alvo, em que o alvo compreende um motivo de ligação a ácido ribonucleico (RNA); e um transportador ou excipiente farmacêuticamente

aceitável, em que o polirribonucleotídeo circular compreende pelo menos um nucleotídeo modificado e uma primeira porção que compreende pelo menos cerca de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 nucleotídeos não modificados contíguos. Em alguns aspectos, uma composição farmacêutica, compreende: um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, em que o alvo compreende um motivo de ligação a ácido ribonucleico (RNA); e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável, em que o polirribonucleotídeo circular compreende pelo menos um nucleotídeo modificado e uma primeira porção que compreende pelo menos cerca de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 nucleotídeos contíguos, e em que a primeira porção carece de pseudouridina ou 5'-metilcitidina. Em algumas modalidades, o sítio de ligação compreende uma sequência de aptâmero com uma estrutura secundária que se liga ao alvo. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma imunogenicidade mais baixa do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma imunogenicidade que é de pelo menos cerca de 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes menor do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente, conforme avaliado por expressão ou sinalização ou ativação de pelo menos um do grupo que consiste de RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR e IFN-beta. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma meia-vida maior do que

um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma meia-vida que é de pelo menos cerca de 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida é medida pela introdução do polirribonucleotídeo circular ou o polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente em uma célula e medindo um nível do polirribonucleotídeo circular introduzido ou polirribonucleotídeo circular correspondente dentro da célula. Em algumas modalidades, o pelo menos um nucleotídeo modificado é selecionado do grupo que consiste em: N(6)metiladenosina (m6A), 5'-metilcitidina e pseudouridina. Em algumas modalidades, o pelo menos um ácido nucleico modificado é selecionado do grupo que consiste em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido nucleico de 1',5'-anidroxitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e um 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidito. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% dos nucleotídeos do polirribonucleotídeo circular são nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, o

polirribonucleotídeo circular compreende um sítio de ligação que se liga a uma proteína, DNA, RNA ou uma célula alvo, consistindo em nucleotídeos não modificados. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um sítio interno de entrada ribossômica (IRES) que consiste em nucleotídeos não modificados. Em algumas modalidades, o sítio de ligação consiste em nucleotídeos não modificados. Em algumas modalidades, o sítio de ligação compreende um IRES que consiste em nucleotídeos não modificados. Em algumas modalidades, a primeira porção compreende um sítio de ligação que se liga a uma proteína, DNA, RNA ou uma célula alvo. Em algumas modalidades, a primeira porção compreende um IRES. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma ou mais sequências de expressão. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma ou mais sequências de expressão e o IRES, e em que o polirribonucleotídeo circular compreende uma 5'-metilcitidina, uma pseudouridina ou uma combinação dos mesmos fora do IRES. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular são configuradas para ter uma maior eficiência de tradução do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular têm uma eficiência de tradução de pelo menos cerca de 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8 , ou 3 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular têm uma maior eficiência de tradução do que um

polirribonucleotídeo circular correspondente tendo uma primeira porção compreendendo um nucleotídeo modificado. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular têm uma maior eficiência de tradução do que um polirribonucleotídeo circular correspondente tendo uma primeira porção compreendendo mais de 10% de nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular têm uma eficiência de tradução que é de pelo menos cerca de 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular correspondente tendo uma primeira porção compreendendo um nucleotídeo modificado. Em algumas modalidades, a eficiência de tradução é medida em uma célula que compreende o polirribonucleotídeo circular ou o polirribonucleotídeo circular correspondente, ou em um sistema de tradução in vitro (por exemplo, lisado de reticulócito de coelho). Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é o polirribonucleotídeo circular de qualquer uma das modalidades divulgadas.

[0022] Em alguns aspectos, um método de tratamento compreende administrar a composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades anteriormente descritas a um sujeito com uma doença ou afeção.

[0023] Em alguns aspectos, um método de produção de uma composição farmacêutica compreende gerar o polirribonucleotídeo circular de qualquer uma das modalidades divulgadas.

[0024] Em alguns aspectos, a composição de qualquer uma das modalidades é formulada em um transportador, por exemplo, membrana ou bicamada lipídica.

[0025] Em alguns aspectos, um método de fazer o polirribonucleotídeo circular de qualquer uma das modalidades descritas compreende circularizar um polirribonucleotídeo linear que tem uma sequência de ácido nucleico tal como o polirribonucleotídeo circular.

[0026] Em alguns aspectos, uma célula manipulada compreende a composição de qualquer uma das modalidades divulgadas.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[0027] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados em este relatório descritivo são aqui incorporados por referência na mesma medida como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como sendo incorporado por referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0028] A patente ou o ficheiro do pedido contém, pelo menos, um desenho executado a cores. Cópias desta patente ou publicação do pedido de patente com desenho(s) a cores serão fornecidas pelo Escritório mediante solicitação e pagamento da taxa necessária. A seguinte descrição detalhada das modalidades da invenção será mais bem entendida quando lida em conjunção com os desenhos anexados. Para o propósito de ilustração da invenção são mostrados nos desenhos modalidades, que são presentemente exemplificadas. Deve ser entendido, no entanto, que a invenção não está limitada à disposição e instrumentalidades precisas das modalidades mostradas nos desenhos.

[0029] **FIG. 1** ilustra um exemplo de um molde molecular de polirribonucleotídeo circular.

[0030] **FIG. 2** ilustra um exemplo de polirribonucleotídeo circular trans-ribozima.

[0031] **FIG. 3** ilustra um esquema da expressão da proteína por um polirribonucleotídeo circular.

[0032] **FIG. 4** ilustra um exemplo de um molde molecular de polirribonucleotídeo circular para lipídeos, tais como membranas.

[0033] **FIG. 5A** ilustra um exemplo de um molde molecular de polirribonucleotídeo circular para DNA.

[0034] **FIG. 5B** ilustra um exemplo de molde molecular de polirribonucleotídeo circular com um motivo de ligação de DNA específico de sequência. O circRNA pode se ligar ao sulco principal do DNA duplex para formar estruturas triplex paralelas ou antiparalelas com base na orientação da terceira cadeia. Estruturas triplex paralelas exemplificativas incluem TA·U, CG·G e CG·C (DNA DNA·RNA). Estruturas triplex antiparalelas exemplificativas incluem TA·A, TA·U e CG·G (DNA DNA·RNA).

[0035] **FIG. 5C** ilustra um exemplo de molde molecular de polirribonucleotídeo circular com um motivo de ligação de DNA específico para uma região intensificadora do gene *DHFR* para interferência com a ligação do fator de transcrição e/ou transcrição de mRNA.

[0036] **FIG. 5D** ilustra um exemplo de molde molecular de polirribonucleotídeo circular com um motivo de ligação de DNA específico para uma região intensificadora do gene *MEG3* para interferência com a ligação do fator de transcrição e/ou transcrição de mRNA.

[0037] **FIG. 5E** ilustra um exemplo de molde molecular de polirribonucleotídeo circular com um motivo de ligação de DNA específico para uma região intensificadora do gene *EPS* para interferência com a ligação do fator de transcrição e/ou transcrição de mRNA.

[0038] **FIG. 6** ilustra um exemplo de um molde molecular de polirribonucleotídeo circular para RNA.

[0039] **FIG. 7A** ilustra um exemplo de molde molecular de polirribonucleotídeo circular para RNAs alvo para sequestrar e/ou degradar RNAs alvo.

[0040] **FIG. 7B** ilustra um exemplo de molde molecular de polirribonucleotídeo circular para RNAs e enzimas que visam os RNAs (por exemplo, enzimas de decapagem que induzem a degradação dos RNAs).

[0041] **FIG. 7C** ilustra um exemplo de molde molecular de polirribonucleotídeo circular para RNA, DNA e proteína (por exemplo, para conduzir a tradução do gene alvo).

[0042] **FIG. 8** ilustra um exemplo de molde molecular de polirribonucleotídeo circular para proteína (por exemplo, FUS/TDP43/ATXN2, PRPF8, GEMIN5, CUG BP1 e LIN28A).

[0043] **FIGs. 9A , 9B e 9C** mostram que os RNAs circulares modificados ligam a maquinaria de tradução de proteínas nas células.

[0044] **FIGs. 10A, 10B, e 10C** mostram que os RNAs circulares modificados têm uma ligação reduzida às proteínas do sistema imunológico, tal como avaliado por ativação de genes imunorelacionados (expressão de MDA5, OAS, e IFN-beta), em comparação com os RNAs circulares não modificados em células.

[0045] **FIG. 11** mostra que RNAs circulares modificados híbridos têm uma imunogenicidade reduzida em comparação com

os RNAs circulares não modificados, tal como avaliado por expressão de RIG-I, MDA5, IFN-beta, e OAS em células.

[0046] FIG. 12 demonstra que um aptâmero de RNA circular exibe aumento da entrega intracelular e ligação melhorada a uma molécula pequena alvo em comparação com um aptâmero linear.

[0047] FIG. 13 ilustra a ligação de um RNA circular contendo um motivo de ligação de proteína a uma proteína alvo.

[0048] FIG. 14 demonstra um conjugado RNA circular -molécula pequena que se liga a uma proteína alvo pela molécula pequena.

[0049] FIG. 15 demonstra a interação de um conjugado de RNA circular-molécula pequena com uma proteína bioativa específica.

[0050] FIG. 16 ilustra um circRNA com dois sítios de ligação que podem atuar como um molde, por exemplo, para formar um complexo com uma enzima (Enz) e um substrato alvo (substrato), o que facilita a modificação (M) do substrato alvo pela enzima.

[0051] FIG. 17 mostra imagens do ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) demonstrando que o RNA com sequências de aptâmero de ligação embaralhado não mostrou afinidade de ligação para a subunidade p50 de NF-kB, enquanto os RNAs lineares e circulares com a sequência de aptâmero de ligação de NF-kB ligada à subunidade p50 com afinidades semelhantes.

[0052] FIG. 18 mostra que o tratamento com RNA circular com a sequência de aptâmero de ligação a NF-kB levou a uma diminuição na viabilidade celular de células A549 em comparação com sua contraparte linear.

[0053] FIG. 19 mostra que o co-tratamento com RNA linear e doxorubicina (dox) diminui a viabilidade celular no dia 2 e o co-tratamento com o aptâmero circular e dox resultou em mais morte celular em ambos os dias 1 e 2 na linha de células de câncer de pulmão A549 resistente a dox.

[0054] FIG. 20 é um esquema que mostra um RNA circular exemplificativo que é entregue nas células e marca uma proteína BRD4 alvo nas células para degradação pelo sistema de ubiquitina.

[0055] FIG. 21 mostra imagens de Western blot e gráfico quantitativo demonstrando que o RNA circular contendo talidomida e pequenas moléculas de JQ1 foi capaz de degradar BRD4 nas células.

[0056] FIG. 22 mostra a fluorescência do aptâmero quando ligado à biotina TO-1 em diferentes pontos de tempo após a entrega do RNA circular (aptâmero contínuo) ou do RNA linear (aptâmero linear) para culturas de células HeLa. As imagens fluorescentes (topo) mostram a fluorescência do aptâmero quando ligado à biotina TO-1 às 6 horas, Dia 1 e Dia 10 após a entrega do RNA circular (aptâmero contínuo) ou do RNA linear (aptâmero linear). Os gráficos (parte inferior) mostram a porcentagem de células fluorescentes nas culturas de células HeLa em 6 horas, Dia 1, Dia 3, Dia 5, Dia 7, Dia 10 e Dia 12 após a entrega do RNA circular (aptâmero contínuo), o RNA linear (aptâmero linear) ou a biotina TO-1 apenas (controle).

[0057] FIG. 23 mostra RNAs circulares ligados a HuR com um motivo de aptâmero de ligação a RNA HuR e a estreptavidina suspensa produziram RNAs com motivos de aptâmero de ligação a RNA em comparação com um RNA circular sem motivo de

aptâmero de ligação, um RNA circular com um motivo de aptâmero de ligação a RNA HuR, e um RNA circular com um motivo de aptâmero de ligação a RNA.

[0058] FIG. 24 mostra RNAs circulares ligados a HuR com o motivo de aptâmero de ligação a DNA HuR e a estreptavidina suspensa produziram RNAs com motivos de aptâmero de ligação a DNA em comparação com um RNA circular sem motivo de aptâmero de ligação, um RNA circular com um motivo de aptâmero de ligação a DNA HuR, e um RNA circular com DNA.

[0059] FIG. 25 mostra a expressão de proteína secretada inferior de RNA circular sem um motivo de ligação HuR em comparação com um RNA circular com 1X motivo de ligação HuR, 2X motivos de ligação HuR e 3X motivos de ligação HuR.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0060] Esta invenção se relaciona geralmente com composições farmacêuticas e preparações de polirribonucleotídeos circulares e seus usos.

[0061] Vários aspectos são descritos abaixo com referência a pedidos exemplo para ilustração. Deve ser entendido que vários detalhes, relacionamentos e métodos específicos são estabelecidos para fornecer um entendimento completo das características descritas neste documento. Um perito na técnica relevante, no entanto, reconhecerá prontamente que as características aqui descritas podem ser praticadas sem um ou mais dos detalhes específicos ou com outros métodos. As características aqui descritas não são limitadas pela ordenação ilustrada de atos ou eventos, pois alguns atos podem ocorrer em ordens diferentes e/ou concomitantemente com outros atos ou eventos. Além disso, nem todos os atos ou eventos ilustrados são necessários para implementar uma

metodologia de acordo com os recursos descritos neste documento.

[0062] A terminologia usada neste documento tem a finalidade de descrever casos particulares apenas e não se destina a ser limitativa. Tal como aqui utilizado, as formas singulares "um" , "uma" e "o/a" pretendem incluir também as formas plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Além disso, na medida em que os termos "incluindo", "inclui", "tendo", "tem", "com" ou variantes dos mesmos são usados na descrição detalhada e/ou nas reivindicações, tais termos se destinam a ser inclusive de uma maneira semelhante ao termo "compreendendo".

Definições

[0063] Como utilizado aqui, o termo "circRNA" ou "RNA circular" ou "polirribonucleotídeo circular" refere-se a um polirribonucleotídeo que forma uma estrutura circular através de ligações covalentes ou não-covalentes.

[0064] Como usado aqui, o termo "criptogênico" se refere a uma sequência de ácido nucleico do polirribonucleotídeo circular que auxilia na redução, escape e/ou evitamento da detecção por uma célula imunitária e/ou reduz a indução de uma resposta imunitária contra o polirribonucleotídeo circular.

[0065] Como usado aqui, o termo "sequência de expressão" se refere a uma sequência de ácido nucleico que codifica um produto, p.ex., um peptídeo ou polipeptídeo, ou um ácido nucleico regulador.

[0066] Como utilizado aqui, o termo "sítio de ligação a imunoproteínas" se refere a uma sequência de nucleotídeos

que se liga a uma imunoproteína e auxilia no mascaramento do polirribonucleotídeo circular como não endógeno.

[0067] Como usado aqui, o termo "ribonucleotídeo modificado" se refere a um nucleotídeo com pelo menos uma modificação no açúcar, na nucleobase ou na ligação internucleosídeos.

[0068] Como usada aqui, a frase "estrutura quase helicoidal" se refere a uma estrutura de ordem superior do polirribonucleotídeo circular, em que pelo menos uma porção do polirribonucleotídeo circular se dobra em uma estrutura helicoidal.

[0069] Como usada aqui, a frase "estrutura secundária de cadeia quase dupla" se refere a uma estrutura de ordem superior do polirribonucleotídeo circular, em que pelo menos uma porção do polirribonucleotídeo circular cria uma cadeia dupla.

[0070] Como utilizado aqui, o termo "sequência reguladora" se refere a uma sequência de ácido nucleico que modifica um produto de expressão .

[0071] Como usado aqui, o termo "sequência de nucleotídeos repetitiva" se refere a uma sequência de ácido nucleico repetitiva dentro de um trecho de DNA ou ao longo de um genoma. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos repetitiva inclui sequências de poli CA ou poli TG. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos repetitiva inclui sequências repetidas na família Alu de íntrons.

[0072] Como usado aqui, o termo "elemento de replicação" se refere a uma sequência e/ou motivos úteis para replicação ou que iniciam a transcrição do polirribonucleotídeo circular.

[0073] Como usado aqui, o termo "sequência de tradução seletiva" se refere a uma sequência de ácido nucleico que

inicia ou ativa seletivamente a tradução de uma sequência de expressão no polirribonucleotídeo circular.

[0074] Como usado aqui, o termo "sequência de degradação seletiva" se refere a uma sequência de ácido nucleico que inicia a tradução de uma sequência de expressão no polirribonucleotídeo circular.

[0075] Como utilizado aqui, o termo "sequência de escalonamento" se refere a uma sequência de nucleotídeos que induz pausa ribossômica durante a tradução. Em algumas modalidades, a sequência escalonada é uma sequência não conservada de aminoácidos com uma forte propensão alfa-helicoidal seguida pela sequência de consenso -D(V/I)ExNPG P, onde x é qualquer aminoácido.

[0076] Como usado aqui, o termo "substancialmente resistente" se refere a um que tenha pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de resistência em comparação com uma referência.

[0077] Como utilizado aqui, o termo "complexo" se refere a uma associação entre, pelo menos, duas porções (por exemplo, químicos ou bioquímicos) que têm uma afinidade para um outro. Por exemplo, pelo menos duas frações são um alvo (por exemplo, uma proteína) e uma molécula de RNA circular.

[0078] "Polipeptídeo" e "proteína" são utilizados alternadamente e se referem a um polímero de dois ou mais aminoácidos ligados por uma ligação covalente (por exemplo, uma ligação amida). Os polipeptídeos aqui descritos podem incluir proteínas de comprimento total (por exemplo, proteínas totalmente processadas), bem como sequências de aminoácidos mais curtas (por exemplo, fragmentos de proteínas de ocorrência natural ou fragmentos de

polipeptídeos sintéticos). Os polipeptídeos podem incluir aminoácidos de ocorrência natural (por exemplo, um dos vinte aminoácidos comumente encontrados em peptídeos sintetizados na natureza, e conhecidos pelas abreviaturas de uma letra A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y e V) e aminoácidos de ocorrência não natural (por exemplo, aminoácidos que não são um dos vinte aminoácidos comumente encontrados em peptídeos sintetizados na natureza, incluindo aminoácidos sintéticos, análogos de aminoácidos e miméticos de aminoácidos).

[0079] Conforme usado neste documento, o termo "sítio de ligação" se refere a uma região do polirribonucleotídeo circular que interage com outra entidade, por exemplo, um composto químico, uma proteína, um ácido nucleico, etc. Um sítio de ligação pode compreender uma sequência de aptâmero.

[0080] Tal como aqui utilizado, o termo "fração de ligação" se refere a uma região de um alvo que pode ser ligada por um sítio de ligação, por exemplo, uma região, domínio, fragmento, epítopo ou porção de um ácido nucleico (por exemplo, RNA, DNA, híbrido de RNA-DNA), composto químico, molécula pequena (por exemplo, fármaco), aptâmero, polipeptídeo, proteína, lipídeo, carboidrato, anticorpo, vírus, partícula de vírus, membrana, complexo de múltiplos componentes, organelo, célula, outras frações celulares, qualquer fragmento dos mesmos e qualquer combinação dos mesmos.

[0081] Como utilizado aqui, o termo "sequência de aptâmero" se refere um oligonucleotídeo de ocorrência não natural ou sintético que especificamente se liga a uma molécula alvo. Tipicamente um aptâmero tem de 20 a 250 nucleotídeos.

Tipicamente, um aptâmero liga-se ao seu alvo através de estrutura secundária em vez de homologia de sequência.

[0082] Como utilizado aqui, o termo "molécula pequena" se refere a um composto orgânico que tem um peso molecular de não mais do que 900 daltons. Uma molécula pequena é capaz de modular um processo celular ou é um fluoróforo.

[0083] Como utilizado aqui, o termo "fração de conjugação" se refere a um nucleotídeo modificado que compreende um grupo funcional, para utilização num método de conjugação.

[0084] Como utilizado aqui, o termo "contraparte linear" se refere a um polirribonucleotídeo tendo a mesma sequência de nucleotídeos e modificações de ácidos nucleicos como um polirribonucleotídeo circular e que tem duas extremidades livres (isto é, a versão não circularizada do polirribonucleotídeo circularizado). Em algumas modalidades, a contraparte linear compreende ainda uma estrutura de proteção 5'. Em algumas modalidades, a contraparte linear compreende ainda uma cauda de poliadenosina. Em algumas modalidades, a contraparte linear compreende ainda uma UTR 3'. Em algumas modalidades, a contraparte linear compreende ainda uma UTR 5'.

Polirribonucleotídeos Circulares

[0085] Polirribonucleotídeos circulares (circRNA) aqui descritos são polirribonucleotídeos que formam uma estrutura contínua através de ligações covalentes ou não-covalentes.

[0086] A presente invenção aqui descrita inclui composições compreendendo circRNA sintético e métodos de seu uso. Devido à estrutura circular, circRNA pode ter melhor estabilidade, meia-vida aumentada, imunogenicidade reduzida e/ou funcionalidade melhorada (por exemplo, de uma função aqui

descrita) em comparação com um RNA linear correspondente. Em algumas modalidades, o RNA circular é detectável por pelo menos 5 dias após a entrega do RNA circular a uma célula. Em algumas modalidades, o RNA circular é detectável por 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias ou 16 dias após a entrega do RNA circular à célula. O RNA circular pode ser detectado usando qualquer técnica conhecida na técnica.

[0087] Em algumas modalidades, circRNA se liga a um ou mais alvos. Em algumas modalidades, um circRNA é um aptâmero circular. Em uma modalidade, um circRNA compreende um ou mais sítios de ligação que se ligam a um ou mais alvos. Em uma modalidade, o circ RNA compreende uma sequência de aptâmero. Em uma modalidade, o circRNA se liga a um alvo de DNA e a um alvo de proteína e, por exemplo, medeia a transcrição. Em outra modalidade, o circRNA traz em conjunto um complexo de proteína e, por exemplo, medeia modificações pós-translacionais ou transdução de sinal. Em outra modalidade, o circRNA liga dois ou mais diferentes alvos, tais como proteínas, e por exemplo, transporta estas proteínas para o citoplasma, ou medeia a degradação de um ou mais dos alvos.

[0088] Em algumas modalidades, circRNA se liga a, pelo menos, um de DNA, RNA, e proteínas e, assim, regulam processos celulares (por exemplo, alterar a expressão de proteína, a expressão gênica modular, modular a sinalização celular, etc.). Em algumas modalidades, o circRNA sintético inclui sítios de ligação para interação com um alvo ou pelo menos uma fração, por exemplo, uma fração de ligação, de

DNA, RNA ou proteínas de escolha para assim competir na ligação com a contraparte endógena.

[0089] Em algumas modalidades, o RNA circular forma um complexo que regula o processo celular (por exemplo, alterar a expressão da proteína, modular a expressão gênica, modular a sinalização celular, etc.). Em algumas modalidades, o RNA circular sensibiliza uma célula a um agente citotóxico (por exemplo, um agente quimioterápico) por ligação a um alvo (por exemplo, um fator de transcrição), o que resulta na redução da viabilidade celular. Por exemplo, a sensibilização da célula ao agente citotóxico resulta na diminuição da viabilidade celular após a entrega do agente citotóxico e do RNA circular. Em algumas modalidades, a viabilidade celular diminuída é diminuída em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%, ou qualquer sua percentagem.

[0090] Em algumas modalidades, o complexo é detectável por pelo menos 5 dias após a entrega do RNA circular à célula. Em algumas modalidades, o complexo é detectável por 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias ou 16 dias após a entrega do RNA circular à célula.

[0091] Em uma modalidade, o circRNA sintético se liga e/ou sequestra miRNAs. Em outra modalidade, o circRNA sintético se liga e/ou sequestra as proteínas. Em outra modalidade, o circRNA sintético se liga e/ou sequestra o mRNA. Em outra modalidade, o circRNA sintético se liga e/ou sequestra ribossomos. Em outra modalidade, o circRNA sintético se liga e/ou sequestra circRNA. Em outra modalidade, o circRNA sintético se liga e/ou sequestra RNA longo não codificante

(lncRNA) ou qualquer outro RNA não codificante, por exemplo, miRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, ncrRNA, siRNA, RNA longo não codificante, shRNA. Além dos sítios de ligação e/ou de sequestro, o circRNA pode incluir um elemento de degradação, que resultará na degradação do RNA e/ou proteína ligados e/ou sequestrados.

[0092] Em uma modalidade, um circRNA compreende um lncRNA ou uma sequência de um lncRNA, por exemplo, um circRNA compreende uma sequência de um lncRNA não circular de ocorrência natural, ou um seu fragmento. Em uma modalidade, um lncRNA ou uma sequência de um lncRNA é circularizada, com ou sem uma sequência espaçadora, para formar um circRNA sintético.

[0093] Em uma modalidade, um circRNA tem actividade de ribozima. Em uma modalidade, um circRNA pode ser usado para atuar como uma ribozima e clivar RNA, DNA, moléculas pequenas ou proteínas patogênicos ou endógenos. Em uma modalidade, um circRNA tem atividade enzimática. Em uma modalidade, circRNA sintético é capaz de reconhecer e clivar especificamente RNA (por exemplo, RNA viral). Em outra modalidade, o circRNA é capaz de reconhecer e clivar proteínas especificamente. Em outra modalidade, o circRNA é capaz de reconhecer e degradar especificamente moléculas pequenas.

[0094] Em uma modalidade, um circRNA é um circRNA imolante ou autoclivável ou clivável. Em uma modalidade, um circRNA pode ser usado para entregar RNA, por exemplo, miRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, ncrRNA, siRNA, RNA longo não codificante, shRNA. Em uma modalidade, o circRNA sintético é feito de microRNAs separados por (1) elementos autocliváveis (por exemplo, cabeça de martelo, elemento de *splicing*), (2) sítios de

recrutamento de clivagem (por exemplo, ADAR), (3) um ligante degradável (por exemplo, glicerol), (4) um ligante químico e/ou (5) uma sequência espaçadora. Em uma outra modalidade, o circRNA sintético é feito de siRNAs separados por (1) elementos autocliváveis (por exemplo, cabeça de martelo, elemento de *splicing*), (2) sítios de recrutamento de clivagem (por exemplo, ADAR), (3) um ligante degradável (por exemplo, glicerol), (4) um ligante químico e/ou (5) uma sequência espaçadora.

[0095] Em uma modalidade, um circRNA é um circRNA competente transcricionalmente/replicação. Este circRNA pode codificar qualquer tipo de RNA. Em uma modalidade, um circRNA sintético tem um miRNA antissenso e um elemento de transcrição. Em uma modalidade, após a transcrição, miRNAs funcionais lineares são gerados a partir de um circRNA. Em uma modalidade, um circRNA é um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

[0096] Em uma modalidade, um circRNA tem um ou mais dos atributos acima em combinação com um elemento de tradução.

[0097] Em algumas modalidades, um circRNA compreende pelo menos um nucleotídeo modificado. Em algumas modalidades, um circRNA compreende pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80% de nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, um circRNA compreende substancialmente todos (por exemplo, mais do que 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% ou cerca de 100%) os nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, um circRNA compreende nucleotídeos modificados e uma porção de nucleotídeos contíguos não modificados, que podem ser referidos como um circRNA modificado híbrido. Uma porção de nucleotídeos contíguos não modificados pode ser um

sítio de ligação não modificado configurado para se ligar a uma proteína, DNA, RNA ou um alvo celular em um circRNA híbrido modificado. Uma porção de nucleotídeos contíguos não modificados pode ser um IRES não modificado em um circRNA híbrido modificado. Em outras modalidades, um circRNA carece de nucleotídeos modificados, que pode ser referido como um circRNA não modificado.

Alvos

[0098] Um circRNA pode compreender, pelo menos, um sítio de ligação para um alvo, por exemplo, por uma fração de ligação de um alvo. Um circRNA pode compreender pelo menos uma sequência de aptâmero que se liga a um alvo. Em algumas modalidades, o circRNA compreende um ou mais sítios de ligação para um ou mais alvos. Os alvos incluem, mas não estão limitados a, ácidos nucleicos (por exemplo, RNAs, DNAs, híbridos de RNA-DNA), pequenas moléculas (por exemplo, fármacos, fluoróforos, metabólitos), aptâmeros, polipeptídeos, proteínas, lipídeos, carboidratos, anticorpos, vírus, partículas de vírus, membranas, complexos de múltiplos componentes, organelos, células, outras frações celulares, quaisquer fragmentos dos mesmos e qualquer combinação dos mesmos. (Ver, por exemplo, Fredriksson *et al.*, (2002) *Nat Biotech* 20:473-77; Gullberg *et al.*, (2004) *PNAS*, 101:8420-24). Por exemplo, um alvo é um RNA de cadeia simples, um RNA de cadeia dupla, um DNA de cadeia simples, um DNA de cadeia dupla, um DNA ou RNA que compreende uma ou mais regiões de cadeia dupla e uma ou mais regiões de cadeia simples, um híbrido de RNA-DNA, uma molécula pequena, um aptâmero, um polipeptídeo, uma proteína, um lipídeo, um carboidrato, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma

mistura de anticorpos, uma partícula de vírus, uma membrana, um complexo de múltiplos componentes, um célula, uma fração celular, qualquer fragmento da mesma ou qualquer sua combinação.

[0099] Em algumas modalidades, um alvo é um polipeptídeo, uma proteína, ou qualquer seu fragmento. Por exemplo, um alvo pode ser um polipeptídeo purificado, um polipeptídeo isolado, um polipeptídeo marcado de fusão, um polipeptídeo anexado ou abrangendo a membrana de uma célula ou um vírus ou vírion, uma proteína citoplasmática, uma proteína intracelular, uma proteína extracelular, uma quinase, uma quinase tirosina , uma quinase serina/treonina, uma fosfatase, uma aromatase, uma fosfodiesterase, uma ciclase, uma helicase, uma protease, uma oxidoredutase, uma redutase, uma transferase, uma hidrolase, uma liase, uma isomerase, uma glicosilase, uma proteína de matriz extracelular, uma ligase, uma ligase ubiquitina, qualquer ligase que afeta a modificação pós-tradução, um transportador de íons, um canal, um poro, uma proteína apoptótica, uma proteína de adesão celular, uma proteína patogênica, uma proteína expressa de forma aberrante, um fator de transcrição, um regulador de transcrição, uma proteína de tradução, um fator epigenético, um regulador epigenético, um regulador de cromatina, uma chaperona, uma proteína secretada, um ligando, um hormônio, uma citocina, uma quimiocina, um proteína nuclear, um receptor, um receptor transmembranar, um receptor quinase tirosina, um receptor acoplado à proteína G, um receptor de fator de crescimento, um receptor nuclear, um receptor de hormônio, um transdutor de sinal, um anticorpo, uma proteína de membrana, uma

proteína de membrana integral, uma proteína de membrana periférica, uma proteína de parede celular, uma proteína globular, uma proteína fibrosa, uma glicoproteína, uma lipoproteína, uma proteína cromossômica, um proto-oncogene, um oncogene, um gene supressor de tumor, qualquer fragmento deste ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um alvo é um polipeptídeo heterólogo. Em algumas modalidades, um alvo é uma proteína sobre-expressada em uma célula usando técnicas moleculares, tal como a transfecção. Em algumas modalidades, um alvo é um polipeptídeo recombinante. Por exemplo, um alvo está em uma amostra produzida a partir de células bacterianas (por exemplo, *E. coli*), leveduras, mamíferos ou de insetos (por exemplo, proteínas sobre-expressas pelos organismos). Em algumas modalidades, um alvo é um polipeptídeo com uma mutação, inserção, deleção ou polimorfismo. Em algumas modalidades, um alvo é um polipeptídeo expresso naturalmente por uma célula (por exemplo, uma célula saudável ou uma célula associada a uma doença ou afeção). Em algumas modalidades, um alvo é um antígeno, tal como um polipeptídeo usado para imunizar um organismo ou para gerar uma resposta imune em um organismo, tal como para a produção de anticorpos.

[0100] Em algumas modalidades, um alvo é um anticorpo. Um anticorpo pode ligar-se especificamente a uma organização espacial e polar particular de outra molécula. Um anticorpo pode ser monoclonal, policlonal ou um anticorpo recombinante e pode ser preparado por técnicas que são bem conhecidas na técnica, tais como imunização de um hospedeiro e coleta de soros (policlonal) ou pela preparação de linhas celulares híbridas contínuas e coleta da proteína secretada

(monoclonal), ou por clonagem e expressão de sequências de nucleotídeos, ou suas versões mutagenizadas, codificando pelo menos as sequências de aminoácidos necessárias para a ligação específica de anticorpos naturais. Um anticorpo de ocorrência natural pode ser uma proteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada pode ser composta por uma região variável da cadeia pesada (V_H) e uma região constante da cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada pode incluir três domínios, C_{H1} , C_{H2} , e C_{H3} . Cada cadeia leve pode compreender uma região variável da cadeia leve (V_L) e uma região constante da cadeia leve. A região constante de cadeia leve pode compreender um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ser, ainda, subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de *framework* (FR). Cada V_H e V_L pode ser composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas a partir da terminação amino até a terminação carbóxi na seguinte ordem: FR_1 , CDR_1 , FR_2 , CDR_2 , FR_3 , CDR_3 e FR_4 . As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos do hospedeiro ou fatores, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema complemento clássico. Os anticorpos podem ser de qualquer isotipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgA_1 e IgA_2), subclasse ou sua versão modificada. Os anticorpos podem incluir uma imunoglobulina completa ou fragmentos desta. Um fragmento de anticorpo pode referir-se a um ou mais

fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de se ligar especificamente a uma fração de ligação, tal como um antígeno. Além disso, agregados, polímeros e conjugados de imunoglobulinas ou seus fragmentos também estão incluídos, desde que a afinidade de ligação para uma molécula particular seja mantida. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; um fragmento $F(ab)_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; um fragmento Fd consistindo nos domínios V_H e C_{H1} ; um fragmento Fv que consiste nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo; um fragmento de anticorpo de domínio único (dAb) (Ward *et al.*, (1989) Nature 341 :544-46), que consiste num domínio V_H ; e um CDR isolado e um fragmento de cadeia simples (scFv) em que as regiões V_L e V_H se emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); Ver, por exemplo, Bird *et al.*, (1988) Science 242:423-26; e Huston *et al.*, (1988) PNAS 85:5879-83). Assim, os fragmentos de anticorpo incluem Fab, $F(ab)_2$, scFv, Fv, dAb e semelhantes. Embora os dois domínios V_L e V_H sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante de peptídeo artificial que permite que sejam feitos como uma única cadeia de proteína. Esses anticorpos de cadeia simples incluem uma ou mais porções de ligação ao antígeno. Um anticorpo pode ser um anticorpo polivalente, por exemplo, anticorpos bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes, hexavalentes, heptavalentes ou octavalentes. Um anticorpo pode ser um anticorpo multiespecífico. Por exemplo,

anticorpos biespecíficos, triespecíficos, tetra-específicos, penta-específicos, hexa-específicos, hepta-específicos ou octa-específicos podem ser gerados, por exemplo, pela união recombinante de uma combinação de quaisquer dois ou mais agentes de ligação ao antígeno (por exemplo, Fab, F(ab)₂, scFv, Fv, IgG). Anticorpos multiespecíficos podem ser usados para trazer dois ou mais alvos em estreita proximidade, por exemplo, maquinaria de degradação e um substrato alvo para degradar, ou uma ubiquitina ligase e um substrato para ubiquitinar. Estes fragmentos de anticorpo podem ser obtidos usando técnicas convencionais conhecidas dos peritos na técnica, e os fragmentos podem ser rastreados quanto à utilidade do mesmo modo que o são anticorpos intatos. Os anticorpos podem ser humanos, humanizados, quiméricos, isolados, de cães, gatos, burros, ovelhas, qualquer planta, animal ou mamífero.

[0101] Em algumas modalidades, um alvo é uma forma polimérica de ribonucleotídeos e/ou desoxirribonucleotídeos (adenina, guanina, timina ou citosina), tal como DNA ou RNA (por exemplo, mRNA). O DNA inclui DNA de cadeia dupla encontrado em moléculas de DNA linear (por exemplo, fragmentos de restrição), vírus, plasmídeos e cromossomos. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo alvo é de cadeia simples, cadeia dupla, pequeno RNA de interferência (siRNA), RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência (tRNA), um cromossomo, um gene, uma sequência genômica não codificadora, DNA genômico (por exemplo, DNA genômico fragmentado), um polinucleotídeo purificado, um polinucleotídeo isolado, um polinucleotídeo hibridizado, um sítio de ligação de fator de transcrição, DNA mitocondrial,

RNA ribossômico, um polinucleotídeo eucariótico, um polinucleotídeo procariótico, um polinucleotídeo sintetizado, um polinucleotídeo ligado, um polinucleotídeo recombinante, um polinucleotídeo contendo um análogo de ácido nucleico, um polinucleotídeo metilado, um polinucleotídeo desmetilado, qualquer fragmento do mesmo ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um alvo é um polinucleotídeo recombinante. Em algumas modalidades, um alvo é um polinucleotídeo heterólogo. Por exemplo, um alvo é um polinucleotídeo produzido a partir de células bacterianas (por exemplo, *E. coli*), leveduras, mamíferos ou de insetos (por exemplo, polinucleotídeos heterólogos aos organismos). Em algumas modalidades, um alvo é um polinucleotídeo com uma mutação, inserção, deleção ou polimorfismo.

[0102] Em algumas modalidades, um alvo é um aptâmero. Um aptâmero é uma molécula de ácido nucleico isolada que se liga com elevada especificidade e afinidade a uma fração de ligação ou molécula alvo, tal como uma proteína. Um aptâmero é uma estrutura tridimensional mantida em determinada(s) conformação(ões) que fornece contatos químicos para ligar especificamente seu determinado alvo. Embora aptâmeros sejam moléculas baseadas em ácido nucleico, há uma diferença fundamental entre aptâmeros e outras moléculas de ácido nucleico, tal como genes e mRNA. Neste último, a estrutura do ácido nucleico codifica a informação através da sua sequência linear de bases e, portanto, essa sequência é importante para a função de armazenamento da informação. Em contraste completo, a função de aptâmero, que é baseada na ligação específica de uma molécula alvo, não é inteiramente

dependente de uma sequência de base linear conservada (uma sequência não codificante), mas sim de uma estrutura secundária/terciária/quaternária particular. Qualquer potencial de codificação que um aptâmero possa possuir é fortuito e não se pensa que desempenhe um papel na ligação de um aptâmero ao seu alvo cognato. Os aptâmeros são diferenciados das sequências de ácido nucleico de ocorrência natural que se ligam a certas proteínas. Estas últimas sequências são sequências de ocorrência natural embutidas no genoma do organismo que se ligam a um subgrupo especializado de proteínas que estão envolvidas na transcrição, tradução e transporte de ácidos nucleicos de ocorrência natural (por exemplo, proteínas de ligação ao ácido nucleico). Aptâmeros, por outro lado, são moléculas de ácido nucleico de ocorrência não natural. Embora os aptâmeros possam ser identificados que se ligam às proteínas de ligação ao ácido nucleico, na maioria dos casos, tais aptâmeros têm pouca ou nenhuma identidade de sequência com as sequências reconhecidas pelas proteínas de ligação ao ácido nucleico em natureza. Mais importante, aptâmeros podem ligar virtualmente qualquer proteína (não apenas proteínas de ligação de ácido nucleico), bem como quase qualquer parceiro de interesse, incluindo pequenas moléculas, carboidratos, peptídeos, etc. Para a maioria dos parceiros, mesmo proteínas, uma sequência de ácido nucleico de ocorrência natural ao qual se liga não existe. Para aqueles parceiros que têm tal sequência, por exemplo, proteínas de ligação de ácido nucleico, tais sequências serão diferentes dos aptâmeros como resultado da afinidade de ligação relativamente baixa usada na natureza em comparação com aptâmeros de ligação forte. Os aptâmeros

são capazes de se ligar especificamente a parceiros selecionados e modulando a atividade do parceiro ou interações de ligação, por exemplo, através da ligação, aptâmeros podem bloquear a sua capacidade de função do parceiro. A propriedade funcional de ligação específica a um parceiro é uma propriedade inerente a um aptâmero. Um aptâmero pode ter 6-35 kDa. Um aptâmero pode ter de 20 a 250 nucleotídeos. Um aptâmero pode ligar seu parceiro com afinidade micromolar a sub-nanomolar e pode discriminar alvos intimamente relacionados (por exemplo, aptâmeros podem ligar seletivamente proteínas relacionadas da mesma família de genes). Em alguns casos, um aptâmero se liga apenas a uma molécula. Em alguns casos, um aptâmero se liga a membros da família de uma molécula de interesse. Um aptâmero, em alguns casos, se liga a várias moléculas diferentes. Os aptâmeros são capazes de usar interações intermoleculares comumente vistas, tais como ligações de hidrogênio, complementaridades eletrostáticas, contatos hidrofóbicos e exclusão estérica para se ligar a um parceiro específico. Os aptâmeros têm uma série de características desejáveis para uso como terapêutico e de diagnóstico, incluindo elevada especificidade e afinidade, baixa imunogenicidade, eficácia biológica e excelentes propriedades farmacocinéticas. Um aptâmero pode compreender uma estrutura de haste e alça molecular formada a partir da hibridização de polinucleotídeos complementares que estão ligados covalentemente (por exemplo, uma estrutura de alça em grampo). A haste compreende os polinucleotídeos hibridizados e a alça é a região que liga covalentemente os dois polinucleotídeos complementares. Um aptâmero pode ser um

ácido ribonucleico linear (por exemplo, aptâmero linear) compreendendo uma sequência de aptâmero ou um ácido polirribonucleico circular compreendendo uma sequência de aptâmero (por exemplo, um aptâmero circular).

[0103] Em algumas modalidades, um alvo é uma molécula pequena. Por exemplo, uma molécula pequena pode ser uma molécula macrocíclica, um inibidor, um fármaco ou composto químico. Em algumas modalidades, uma molécula pequena não contém mais do que cinco doadores de ligações de hidrogênio. Em algumas modalidades, uma molécula pequena não contém mais do que dez aceitadores de ligações de hidrogênio. Em algumas modalidades, uma molécula pequena tem um peso molecular de 500 Daltons ou menos. Em algumas modalidades, uma molécula pequena tem um peso molecular de cerca de 180 a 500 Daltons. Em algumas modalidades, uma molécula pequena contém um coeficiente de partição octanol-água $\log P$ de não mais do que cinco. Em algumas modalidades, uma molécula pequena tem um coeficiente de partição $\log P$ de -0,4 a 5,6. Em algumas modalidades, uma molécula pequena tem uma refratividade molar de 40 a 130. Em algumas modalidades, uma molécula pequena contém de cerca de 20 a cerca de 70 átomos. Em algumas modalidades, uma molécula pequena tem uma área de superfície polar de 140 Angstroms² ou menos.

[0104] Em algumas modalidades, um alvo é uma célula. Por exemplo, um alvo é uma célula intacta, uma célula tratada com um composto (por exemplo, um fármaco), uma célula fixa, uma célula lisada ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, um alvo é uma única célula. Em algumas modalidades, um alvo é uma pluralidade de células.

[0105] Em algumas modalidades, circRNA compreende um sítio de ligação a um único alvo ou uma pluralidade de (por exemplo, dois ou mais) alvos. Em uma modalidade, o circRNA único compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais sítios de ligação diferentes para um único alvo. Em uma modalidade, o circRNA único compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais dos mesmos sítios de ligação para um único alvo. Em uma modalidade, o circRNA único compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais sítios de ligação diferentes para um ou mais alvos diferentes. Em uma modalidade, dois ou mais alvos estão em uma amostra, tal como uma mistura ou biblioteca de alvos, e a amostra compreende circRNA compreendendo dois ou mais sítios de ligação que se ligam a dois ou mais alvos.

[0106] Em algumas modalidades, um único alvo ou uma pluralidade de (por exemplo, dois ou mais) alvos têm uma pluralidade de frações de ligação. Em uma modalidade, o único alvo pode ter 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais frações de ligação. Em uma modalidade, dois ou mais alvos estão em uma amostra, tal como uma mistura ou biblioteca de alvos, e a amostra compreende duas ou mais frações de ligação. Em algumas modalidades, um único alvo ou uma pluralidade de alvos compreende uma pluralidade de diferentes frações de ligação. Por exemplo, uma pluralidade pode incluir pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000, 20.000, 25.000 ou 30.000 frações de ligação.

[0107] Um alvo pode compreender uma pluralidade de frações de ligação compreendendo pelo menos 2 frações de ligação

diferentes. Por exemplo, uma fração de ligação pode compreender uma pluralidade de frações de ligação compreendendo pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000, 20.000, 21.000, 22.000, 23.000, 24.000 ou 25.000 frações de ligação diferentes.

Sítios de Ligação e Frações de Ligação

[0108] Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação. Um sítio de ligação pode compreender uma sequência de aptâmero. Em alguns casos, um circRNA compreende pelo menos dois sítios de ligação. Por exemplo, um circRNA pode compreender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais sítios de ligação. Em algumas modalidades, o circRNA aqui descrito é um molde molecular que liga um ou mais alvos, ou uma ou mais frações de ligação de um ou mais alvos. Cada alvo pode ser, mas não está limitado a, um diferente ou os mesmos ácidos nucleicos (por exemplo, RNAs, DNAs, híbridos de RNA-DNA), pequenas moléculas (por exemplo, fármacos), aptâmeros, polipeptídeos, proteínas, lipídeos, carboidratos, anticorpos, vírus, partículas de vírus, membranas, complexos de múltiplos componentes, células, frações celulares, quaisquer fragmentos dos mesmos e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um ou mais sítios de ligação se ligam ao mesmo alvo. Em algumas modalidades, um ou mais sítios de ligação se ligam a uma ou mais frações de ligação do mesmo alvo. Em algumas modalidades, um ou mais sítios de ligação se ligam a um ou

mais alvos diferentes. Em algumas modalidades, um ou mais sítios de ligação se ligam a uma ou mais frações de ligação de diferentes alvos. Em algumas modalidades, um circRNA atua como um molde para um ou mais alvos de ligação. Em algumas modalidades, um circRNA age como um suporte para uma ou mais porções de ligação de um ou mais alvos. Em algumas modalidades, um circRNA modula processos celulares ligando-se especificamente a um ou mais um ou mais alvos. Em algumas modalidades, um circRNA modula processos celulares por se ligar especificamente a uma ou mais frações de ligação de um ou mais alvos. Em algumas modalidades, um circRNA modula processos celulares ligando-se especificamente a um ou mais alvos. Em algumas modalidades, um circRNA aqui descrito inclui sítios de ligação para um ou mais alvos específicos de interesse. Em algumas modalidades, o circRNA inclui vários sítios de ligação ou uma combinação de sítios de ligação para cada alvo de interesse. Em algumas modalidades, o circRNA inclui vários sítios de ligação ou uma combinação de sítios de ligação para cada fração de ligação de interesse. Por exemplo, um circRNA pode incluir um ou mais sítios de ligação para um polipeptídeo alvo. Em algumas modalidades, um circRNA inclui um ou mais sítios de ligação de um alvo polinucleotídico, tal como DNA ou RNA, um mRNA alvo, um rRNA alvo, um alvo tRNA, ou um alvo de DNA genômico.

[0109] Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para um DNA de cadeia simples. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para DNA de cadeia dupla. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para um anticorpo. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma partícula de vírus.

Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma molécula pequena. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação que se liga em ou sobre uma célula. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para um híbrido de RNA-DNA. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para um polinucleotídeo metilado. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para um polinucleotídeo não metilado. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para um aptâmero. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para um polipeptídeo. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para um polipeptídeo, uma proteína, um fragmento de proteína, uma proteína marcada, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma molécula pequena, uma partícula de vírus (por exemplo, uma partícula de vírus compreendendo uma proteína transmembranar), ou uma célula. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um DNA de cadeia simples. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um DNA de cadeia dupla. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um anticorpo. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em uma partícula de vírus. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em uma molécula pequena. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em ou sobre uma célula. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um híbrido de RNA-DNA. Em alguns casos,

um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um polinucleotídeo metilado. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um polinucleotídeo não metilado. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um aptâmero. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um polipeptídeo. Em alguns casos, um circRNA compreende um sítio de ligação para uma fração de ligação em um polipeptídeo, uma proteína, um fragmento de proteína, uma proteína marcada, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma molécula pequena, uma partícula de vírus (por exemplo, uma partícula de vírus que compreende uma proteína transmembranar) ou uma célula.

[0110] Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a uma porção de um alvo que compreende pelo menos duas ligações amida. Em alguns casos, um sítio de ligação não se liga a uma porção de um alvo que compreende uma ligação fosfodiéster. Em alguns casos, uma parte do alvo não é DNA ou RNA. Em alguns casos, uma fração de ligação compreende pelo menos duas ligações amida. Em alguns casos, uma fração de ligação não compreende uma ligação fosfodiéster. Em alguns casos, uma fração de ligação não é DNA ou RNA.

[0111] Os circRNAs fornecidos neste documento podem incluir um ou mais sítios de ligação para frações de ligação em um complexo. Os circRNAs fornecidos neste documento podem incluir um ou mais sítios de ligação para que os alvos formem um complexo. Por exemplo, os circRNAs fornecidos neste documento podem atuar como uma estrutura para formar um complexo entre um circRNA e um alvo. Em algumas modalidades,

um circRNA forma um complexo com um único alvo. Em algumas modalidades, um circRNA forma um complexo com dois alvos. Em algumas modalidades, um circRNA forma um complexo com três alvos. Em algumas modalidades, um circRNA forma um complexo com quatro alvos. Em algumas modalidades, um circRNA forma um complexo com cinco ou mais alvos. Em algumas modalidades, um circRNA forma um complexo com um complexo de dois ou mais alvos. Em algumas modalidades, um circRNA forma um complexo com um complexo de três ou mais alvos. Em algumas modalidades, dois ou mais circRNAs formam um complexo com um único alvo. Em algumas modalidades, dois ou mais circRNAs formam um complexo com dois ou mais alvos. Em algumas modalidades, um primeiro circRNA forma um complexo com uma primeira fração de ligação de um primeiro alvo e uma segunda fração de ligação diferente de um segundo alvo. Em algumas modalidades, um primeiro circRNA forma um complexo com uma primeira fração de ligação de um primeiro alvo e um segundo circRNA forma um complexo com uma segunda fração de ligação de um segundo alvo.

[0112] Em algumas modalidades, um circRNA pode incluir um sítio de ligação para um ou mais complexos anticorpo-polipeptídeo, complexos polipeptídeo-polipeptídeo, complexos polipeptídeo-DNA, complexos polipeptídeo-RNA, complexos polipeptídeo-aptâmero, complexos partícula de vírus-anticorpo, complexos de partícula de vírus-polipeptídeo, complexos de partícula de vírus-DNA, complexos de partícula de vírus-RNA, complexos de partícula de vírus-aptâmero, complexos de célula-anticorpo, complexos de célula-polipeptídeo, complexos de célula-DNA, complexos de célula-RNA, complexos de célula-aptâmero, complexos de

molécula pequena-polipeptídicos, complexos de molécula pequena-DNA, complexos de molécula pequena-aptâmero, complexos molécula pequena-célula, complexos de partícula de vírus-molécula pequena e suas combinações.

[0113] Em algumas modalidades, um circRNA pode incluir um sítio de ligação para uma ou mais frações de ligação em um ou mais complexos anticorpo-polipeptídeo, complexos polipeptídeo-polipeptídeo, complexos polipeptídeo-DNA, complexos polipeptídeo-RNA, complexos polipeptídeo-aptâmero, complexos partícula de vírus-anticorpo, complexos de partícula de vírus-polipeptídeo, complexos de partícula de vírus-DNA, complexos de partícula de vírus-RNA, complexos de partícula de vírus-aptâmero, complexos de célula-anticorpo, complexos de célula-polipeptídeo, complexos de célula-DNA, complexos de célula-RNA, complexos de célula-aptâmero, complexos de molécula pequena-polipeptídicos, complexos de molécula pequena-DNA, complexos de molécula pequena-aptâmero, complexos molécula pequena-célula, complexos de partícula de vírus-molécula pequena e suas combinações.

[0114] Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a um polipeptídeo, proteína, ou fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um polipeptídeo, proteína ou fragmento deste de um alvo. Por exemplo, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um polipeptídeo isolado, um polipeptídeo de uma célula, um polipeptídeo purificado ou um polipeptídeo recombinante. Por exemplo, um sítio de ligação se liga a um domínio, um

fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um anticorpo ou fragmento do mesmo. Por exemplo, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um fator de transcrição. Por exemplo, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um receptor. Por exemplo, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um receptor transmembranar. Os sítios de ligação podem se ligar a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de polipeptídeos isolados, purificados e/ou recombinantes. Os sítios de ligação podem se ligar a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma mistura de analitos (por exemplo, um lisado). Por exemplo, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma pluralidade de células ou de um lisado de uma única célula. Um sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação de um alvo. Em alguns casos, uma fração de ligação está em um polipeptídeo, proteína ou fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, uma fração de ligação compreende um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um polipeptídeo, proteína ou fragmento do mesmo. Por exemplo, uma fração de ligação compreende um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um polipeptídeo isolado, um polipeptídeo de uma célula, um polipeptídeo purificado ou um polipeptídeo recombinante. Por exemplo, uma fração de ligação compreende um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um anticorpo ou fragmento do mesmo. Por exemplo, uma fração de ligação

compreende um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um fator de transcrição. Por exemplo, uma fração de ligação compreende um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um receptor. Por exemplo, uma fração de ligação compreende um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um receptor transmembranar. As frações de ligação podem ser em ou compreendem um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de polipeptídeos isolados, purificados e/ou recombinantes. As frações de ligação incluem frações de ligação em ou um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma mistura de analitos (por exemplo, um lisado). Por exemplo, as frações de ligação são em ou compreendem um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma pluralidade de células ou de um lisado de uma única célula.

[0115] Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região, ou uma porção de um composto químico (por exemplo, molécula pequena). Por exemplo, uma ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um fármaco. Por exemplo, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um composto. Por exemplo, uma porção de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um composto orgânico. Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma molécula pequena com um peso molecular de 900 Daltons ou menos. Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região

ou uma porção de uma molécula pequena com um peso molecular de 500 Daltons ou mais. A porção da molécula pequena à qual o sítio de ligação se liga pode ser obtida, por exemplo, a partir de uma biblioteca de moléculas de ocorrência natural ou sintética, incluindo uma biblioteca de compostos produzidos por meios combinatórios, isto é, uma biblioteca combinatória de diversidade de compostos. Bibliotecas combinatórias, bem como métodos para a sua produção e rastreamento, são conhecidos na técnica e descritos em: US 5,741,713; 5,734,018; 5,731,423; 5,721,099; 5,708,153; 5,698,673; 5,688,997; 5,688,696; 5,684,711; 5,641,862; 5,639,603; 5,593,853; 5,574,656; 5,571,698; 5,565,324; 5,549,974; 5,545,568; 5,541,061; 5,525,735; 5,463,564; 5,440,016; 5,438,119; 5,223,409, cujas divulgações são aqui incorporadas por referência. Um sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação de uma molécula pequena. Em alguns casos, uma fração de ligação está em ou compreende um domínio, um fragmento, um epítipo, uma região ou uma porção de uma molécula pequena. Por exemplo, uma fração de ligação está em ou compreende um domínio, um fragmento, um epítipo, uma região ou uma porção de um fármaco. Por exemplo, uma fração de ligação está em ou compreende um domínio, um fragmento, um epítipo, uma região ou uma porção de um composto. Por exemplo, uma fração de ligação está em ou compreende um domínio, um fragmento, um epítipo, uma região ou uma porção de um composto orgânico. Em alguns casos, uma fração de ligação está em ou compreende um domínio, um fragmento, um epítipo, uma região ou uma porção de uma molécula pequena com um peso molecular de 900 Daltons ou menos. Em alguns casos, uma fração de ligação está ou

compreende um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma molécula pequena com um peso molecular de 500 Daltons ou mais. As frações de ligação podem ser obtidas, por exemplo, a partir de uma biblioteca de moléculas de ocorrência natural ou sintética, incluindo uma biblioteca de compostos produzidos por meios combinatórios, isto é, uma biblioteca combinatória de diversidade de compostos. Bibliotecas combinatórias, bem como métodos para a sua produção e rastreamento, são conhecidos na técnica e descritos em: US 5,741,713; 5,734,018; 5,731,423; 5,721,099; 5,708,153; 5,698,673; 5,688,997; 5,688,696; 5,684,711; 5,641,862; 5,639,603; 5,593,853; 5,574,656; 5,571,698; 5,565,324; 5,549,974; 5,545,568; 5,541,061; 5,525,735; 5,463,564; 5,440,016; 5,438,119; 5,223,409, cujas divulgações são aqui incorporadas por referência.

[0116] Um sítio de ligação pode se ligar a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região, ou uma porção de um membro de um par de ligação específico (por exemplo, um ligando). Um sítio de ligação pode se ligar a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção monovalente (monoepitópica) ou polivalente (poliepitópica). Um sítio de ligação pode se ligar a uma porção antigênica ou haptênica de um alvo. Um sítio de ligação pode se ligar a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma única molécula ou uma pluralidade de moléculas que compartilham pelo menos um epítopo comum ou sítio determinante. Um sítio de ligação pode se ligar a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma parte de uma célula (por exemplo, uma célula de bactéria, uma célula vegetal ou uma célula animal). Um sítio de ligação

pode se ligar a um alvo que está em um ambiente natural (por exemplo, tecido), uma célula em cultura ou um microorganismo (por exemplo, uma bactéria, fungo, protozoário ou vírus) ou uma célula lisada. Um sítio de ligação pode se ligar a uma porção de um alvo que é modificado (por exemplo, quimicamente), para fornecer um ou mais sítios de ligação adicionais, tais como, mas não se limitando a, um corante (por exemplo, um corante fluorescente), uma porção modificadora de polipeptídeo tal como um grupo fosfato, um grupo hidrato de carbono e semelhantes, ou uma porção modificadora de polinucleotídeo tal como um grupo metila. Um sítio de ligação pode se ligar a uma porção de ligação de um membro de um par de ligação específico. Uma fração de ligação pode estar em ou compreender um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um membro de um par de ligação específico (por exemplo, um ligante). Uma fração de ligação pode estar em ou compreender um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção monovalente (monoepitópica) ou polivalente (poliepitópica). Uma fração de ligação pode ser antigênica ou haptênica. Uma fração de ligação pode estar em ou compreender um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma única molécula ou uma pluralidade de moléculas que compartilham pelo menos um epítopo comum ou sítio determinante. Uma fração de ligação pode estar em ou compreender um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma parte de uma célula (por exemplo, uma célula de bactéria, uma célula vegetal ou uma célula animal). Uma fração de ligação pode estar em um ambiente natural (por exemplo, tecido), uma célula em cultura ou um microorganismo (por exemplo, uma

bactéria, fungo, protozoário ou vírus) ou uma célula lisada. Uma fração de ligação pode ser modificada (por exemplo, quimicamente), para fornecer um ou mais sítios de ligação adicionais, tais como, mas não se limitando a, um corante (por exemplo, um corante fluorescente), uma porção modificadora de polipeptídeo tal como um grupo fosfato, um grupo hidrato de carbono e semelhantes, ou uma porção modificadora de polinucleotídeo tal como um grupo metila.

[0117] Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma molécula encontrada em uma amostra de um hospedeiro. Um sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação de uma molécula encontrada em uma amostra de um hospedeiro. Em alguns casos, uma fração de ligação está em ou compreende um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma molécula encontrada em uma amostra de um hospedeiro. Uma amostra de um hospedeiro inclui um fluido corporal (por exemplo, urina, sangue, plasma, soro, saliva, sêmen, fezes, expectoração, fluido espinhal cerebral, lágrimas, muco e semelhantes). Uma amostra pode ser examinada diretamente ou pode ser pré-tratada para tornar uma fração de ligação mais facilmente detectável. As amostras incluem uma quantidade de uma substância de um ser vivo ou de outros seres vivos. Uma amostra pode ser natural, recombinante, sintética ou não natural. Um sítio de ligação pode se ligar a qualquer um dos acima que é expresso a partir de uma célula naturalmente ou de forma recombinante, em um lisado de célula ou meio de cultura de células, uma amostra traduzida *in vitro* ou uma imunoprecipitação de uma amostra (por exemplo, um lisado de células). Uma fração de ligação pode ser qualquer uma das

acima que é expressa a partir de uma célula naturalmente ou de forma recombinante, em um lisado celular ou meio de cultura de células, uma amostra traduzida *in vitro* ou uma imunoprecipitação de uma amostra (por exemplo, um lisado celular).

[0118] Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a um alvo expresso em um sistema livre de células ou *in vitro*. Por exemplo, um sítio de ligação se liga a um alvo em um extrato celular. Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a um alvo em um extrato celular com um modelo de DNA e reagentes para transcrição e tradução. Um sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação de um alvo expresso em um sistema livre de células ou *in vitro*. Em alguns casos, uma fração de ligação de um alvo é expressa em um sistema livre de células ou *in vitro*. Por exemplo, uma fração de ligação de um alvo está em um extrato celular. Em alguns casos, uma fração de ligação de um alvo está em um extrato celular com um molde de DNA e reagentes para transcrição e tradução. Fontes exemplificativas de extratos celulares que podem ser usados incluem germe de trigo, *Escherichia coli*, reticulócito de coelho, hipertermófilos, hibridomas, oócitos de *Xenopus*, células de inseto e células de mamíferos (por exemplo, células humanas). Métodos isentos de células exemplificativos que podem ser usados para expressar polipeptídeos alvo (por exemplo, para produzir polipeptídeos alvo em uma matriz) incluem matrizes de proteínas *in situ* (PISA), técnica de *spotting* múltiplo (MIST), tradução de mRNA automontado, matriz de proteína programável de ácido nucleico (NAPPA), nanopço NAPPA, matriz de proteína para matriz de DNA (DAPA), DAPA livre de membrana, cópia de

nanopoço e impressão de μ IP-microintaglio e cópia de micromatriz de pMAC- proteína (Ver Kilb *et al.*, *Eng. Life Sci.* 2014, 14, 352-364).

[0119] Em alguns casos, o sítio de ligação se liga a um alvo que é sintetizado *in situ* (por exemplo, sobre um substrato sólido, de uma matriz) a partir de um molde de DNA. Um sítio de ligação pode ligar-se à fração de ligação de um alvo que é sintetizado *in situ*. Em alguns casos, uma fração de ligação de um alvo é sintetizada *in situ* (por exemplo, em um substrato sólido de uma matriz) a partir de um molde de DNA. Em alguns casos, uma pluralidade de frações de ligação é sintetizada *in situ* a partir de uma pluralidade de modelos de DNA correspondentes em paralelo ou em uma única reação. Métodos exemplificativos para a expressão de polipeptídeo alvo *in situ* incluem aqueles descritos em Stevens, *Structure* 8(9): R177-R185 (2000); Katzen *et al.*, *Trends Biotechnol.* 23(3):150-6. (2005); He *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 19(1):4-9. (2008); Ramachandran *et al.*, *Science* 305(5680):86-90. (2004); He *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 29(15):E73-3 (2001); Angenendt *et al.*, *Mol. Cell Proteomics* 5(9): 1658-66 (2006); Tao *et al.*, *Nat Biotechnol* 24(10):1253-4 (2006); Angenendt *et al.*, *Anal. Chem.* 76(7):1844-9 (2004); Kinpara *et al.*, *J. Biochem.* 136(2):149-54 (2004); Takulapalli *et al.*, *J. Proteome Res.* 11(8):4382-91 (2012); He *et al.*, *Nat. Methods* 5(2):175-7 (2008); Chatterjee e J. LaBaer, *Curr Opin Biotech* 17(4):334-336 (2006); He e Wang, *Biomol Eng* 24(4):375-80 (2007); e He e Taussig, *J. Immunol. Methods* 274(1-2):265-70 (2003).

[0120] Em alguns casos, um sítio de ligação liga-se a um alvo de ácido nucleico compreendendo um alcance de pelo menos

6 nucleotídeos, por exemplo, menos de 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, ou 100 nucleotídeos. Em alguns casos, um sítio de ligação liga-se a um alvo de proteína compreendendo uma extensão contígua de nucleotídeos. Em alguns casos, um sítio de ligação liga-se a um alvo de proteína compreendendo uma extensão não contígua de nucleotídeos. Em alguns casos, um sítio de ligação liga-se a um alvo de ácido nucleico compreendendo um sítio de uma mutação ou mutação funcional, incluindo uma deleção, adição, troca ou truncamento dos nucleotídeos numa sequência de ácido nucleico. Um sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação de um alvo de ácido nucleico. Em alguns casos, uma fração de ligação de um alvo de ácido nucleico compreende um alcance de pelo menos 6 nucleotídeos, por exemplo, pelo menos 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ou 100 nucleotídeos. Em alguns casos, uma fração de ligação de uma proteína alvo compreende uma extensão contígua de nucleotídeos. Em alguns casos, uma fração de ligação de uma proteína alvo compreende uma extensão não contígua de nucleotídeos. Em alguns casos, uma fração de ligação de um alvo de ácido nucleico compreende um sítio de uma mutação ou mutação funcional, incluindo uma deleção, adição, troca ou truncamento dos nucleotídeos em uma sequência de ácido nucleico.

[0121] Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a uma proteína alvo compreendendo um alcance de pelo menos 6 aminoácidos, por exemplo, menos de 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, ou 100 aminoácidos. Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a uma proteína alvo compreendendo uma extensão contígua de aminoácidos. Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a uma proteína alvo compreendendo uma

extensão não contígua de aminoácidos. Em alguns casos, um sítio de ligação se liga a uma proteína alvo compreendendo um sítio de uma mutação ou mutação funcional, incluindo uma deleção, adição, troca ou truncamento dos aminoácidos na sequência de um polipeptídeo. Um sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação de uma proteína alvo. Em alguns casos, uma fração de ligação de uma proteína alvo compreende um alcance de pelo menos 6 aminoácidos, por exemplo, pelo menos 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ou 100 aminoácidos. Em alguns casos, uma fração de ligação de uma proteína alvo compreende uma extensão contígua de aminoácidos. Em alguns casos, uma fração de ligação de uma proteína alvo compreende uma extensão não contígua de aminoácidos. Em alguns casos, uma fração de ligação de uma proteína alvo compreende um sítio de uma mutação ou mutação funcional, incluindo uma deleção, adição, troca ou truncamento dos aminoácidos em uma sequência polipeptídica.

[0122] Em algumas modalidades, um sítio de ligação se liga a um domínio, um fragmento, um epítipo, uma região ou uma porção de uma proteína ligada à membrana. Um sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação de uma proteína ligada à membrana. Em algumas modalidades, uma fração de ligação está em ou compreende um domínio, um fragmento, um epítipo, uma região ou uma porção de uma proteína ligada à membrana. Proteínas ligadas à membrana exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a, GPCRs (por exemplo, receptores adrenérgicos, receptores de angiotensina, receptores de colecistoquinina, receptores de acetilcolina muscarínicos, receptores de neurotensina, receptores de galanina, receptores de dopamina, receptores de opioides, receptores

de erotonina, receptores de somatostatina, etc.), canais iônicos (por exemplo, receptores nicotínicos de acetilcolina, canais de sódio, canais de potássio, etc.), canais não excitáveis e excitáveis, receptor quinases tirosina, receptor quinases serina/treonina, receptor ciclasas guanilato, fator de crescimento e receptores de hormônio (por exemplo, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e outros. O sítio de ligação pode se ligar a um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um mutante ou variantes modificadas de proteínas ligadas à membrana. O sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação de um mutante ou variante modificada da proteína ligada à membrana. A fração de ligação também pode estar em ou compreender um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um mutante ou variantes modificadas de proteínas ligadas à membrana. Por exemplo, algumas mutações pontuais únicas ou múltiplas de GPCRs retêm a função e estão envolvidas na doença (ver, por exemplo, Stadel *et al.*, (1997) *Trends in Pharmacological Review* 18:430-37).

[0123] O sítio de ligação liga-se a, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região, ou uma porção de uma ubiquitina ligase. Um sítio de ligação se liga a, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um adaptador de ubiquitina, adaptador de proteassoma ou proteína de proteassoma. Um sítio de ligação se liga a, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma proteína envolvida na endocitose, fagocitose, uma via lisossomal, uma via autofágica, macroautofagia, microautofagia, autofagia

mediada por chaperona, a via do corpo multivesicular, ou uma combinação das mesmas. Em alguns casos, o sítio de ligação se liga a uma fração de ligação. Uma fração de ligação pode compreender, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma ubiquitina ligase. Uma fração de ligação pode compreender, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um adaptador de ubiquitina, adaptador de proteassoma ou proteína de proteassoma. Uma fração de ligação pode compreender, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de uma proteína envolvida na endocitose, fagocitose, uma via lisossomal, uma via autofágica, macroautofagia, microautofagia, autofagia mediada por chaperona, a via do corpo multivesicular, ou uma combinação das mesmas.

[0124] Um sítio de ligação se liga a, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região, ou uma porção de uma proteína associada com uma doença ou afeção. Um sítio de ligação se liga a, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um proto-oncogene. Um sítio de ligação se liga a, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um oncogene. Um sítio de ligação se liga a, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um gene supressor de tumor. Um sítio de ligação se liga a, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um gene inflamatório (por exemplo, uma citocina). Um sítio de ligação pode se ligar a uma fração de ligação. Uma fração de ligação pode compreender, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou

uma porção de uma proteína associada a uma doença ou afeção. Uma fração de ligação pode compreender, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um proto-oncogene. Uma fração de ligação pode compreender, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um oncogene. Uma fração de ligação pode compreender, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um gene supressor de tumor. Uma fração de ligação pode compreender, por exemplo, um domínio, um fragmento, um epítopo, uma região ou uma porção de um gene inflamatório (por exemplo, uma citocina).

[0125] FIG. 1 mostra um exemplo de um polirribonucleotídeo circular com um motivo de ligação de RNA específico de sequência, motivo de ligação de DNA específico de sequência e motivo de ligação específico de proteína. Em algumas modalidades, o circRNA pode incluir outros motivos de ligação para ligar outras moléculas intracelulares. Exemplos não limitativos de aplicações de circRNA estão listados na TABELA 1.

TABELA 1

Processo	MOA (exemplo)
Transcrição Dirigida	DNA-circRNA-Proteína (<i>pol</i> , <i>TF</i>)
Remodelação Epigenética	DNA-circRNA-Proteína (<i>SWI/SNF</i>)
Interferência transcricional	circRNA-DNA
Interferência translacional	circRNA-mRNA ou ribossomo
Inibidor de interação de proteínas	circRNA-Proteína

Processo	MOA (exemplo)
Degradação de proteínas	Proteína-circRNA-Proteína (<i>ubiq</i>)
Degradação de RNA	RNA-circRNA-RNA (<i>RNase a RNA</i>)
Degradação de DNA	DNA-circRNA-Proteína (<i>DNA a DNase</i>)
Receptor Artificial	Superfície celular-circRNA-Substrato
Translocação de Proteína	Proteína-circRNA-Proteína/RNA
Fusão Celular	Superfície celular-circRNA-Superfície celular
Desmontagem Complexa	Proteína-circRNA-Proteína/RNA
Inibição do receptor	Proteína-circRNA-Substrato
Transdução de Sinal	Proteína-circRNA-Proteína (<i>caspase</i>)
Aceleração multi-enzimática	Múltimas Enzimas-circRNA
Indução do receptor	circRNA-receptor

Sítios de Ligação de RNA

[0126] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma ou mais sítios de ligação de RNA. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui sítios de ligação de RNA que modificam a expressão de um gene endógeno e/ou exógeno. Em algumas modalidades, o sítio de ligação de RNA modula a expressão de um gene hospedeiro. O sítio de ligação de RNA pode incluir uma sequência que hibridiza com um gene endógeno (por exemplo, uma sequência para um miRNA, siRNA, mRNA, lncRNA, RNA, DNA, um RNA antissenso, gRNA como aqui descrito), uma sequência que

hibridiza com um ácido nucleico exógeno, tal como um DNA ou RNA viral, uma sequência que hibridiza com um RNA, uma sequência que interfere com a transcrição do gene, uma sequência que interfere com a tradução do RNA, uma sequência que estabiliza o RNA ou desestabiliza o RNA, tal como através de direcionamento para degradação ou uma sequência que modula um fator de ligação a DNA ou RNA. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma sequência de aptâmero que se liga a um RNA. A sequência de aptâmero pode se ligar a um gene endógeno (por exemplo, uma sequência para um miRNA, siRNA, mRNA, lncRNA, RNA, DNA, um RNA antissenso, gRNA como aqui descrito), a um ácido nucleico exógeno, tal como um DNA viral ou RNA, para um RNA, para uma sequência que interfere com a transcrição do gene, para uma sequência que interfere com a tradução do RNA, para uma sequência que estabiliza o RNA ou desestabiliza o RNA, tal como através de direcionamento para degradação, ou para uma sequência que modula um fator de ligação a DNA ou RNA. A estrutura secundária da sequência do aptâmero pode se ligar ao RNA. O RNA circular pode formar um complexo com o RNA pela ligação da sequência de aptâmero ao RNA.

[0127] Em algumas modalidades, o sítio de ligação de RNA pode ser um de um sítio de ligação de tRNA, lncRNA, lincRNA, miRNA, rRNA, snRNA, microRNA, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA, exRNA, scaRNA, Y RNA, e hnRNA. Os sítios de ligação de RNA são bem conhecidos dos peritos na técnica.

[0128] Certos sítios de ligação de RNA podem inibir a expressão gênica através do processo biológico de RNA de interferência (RNAi). Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares compreendem uma molécula de

RNAi com RNA ou estruturas semelhantes a RNA, tipicamente tendo 15-50 pares de bases (tal como cerca de 18-25 pares de bases) e tendo uma sequência de nucleobases idêntica (complementar) ou quase idêntica (substancialmente complementar) a uma sequência codificante em um gene alvo expresso dentro da célula. As moléculas de RNAi incluem, mas não estão limitadas a: RNA de interferência curto (siRNA), RNA de cadeia dupla (dsRNA), microRNA (miRNA), RNA em grampo curto (shRNA), meroduplexes e substratos de Dicer.

[0129] Em algumas modalidades, o sítio de ligação de RNA compreende um siRNA ou um shRNA. siRNA e shRNA assemelham-se a intermediários na via de processamento dos genes miRNA endógenos. Em algumas modalidades, o siRNA pode funcionar como miRNA e vice-versa. MicroRNA, tal como siRNA, pode usar RISC para subregular genes alvo, mas ao contrário de siRNA, a maioria dos miRNA de animais não cliva o mRNA. Em vez disso, o miRNA reduz a produção de proteína por meio de supressão translacional ou remoção de poliA e degradação de mRNA. Os sítios de ligação de miRNA conhecidos estão dentro de 3'-UTRs de mRNA; os miRNA parecem visar locais com complementaridade quase perfeita com os nucleotídeos 2-8 a partir da extremidade 5' de miRNA's. Esta região é conhecida como a região de semente. Como o siRNA e o miRNA são intercambiáveis, o siRNA exógeno pode subregular o mRNA com complementaridade de semente ao siRNA. Vários sítios alvo dentro de 3'-UTR podem fornecer uma regulação negativa mais forte.

[0130] MicroRNA (miRNA) são curtos RNAs não codificadores que se ligam à 3'UTR de moléculas de ácido nucleico e subregulam a expressão de genes por redução da estabilidade

de moléculas de ácido nucleico ou por inibição da tradução. O polirribonucleotídeo circular pode compreender uma ou mais sequências alvo de miRNA, sequências de miRNA ou sementes de miRNA. Essas sequências podem corresponder a qualquer miRNA.

[0131] Uma sequência de miRNA compreende uma região de "semente", isto é, uma sequência na região das posições 2-8 do miRNA maduro, sequência essa que tem complementaridade de Watson-Crick com a sequência alvo de miRNA. Uma semente de miRNA pode compreender as posições 2-8 ou 2-7 do miRNA maduro. Em algumas modalidades, uma semente de miRNA pode compreender 7 nucleotídeos (p.ex., nucleotídeos 2-8 do miRNA maduro), em que o local complementar à semente no alvo de miRNA correspondente é flanqueado por uma adenina (A) oposta à posição 1 de miRNA. Em algumas modalidades, uma semente de miRNA pode compreender 6 nucleotídeos (p.ex., nucleotídeos 2-7 do miRNA maduro), em que o local complementar à semente no alvo de miRNA correspondente é flanqueado por uma adenina (A) oposta à posição 1 de miRNA.

[0132] As bases da semente de miRNA podem ser substancialmente complementares com a sequência alvo. Por manipulação de sequências alvo de miRNA no polirribonucleotídeo circular, o polirribonucleotídeo circular pode escapar do ou ser detectado pelo sistema imunitário do hospedeiro, ter degradação modulada ou tradução modulada. Este processo pode reduzir o perigo de efeitos fora do alvo após administração de polirribonucleotídeos circulares.

[0133] O polirribonucleotídeo circular pode incluir uma sequência de miRNA idêntico para cerca de 5 a cerca de 25 nucleotídeos contíguos de um gene alvo. Em algumas

modalidades, a sequência de miRNA visa um mRNA e começa com o dinucleotídeo AA, compreende um conteúdo de GC de cerca de 30%-70%, cerca de 30%-60%, cerca de 40%-60% ou cerca de 45%-55%, e não tem uma elevada percentagem de identidade com qualquer sequência de nucleotídeos sem ser o alvo no genoma mamífero no qual é para ser introduzida, por exemplo como determinado por pesquisa por BLAST padrão.

[0134] Reciprocamente, os locais de ligação ao miRNA podem ser manipulados para fora (isto é, removidos) do polirribonucleotídeo circular para modular a expressão de proteínas em tecidos específicos. A regulação da expressão em múltiplos tecidos pode ser alcançada através da introdução ou remoção ou de um ou vários locais de ligação ao miRNA.

[0135] Exemplos de tecidos onde se sabe que os miRNA regulam o mRNA e, deste modo, a expressão de proteínas, incluem, mas não estão limitados a, fígado (miR-122), músculo (miR-133, miR-206, miR-208), células endoteliais (miR-17-92, miR-126), células mieloides (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), tecido adiposo (let-7, miR-30c), coração (miR-1d, miR-149), rim (miR-192, miR-194, miR-204) e células epiteliais do pulmão (let-7, miR-133, miR-126). MiRNA também pode regular processos biológicos complexos, tal como angiogênese (miR-132). Nos polirribonucleotídeos circulares descritos aqui, os locais de ligação para os miRNAs que estão envolvidos em tais processos podem ser removidos ou introduzidos, de modo a customizar a expressão a partir do polirribonucleotídeo circular a tipos de células biologicamente relevantes ou ao contexto de processos biológicos relevantes. Em algumas modalidades, o local de ligação ao miRNA inclui, p.ex., miR-7.

[0136] Através de um entendimento dos padrões de expressão de miRNA em diferentes tipos de células, o polirribonucleotídeo circular descrito aqui pode ser manipulado para expressão mais visada em tipos de células específicos ou somente sob condições biológicas específicas. Através da introdução de locais de ligação ao miRNA específicos de tecido, o polirribonucleotídeo circular pode ser desenhado para expressão ótima de proteínas em um tecido ou no contexto de uma condição biológica

[0137] Adicionalmente, os locais de semente de miRNA podem ser incorporados no polirribonucleotídeo circular para modular a expressão em certas células o que resulta em uma melhoria biológica. Um exemplo disto é incorporação de locais de miR-142. A incorporação de locais de miR-142 no polirribonucleotídeo circular descrito aqui pode modular a expressão em células hematopoiéticas, mas também reduzir ou abolir as respostas imunitárias a uma proteína codificada no polirribonucleotídeo circular.

[0138] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende pelo menos um miRNA, p.ex., 2, 3, 4, 5, 6 ou mais. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um miRNA com pelo menos cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou 100% de identidade de sequência de nucleotídeos com qualquer uma das sequências de nucleotídeos ou uma sequência que é complementar a uma sequência alvo.

[0139] Listas de sequências conhecidas de miRNA podem ser encontradas em bases de dados mantidas por organizações de pesquisa, por exemplo, Wellcome Trust Sanger Institute, Penn

Center for Bioinformatics, Memorial Sloan Kettering Cancer Center e European Molecule Biology Laboratory. As moléculas de RNAi podem ser prontamente desenhadas e produzidas por tecnologias conhecidas na técnica. Além disso, ferramentas computacionais podem ser usadas para determinar motivos de sequência específicos e eficazes.

[0140] Em algumas modalidades, um polirribonucleotídeo circular compreende um longo RNA não codificante. Os RNAs longos não codificantes (lncRNA) incluem transcritos não codificantes de proteína mais longos do que 100 nucleotídeos. O comprimento mais longo distingue lncRNA de pequenos RNA reguladores, tais como miRNA, siRNA e outro RNA curto. Em geral, a maioria (~78%) dos lncRNA é caracterizada como específica de tecidos. Os lncRNA divergentes que são transcritos na direção oposta aos genes codificantes de proteínas próximos (compreendem uma proporção significativa ~20% de lncRNA totais nos genomas de mamíferos) podem regular a transcrição do gene próximo.

[0141] O comprimento do sítio de ligação de RNA pode ser entre cerca de 5 a 30 nucleotídeos, entre cerca de 10 a 30 nucleotídeos, ou cerca de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais nucleotídeos. O grau de identidade do sítio de ligação de RNA a um alvo de interesse pode ser de pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95%.

[0142] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui um ou mais locais de ligação a grandes RNA não codificantes intergênicos (lincRNA). O lincRNA constitui a maior parte do RNA não codificante longo. Os LincRNA são transcritos não codificantes e, em algumas modalidades, têm

mais do que cerca de 200 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, lincRNA têm uma estrutura éxon-ínton-éxon, similar aos genes codificantes de proteínas, mas não englobam grelhas de leitura aberta e não codificam proteínas. A expressão de lincRNA pode ser notavelmente específica de tecido em comparação com os genes codificadores. LincRNA são tipicamente co-expressos com seus genes vizinhos em uma extensão semelhante àquela de pares de genes vizinhos que codificam proteínas. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um lincRNA circular.

[0143] Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares divulgados neste documento incluem um ou mais lincRNA, por exemplo, FIRRE, LINC00969, PVT1, LINC01608, JPX, LINC01572, LINC00355, C1orf132, C3orf35, RP11-734, LINC01608, CC-499B15.5, CASC15, LINC00937, e RP11-191.

[0144] Listas de sequências de lincRNA e lncRNA conhecidas podem ser encontradas em base de dados mantidos por organizações de investigação, por exemplo, Instituto de Genômica e Biologia Integrativa, Instituto Diamantina na Universidade de Queensland, Universidade de Ghent e Universidade Sun Yat-sen. As moléculas de lincRNA e lncRNA podem ser prontamente desenhadas e produzidas por tecnologias conhecidas na técnica. Além disso, ferramentas computacionais podem ser usadas para determinar motivos de sequência específicos e eficazes.

[0145] O sítio de ligação de RNA pode compreender uma sequência que é substancialmente complementar, ou totalmente complementar, à totalidade ou um fragmento de um gene ou produto do gene endógeno (por exemplo, mRNA). A sequência

complementar pode complementar as sequências na fronteira entre íntrons e éxons para evitar a maturação de transcritos de RNA nuclear recém-gerados de genes específicos em mRNA para transcrição. A sequência complementar pode ser específica para genes por hibridização com o mRNA desse gene e impedir sua tradução. O sítio de ligação de RNA pode compreender uma sequência que é antissenso ou substancialmente antissenso à totalidade ou um fragmento de um gene endógeno ou produto gênico, tal como DNA, RNA, ou um derivado ou híbrido destes.

[0146] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um sítio de ligação de RNA que tem uma estrutura de RNA ou semelhante a RNA tipicamente entre cerca de 5-5000 pares de bases (dependendo da estrutura de RNA específica, por exemplo, miRNA 5-30 bps, lncRNA 200 -500 bps) e tem uma sequência de nucleobases idêntica (complementar) ou quase idêntica (substancialmente complementar) a uma sequência de codificação em um gene alvo expresso dentro da célula.

Sítios de Ligação ao DNA

[0147] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um sítio de ligação ao DNA, tal como uma sequência para um RNA guia (gRNA). Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um RNA guia ou um complemento para uma sequência de gRNA. Um curto RNA sintético gRNA composto por uma sequência de "molde" necessária para ligação à fração efetora incompleta e uma sequência de direcionamento de ~ 20 nucleotídeos definida pelo usuário para um alvo genômico. As sequências de RNA guia podem ter um comprimento entre 17 - 24 nucleotídeos

(p.ex., 19, 20 ou 21 nucleotídeos) e complementares à sequência de ácido nucleico alvo. Geradores e algoritmos de gRNA personalizados podem ser usados no desenho de um RNA guia eficaz. Também pode ser alcançada a edição gênica usando um "RNA guia simples" (sgRNA) quimérico, uma molécula de RNA simples manipulada (sintética) que mimetiza um complexo crRNA-tracrRNA ocorrendo naturalmente e contém tanto um tracrRNA (para ligação da nuclease) como pelo menos um crRNA (para guiar a nuclease para a sequência alvo para edição). O sgRNA quimicamente modificado pode ser eficaz na edição do genoma.

[0148] O gRNA pode reconhecer sequências de DNA específicas (p.ex., sequências adjacentes a ou dentro de um promotor, intensificador, silenciador ou repressor de um gene).

[0149] Em algumas modalidades, o gRNA é parte de um sistema CRISPR para edição de genes. Para a edição de genes, o polirribonucleotídeo circular pode ser desenhado para incluir uma ou várias sequências de RNA guia correspondentes a uma sequência de DNA alvo desejada. As sequências de gRNA podem incluir pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais nucleotídeos para interação com Cas9 ou outra exonuclease para clivar DNA, por exemplo, Cpf1 interage com pelo menos cerca de 16 nucleotídeos da sequência de gRNA para clivagem de DNA detectável.

[0150] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma sequência de aptâmero que pode se ligar a um DNA. A estrutura secundária da sequência do aptâmero pode se ligar ao DNA. Em algumas modalidades, o

polirribonucleotídeo circular forma um complexo com o DNA pela ligação da sequência de aptâmero ao DNA.

[0151] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui sequências que se ligam a um sulco principal no DNA duplex. Em um desses casos, a especificidade e estabilidade de uma estrutura triplex criada pelo polirribonucleotídeo circular e DNA duplex é fornecida por ligações de hidrogênio de Hoogsteen, que são diferentes daquelas formadas no emparelhamento de bases clássico de Watson-Crick em DNA duplex. Em um caso, o polirribonucleotídeo circular se liga à cadeia rica em purinas de um duplex alvo através do sulco principal.

[0152] Em algumas modalidades, a formação de triplex ocorre em dois motivos, distinguidos pela orientação do polirribonucleotídeo circular em relação à cadeia rica em purinas do duplex alvo. Em alguns casos, da sequência de polipirimidina em polirribonucleotídeos circulares ligam-se aos trechos da sequência de polipurina de um DNA duplex via ligação de hidrogênio de Hoogsteen de maneira paralela (ou seja, na mesma orientação 5' para 3', como a cadeia rica em purina do duplex), enquanto os trechos de polipurina (R) se ligam de forma antiparalela à cadeia de purina do duplex via pontes de hidrogênio Hoogsteen reversas. No antiparalelo, um motivo de purina compreende tripletos de G:G-C, A:A-T ou T:AT; enquanto, no paralelo, um motivo de pirimidina compreende triplos canônicos de tripletos C+:G-C ou T:A-T (onde C+ representa uma citosina protonada na posição N3). As sequências antiparalelas de GA e GT em um polirribonucleotídeo circular podem formar triplexes estáveis em pH neutro, enquanto as sequências de CT paralelas

em um polirribonucleotídeo circular podem se ligar em pH ácido. N3 na citosina no polirribonucleotídeo circular pode ser protonado. A substituição de C com 5-metil-C pode permitir a ligação de sequências de CT no polirribonucleotídeo circular em pH fisiológico, pois 5-metil-C tem um pK mais alto do que a citosina. Para os motivos de purina e pirimidina, trechos de sequência de homopurina-homopirimidina contíguos de pelo menos 10 pares de bases auxiliam na ligação de polirribonucleotídeo circular ao DNA duplex, uma vez que triplexes mais curtos podem ser instáveis em condições fisiológicas e interrupções nas sequências podem desestabilizar a estrutura triplex. Em algumas modalidades, o alvo DNA duplex para formação de triplex inclui bases purinas consecutivas em uma cadeia. Em algumas modalidades, um alvo para a formação de triplex compreende uma sequência de homopurina em uma cadeia do DNA duplex e uma sequência de homopirimidina na cadeia complementar.

[0153] Em algumas modalidades, um triplex que compreende um polirribonucleotídeo circular é uma estrutura estável. Em algumas modalidades, um triplex compreendendo um polirribonucleotídeo circular exibe uma meia-vida aumentada, por exemplo, aumentada em cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50 % ou mais, por exemplo, persistência por pelo menos cerca de 1 hora a cerca de 30 dias, ou pelo menos cerca de 2 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dias, 19 dias, 20 dias, 21 dias, 22 dias, 23 dias, 24 dias, 25 dias, 26 dias, 27 dias,

28 dias, 29 dias, 30 dias, 60 dias ou mais ou qualquer momento entre eles.

Sítios de Ligação à Proteína

[0154] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui um ou mais sítios de ligação à proteína. Em algumas modalidades, o sítio de ligação à proteína compreende uma sequência de aptâmero. Em uma modalidade, o polirribonucleotídeo circular inclui um sítio de ligação à proteína para reduzir uma resposta imune do hospedeiro em comparação com a resposta desencadeada por um composto de referência, por exemplo, um polirribonucleotídeo circular sem o sítio de ligação à proteína, por exemplo, RNA linear.

[0155] Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares aqui divulgados incluem um ou mais sítios de ligação à proteína para se ligar uma proteína, por exemplo, um ribossomo. Através de sítios de ligação à proteína manipulados, por exemplo, sítios de ligação a ribossomos, em polirribonucleotídeo circular, o polirribonucleotídeo circular pode evadir ou ter detecção reduzida pelo sistema imunitário do hospedeiro, ter degradação modulada, ou tradução modulada.

[0156] Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeo circulares compreendem um sítio de ligação, pelo menos, um imunoproteína, por exemplo, para mascarar o polirribonucleotídeo circular a partir de componentes do sistema imunitário do hospedeiro, por exemplo, evadir respostas de CTL. Em algumas modalidades, o local de ligação a imunoproteínas é uma sequência de nucleotídeos que se liga a uma imunoproteína e auxilia no mascaramento do polirribonucleotídeo circular como não endógeno.

[0157] Mecanismos tradicionais de envolvimento do ribossomo com RNA linear envolve a ligação do ribossomo à extremidade 5' *capped* de um RNA. A partir da extremidade 5', o ribossomo migra para um códon de iniciação, após o que a primeira ligação de peptídeo é formada. De acordo com a presente invenção, a iniciação interna (*i.e.*, independente de *cap*) ou tradução do polirribonucleotídeo circular não requer uma extremidade livre ou uma extremidade *capped*. Ao invés, um ribossomo se liga a um local interno não *capped*, por meio do que o ribossomo começa o alongamento do polipeptídeo em um códon de iniciação. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma ou mais sequências de RNA compreendendo um local de ligação ao ribossomo, *p.ex.*, um códon de iniciação.

[0158] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma ou mais sequências de RNA compreendendo um sítio de ligação ao ribossomo, por exemplo, um códon de iniciação. Em algumas modalidades, a sequência de ligação a proteínas visa ou localiza um polirribonucleotídeo circular para um alvo específico. Em algumas modalidades, a sequência de ligação a proteínas se liga especificamente a uma região rica em arginina de uma proteína.

[0159] Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares divulgados neste documento incluem um ou mais sítios de ligação de proteína em que cada um se liga a uma proteína alvo, por exemplo, atuando como um molde para trazer duas ou mais proteínas em estreita proximidade. Em algumas modalidades, os polinucleotídeos circulares divulgados neste documento compreendem dois sítios de ligação de proteína em que cada um se liga a uma proteína alvo, trazendo assim as

proteínas alvo em estreita proximidade. Em algumas modalidades, os polinucleotídeos circulares divulgados neste documento compreendem três sítios de ligação de proteína em que cada um se liga a uma proteína alvo, trazendo assim as três proteínas alvo em estreita proximidade. Em algumas modalidades, os polinucleotídeos circulares divulgados neste documento compreendem quatro sítios de ligação de proteína em que cada um se liga a uma proteína alvo, trazendo assim as quatro proteínas alvo em estreita proximidade. Em algumas modalidades, os polinucleotídeos circulares divulgados neste documento compreendem cinco ou mais sítios de ligação de proteína em que cada um se liga a uma proteína alvo, trazendo assim as cinco ou mais proteínas alvo em estreita proximidade. Em algumas modalidades, as proteínas alvo são as mesmas. Em algumas modalidades, as proteínas alvo são diferentes. Em algumas modalidades, trazer as proteínas alvo em estreita proximidade promove a formação de um complexo de proteínas. Por exemplo, um polirribonucleotídeo circular da divulgação pode atuar como um molde para promover a formação de um complexo compreendendo uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez proteínas alvo, ou mais. Em algumas modalidades, trazer duas ou mais proteínas alvo em estreita proximidade promove a interação das duas ou mais proteínas alvo. Em algumas modalidades, trazer dois ou mais proteínas alvo em grande proximidade modula, promove, ou inibe uma reação enzimática. Em algumas modalidades, trazer dois ou mais proteínas alvo em grande proximidade modula, promove, ou inibe uma via de transdução de sinal.

[0160] Em algumas modalidades, o local de ligação a proteínas inclui, mas não está limitado a, um local de

ligação à proteína tal como 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, p53, PCBP2, POLR2A, PRPF8, PTBP1, RBFOX1, RBFOX2, RBFOX3, RBM10, RBM22, RBM27, RBM47, RNPS1, SAFB2, SBDS, SF3A3, SF3B4, SIRT7, SLBP, SLTM, SMNDC1, SND1, SRRM4, SRSF1, SRSF3, SRSF7, SRSF9, TAF15, TARDBP, TIA1, TNRC6A, TOP3B, TRA2A, TRA2B, U2AF1, U2AF2, UNK, UPF1, WDR33, XRN2, YBX1, YTHDC1, YTHDF1, YTHDF2, YWHAG, ZC3H7B, PDK1, AKT1, e qualquer outra proteína que se liga a RNA.

[0161] Em algumas modalidades, um sítio de ligação à proteína é uma sequência de ácido nucleico que se liga a uma proteína, por exemplo, uma sequência que pode ligar um fator de transcrição, intensificador, repressor, polimerase, nuclease, histona ou qualquer outra proteína que se liga a DNA. Em algumas modalidades, um sítio de ligação à proteína é uma sequência de aptâmero que se liga a uma proteína. Em algumas modalidades, a estrutura secundária da sequência de aptâmero se liga à proteína. Em algumas modalidades, o RNA circular forma um complexo com a proteína pela ligação da sequência de aptâmero à proteína.

[0162] Em algumas modalidades, um RNA circular é conjugado a uma molécula pequena ou uma parte dela, em que a molécula pequena ou parte dela se liga a um alvo, tal como uma proteína. Uma molécula pequena pode ser conjugada a um RNA

circular por meio de um nucleotídeo modificado, por exemplo, por química de clique. Exemplos de pequenas moléculas que podem se ligar a proteínas incluem, mas não estão limitados a 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), AC220, Afatinib, um análogo de aminopirazol, um antagonista de AR, BI-7273, Bosutinib, Ceritinib, Cloroalcano, Dasatinib, Foretinib, Gefitinib, um derivado de HIF-1 α (R)-hidroxiprolina, HJB97, um ligando à base de hidroxiprolina, IACS-7e, Ibrutinib, um derivado de ibrutinib, JQ1, Lapatinib, um derivado LCL161, Lenalidomida, uma molécula pequena de nutlin, OTX015, um inibidor de PDE4, Pomalidomida, um inibidor de ripk2, RN486, inibidor de Sirt2 3b, SNS-032, fator Aço, um inibidor de TBK1, Talidomida, um derivado de talidomida, um ligante baseado em Tiazolidinediona, um derivado de VH032, ligando 2 de VHL, VHL-1, VL-269 e seus derivados.

[0163] Em algumas modalidades, um RNA circular é conjugado a mais de uma molécula pequena, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais moléculas pequenas. Em algumas modalidades, um RNA circular é conjugado a mais de uma molécula pequena diferente, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais moléculas pequenas diferentes. Em algumas modalidades, mais de uma molécula pequena conjugada ao RNA circular é configurada para recrutar suas respectivas proteínas alvo na proximidade, o que pode levar à interação entre as proteínas alvo e/ou outras alterações moleculares e celulares. Por exemplo, um RNA circular pode ser conjugado a JQ1 e talidomida, ou derivado dos mesmos, que pode assim recrutar uma proteína alvo de JQ1, por exemplo, proteínas da família BET e uma proteína alvo de talidomida, por exemplo, ligase E3. Em alguns casos, o RNA circular conjugado com JQ1

e talidomida recruta uma proteína da família BET via JQ1, ou seu derivado, marca a proteína da família BET com ubiquitina pela ligase E3 que é recrutada através da talidomida ou derivado da mesma, e assim leva à degradação do proteína da família BET marcada.

Outros Sítios de Ligação

[0164] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um ou mais sítios de ligação a um alvo não-RNA ou não-DNA. Em algumas modalidades, o sítio de ligação pode ser um de uma molécula pequena, um aptâmero, um lipídeo, um carboidrato, uma partícula de vírus, uma membrana, um complexo de múltiplos componentes, uma célula, uma fração celular ou qualquer seu fragmento do sítio de ligação. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um ou mais sítios de ligação a um lipídeo. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um ou mais sítios de ligação a um carboidrato. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um ou mais sítios de ligação a um carboidrato. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um ou mais sítios de ligação a uma membrana. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um ou mais sítios de ligação a um complexo de múltiplos componentes, por exemplo, ribossomo, nucleossomo, maquinaria de transcrição, etc.

[0165] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma sequência de aptâmero. A sequência de aptâmero se pode ligar a um alvo como aqui descrito (por exemplo, uma molécula de ácido nucleico, uma molécula pequena, uma proteína, um carboidrato, um lipídeo, etc.). A

sequência de aptâmeros tem uma estrutura secundária que pode ligar ao alvo. Em algumas modalidades, a sequência de aptâmero tem uma estrutura terciária que pode ligar ao alvo. Em algumas modalidades, a sequência de aptâmero tem uma estrutura quaternária que pode ligar ao alvo. O polirribonucleotídeo circular pode se ligar ao alvo através da sequência de aptâmero para formar um complexo. Em algumas modalidades, o complexo é detectável por pelo menos 5 dias. Em algumas modalidades, o complexo é detectável por pelo menos 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias.

Sequestro

[0166] Em algumas modalidades, circRNA descrito aqui sequestra um alvo, por exemplo, DNA, RNA, proteínas e outros componentes celulares para regular processos celulares. CircRNA com sítios de ligação para um alvo de interesse pode competir com a ligação do alvo com um parceiro de ligação endógeno. Em algumas modalidades, o circRNA descrito aqui sequestra o miRNA. Em algumas modalidades, o circRNA descrito aqui sequestra o mRNA. Em algumas modalidades, o circRNA descrito aqui sequestra o proteínas. Em algumas modalidades, o circRNA descrito aqui sequestra o ribossomos. Em algumas modalidades, o circRNA descrito aqui sequestra outro circRNA. Em algumas modalidades, o circRNA descrito aqui sequestra o RNA não codificante, lncRNA, miRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, ncrRNA, siRNA ou shRNA. Em algumas modalidades, o circRNA aqui descrito inclui um elemento de degradação que degrada um alvo sequestrado, por exemplo, DNA, RNA, proteínas, ou outro componente celular ligado ao circRNA.

Exemplos não limitativos de aplicações de sequestro de circRNA estão listados na TABELA 2.

TABELA 2

Processo	MOA (exemplo)
Interferência transcricional	circRNA-DNA
Interferência translacional	circRNA-mRNA ou ribossomo
Inibidor de interação de proteínas	circRNA-Proteína
sequestrador de microRNA	circRNA-RNA (antissenso)
sequestrador de circRNA (circRNA endógeno)	circRNA-circRNA (antissenso)

[0167] Em algumas modalidades, qualquer um dos métodos de uso de circRNA descritos neste documento pode ser em combinação com um elemento de tradução. O circRNA aqui descrito que contém um elemento de tradução pode traduzir RNA em proteínas. **FIG. 3** ilustra um esquema da expressão de proteína facilitada por um circRNA contendo um motivo de ligação de RNA específico de sequência, motivo de ligação de DNA específico de sequência, motivo de ligação específico de proteína (Proteína 1) e motivo de RNA regulatório (RNA 1). O motivo de RNA regulatório pode iniciar a transcrição de RNA e a expressão de proteínas.

Regiões não traduzidas

[0168] Em algumas modalidades, um circRNA conforme divulgado neste documento pode compreender um criptogênico. Em algumas modalidades, o criptogênio compreende regiões não traduzidas (UTRs). As UTRs de um gene podem ser transcritas, mas não traduzidas. Em algumas modalidades, uma UTR pode ser incluída a montante da sequência de iniciação da tradução de uma sequência de expressão descrita aqui. Em algumas

modalidades, uma UTR pode ser incluída a jusante de uma sequência de expressão descrita aqui. Em alguns casos, uma UTR para a primeira sequência de expressão é igual a ou contínua com ou sobreposta com outra UTR para uma segunda sequência de expressão. Em algumas modalidades, o íntron é um íntron humano. Em algumas modalidades, o íntron é um íntron humano de comprimento total, p.ex., ZKSCAN1.

[0169] Em algumas modalidades, o criptogênico aumenta a estabilidade. Em algumas modalidades, as características regulatórias de uma UTR podem ser incluídas no criptogênico para aumentar a estabilidade do polirribonucleotídeo circular.

[0170] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma UTR com um ou mais trechos de adenosinas e uridinas embebidos no interior. As assinaturas ricas em AU podem aumentar as taxas de renovação do produto de expressão.

[0171] A introdução, remoção ou modificação de elementos ricos em AU de UTR (AREs) pode ser útil para modular a estabilidade ou imunogenicidade do polirribonucleotídeo circular. Quando se manipulam polirribonucleotídeos circulares específicos, uma ou mais cópias de um ARE podem ser introduzidas para destabilizar o polirribonucleotídeo circular e as cópias de um ARE podem diminuir a tradução e/ou diminuir a produção de um produto de expressão. Da mesma forma, os AREs podem ser identificados e removidos ou mutados para aumentar a estabilidade intracelular e, assim, aumentar a tradução e a produção da proteína resultante.

[0172] Uma UTR de qualquer gene pode ser incorporada nas respectivas regiões flanqueantes do polirribonucleotídeo

circular. Além do mais podem ser utilizadas múltiplas UTRs de tipo selvagem de qualquer gene conhecido. Em algumas modalidades, UTRs artificiais que não são variantes de genes de tipo selvagem podem ser usadas. Estas UTRs ou suas porções podem ser colocadas na mesma orientação que no transcrito a partir do qual foram selecionadas ou podem ser alteradas na orientação ou localização. Conseqüentemente, uma 5' ou 3' UTR pode ser invertida, encurtada, alongada, tornada quimérica com uma ou mais outras 5'- ou 3'-UTRs. Como usado aqui, o termo "alterado" como se relaciona com uma sequência de UTR significa que a UTR foi mudada de algum modo em relação a uma sequência de referência. Por exemplo, uma 3' ou 5' UTR pode ser alterada em relação a uma UTR de tipo selvagem ou nativa pela mudança na orientação ou localização como ensinado acima ou pode ser alterada pela inclusão de nucleotídeos adicionais, deleção de nucleotídeos, troca ou transposição de nucleotídeos. Qualquer uma destas mudanças produzindo uma UTR "alterada" (3' ou 5') compreende uma UTR variante.

[0173] Em algumas modalidades, uma UTR dupla, UTR tripla ou UTR quádrupla, tal como 5'- ou 3'-UTR, pode ser usada. Como usada aqui, uma UTR "dupla" é uma na qual duas cópias da mesma UTR são codificadas em série ou substancialmente em série. Por exemplo, uma beta-globina dupla 3'-UTR pode ser usada em algumas modalidades da invenção.

Criptogênico

[0174] Como descrito aqui, um polirribonucleotídeo circular pode compreender um criptogênico para reduzir, escapar ou evitar a resposta imunitária inata de uma célula. Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares fornecidos

neste documento resultam em uma resposta imunitária reduzida a partir do hospedeiro em comparação com a resposta desencadeada por um composto de referência, p.ex., um polinucleotídeo linear correspondendo ao polirribonucleotídeo circular descrito ou um polirribonucleotídeo circular não tendo um criptogênico. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem menos imunogenicidade do que uma contraparte não tendo um criptogênico.

[0175] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é não imunogênico em um mamífero, p.ex., um humano. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é capaz de se replicar em uma célula de mamífero, p.ex., uma célula humana.

[0176] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui sequências ou produtos de expressão.

[0177] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma meia-vida de pelo menos aquela de uma contraparte linear, p.ex., sequência de expressão linear, ou polirribonucleotídeo circular linear. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma meia-vida que é aumentada em relação àquela de uma contraparte linear. Em algumas modalidades, a meia-vida é aumentada em cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% ou mais. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma meia-vida ou persistência em uma célula durante pelo menos cerca de 1 h a cerca de 30 dias ou pelo menos cerca de 2 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias,

18 dias, 19 dias, 20 dias, 21 dias, 22 dias, 23 dias, 24 dias, 25 dias, 26 dias, 27 dias, 28 dias, 29 dias, 30 dias, 60 dias ou mais ou qualquer momento intermédio. Em certas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma meia-vida ou persistência em uma célula durante não mais do que cerca de 10 mins a cerca de 7 dias ou não mais do que cerca de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou qualquer outro momento intermédio.

[0178] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modula uma função celular, p.ex., transientemente ou a longo prazo. Em certas modalidades, a função celular é estavelmente alterada, tal como uma modulação que persiste durante pelo menos cerca de 1 h a cerca de 30 dias ou pelo menos cerca de 2 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dias, 19 dias, 20 dias, 21 dias, 22 dias, 23 dias, 24 dias, 25 dias, 26 dias, 27 dias, 28 dias, 29 dias, 30 dias, 60 dias ou mais ou qualquer momento intermédio. Em certas modalidades, a função celular é transientemente alterada, p.ex., tal como uma modulação que persiste durante não mais do que cerca de 30 mins a cerca de 7 dias ou não mais do que cerca de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou qualquer outro momento intermédio.

[0179] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem pelo menos cerca de 20 pares de bases, pelo

menos cerca de 30 pares de bases, pelo menos cerca de 40 pares de bases, pelo menos cerca de 50 pares de bases, pelo menos cerca de 75 pares de bases, pelo menos cerca de 100 pares de bases, pelo menos cerca de 200 pares de bases, pelo menos cerca de 300 pares de bases, pelo menos cerca de 400 pares de bases, pelo menos cerca de 500 pares de bases ou pelo menos cerca de 1.000 pares de bases. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode ter um tamanho suficiente para acomodar um local de ligação para um ribossomo. Um perito na técnica pode apreciar que o tamanho máximo de um polirribonucleotídeo circular pode ser tão grande quanto esteja dentro das restrições técnicas de produção de um polirribonucleotídeo circular e/ou uso do polirribonucleotídeo circular. Embora não estando limitado pela teoria é possível que múltiplos segmentos de RNA possam ser produzidos a partir de DNA e suas extremidades livres 5' e 3' emparelhadas para produzir uma "cadeia" de RNA, que pode em última instância ser circularizada quando somente uma extremidade livre 5' e uma 3' permanece. Em algumas modalidades, o tamanho máximo de um polirribonucleotídeo circular pode estar limitado pela capacidade de empacotar e administrar o RNA a um alvo. Em algumas modalidades, o tamanho de um polirribonucleotídeo circular é um comprimento suficiente para codificar polipeptídeos úteis e, assim, podem ser úteis comprimentos de menos de cerca de 20.000 pares de bases, menos de cerca de 15.000 pares de bases, menos de cerca de 10.000 pares de bases, menos de cerca de 7.500 pares de bases, ou menos de cerca de 5.000 pares de bases, menos de cerca de 4.000 pares de bases, menos de cerca de 3.000 pares de bases, menos de cerca de

2.000 pares de bases, menos de cerca de 1.000 pares de bases, menos de cerca de 500 pares de bases, menos de cerca de 400 pares de bases pares, menos de cerca de 300 pares de bases, menos de cerca de 200 pares de bases, menos de cerca de 100 pares de bases.

Sequências de clivagem

[0180] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma sequência de clivagem. Em algumas modalidades, a sequência de clivagem é adjacente a uma sequência de expressão. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência de clivagem, tal como em um circRNA imolante ou circRNA clivável ou circRNA de autoclivável. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende duas ou mais sequências de clivagem, levando à separação do polirribonucleotídeo circular em vários produtos, por exemplo, miRNAs, RNAs lineares, polirribonucleotídeo circular menor, etc.

[0181] Em algumas modalidades, a sequência de clivagem inclui uma sequência de RNA de ribozima. Uma ribozima (da enzima de ácido ribonucleico, também chamada enzima de RNA ou RNA catalítico) é uma molécula de RNA que catalisa uma reação química. Muitas ribozimas naturais catalisam a hidrólise de uma de suas próprias ligações de fosfodiéster, ou a hidrólise de ligações em outro RNA, mas foi também descoberto que catalisam a atividade de aminotransferase do ribossomo. O RNA catalítico pode ser "evoluído" por métodos *in vitro*. Semelhante à atividade do *riboswitch* discutida acima, as ribozimas e seus produtos de reação podem regular a expressão gênica. Em algumas modalidades, um RNA catalítico

ou ribozima pode ser colocado dentro de um RNA não codificante maior, de modo que a ribozima esteja presente em muitas cópias dentro da célula para fins de transformação química de uma molécula de um volume total. Em algumas modalidades, aptâmeros e ribozimas podem ser codificados no mesmo RNA não codificante.

Sequência Imolante

[0182] Em algumas modalidades, o circRNA aqui descrito compreende circRNA imolante ou circRNA clivável ou circRNA autoclivável. O circRNA pode entregar componentes celulares incluindo, por exemplo, RNA, lncRNA, lincRNA, miRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, ncRNA, siRNA ou shRNA. Em algumas modalidades, o circRNA inclui miRNA separado por (i) elementos autocliváveis; (ii) sítios de recrutamento de clivagem; (iii) ligantes degradáveis; (iv) ligantes químicos; e/ou (v) sequências espaçadoras. Em algumas modalidades, o circRNA inclui s siRNA separado por (i) elementos autocliváveis; (ii) sítios de recrutamento de clivagem (por exemplo, ADAR); (iii) ligantes degradáveis (por exemplo, glicerol); (iv) ligantes químicos; e/ou (v) sequências espaçadoras. Exemplos não limitativos de elementos autocliváveis incluem cabeça de martelo, elemento de *splicing*, grampo, vírus delta da hepatite (HDV), Satélite Varkud (VS) e ribozimas *glmS*. Os exemplos não limitativos de aplicações de circRNA imolante estão listados na TABELA 4.

TABELA 3

Processo	MOA (exemplo)
entrega de miRNA	microRNAs em uma forma circular com elemento de autoclivagem (por exemplo,

	cabeça de martelo), recrutamento de clivagem (por exemplo, ADAR) ou ligante degradável (por exemplo, glicerol)
entrega de siRNA	siRNAs em uma forma circular com elemento de autoclivagem (por exemplo, cabeça de martelo), recrutamento de clivagem (por exemplo, ADAR) ou ligante degradável (por exemplo, glicerol)

Sequências de expressão

Peptídeos ou polipeptídeos

[0183] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma sequência que codifica um peptídeo ou polipeptídeo.

[0184] O polipeptídeo pode ser linear ou ramificado. O polipeptídeo pode ter um comprimento de cerca de 5 a cerca de 4000 aminoácidos, cerca de 15 a cerca de 3500 aminoácidos, cerca de 20 a cerca de 3000 aminoácidos, cerca de 25 a cerca de 2500 aminoácidos, cerca de 50 a cerca de 2000 aminoácidos, ou qualquer gama entre eles. Em algumas modalidades, podem ser úteis polipeptídeos com um comprimento de menos de cerca de 4000 aminoácidos, menos de cerca de 3500 aminoácidos, menos de cerca de 3000 aminoácidos, menos de cerca de 2500 aminoácidos, ou menos de cerca de 2000 aminoácidos, menos de cerca de 1500 aminoácidos, menos de cerca de 1000 aminoácidos, menos de cerca de 900 aminoácidos, menos de cerca de 800 aminoácidos, menos de cerca de 700 aminoácidos,

menos de cerca de 600 aminoácidos, menos de cerca de 500 aminoácidos, menos de cerca de 400 aminoácidos ácidos, menos de cerca de 300 aminoácidos ou menos.

[0185] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma ou mais sequências de RNA, cada uma das quais pode codificar um polipeptídeo. O polipeptídeo pode ser produzido em quantidades substanciais. Como tal, o polipeptídeo pode ser qualquer molécula proteínica que pode ser produzida. Um polipeptídeo pode ser um polipeptídeo que pode ser secretado a partir de uma célula ou localizado no citoplasma, núcleo ou compartimento de membrana de uma célula.

[0186] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência codificando uma proteína, p.ex., uma proteína terapêutica. Alguns exemplos de proteínas terapêuticas podem incluir, mas não estão limitados a, uma proteína de reposição, proteína para suplementação, vacinação, antígenos (p.ex., antígenos tumorais, virais e bacterianos), hormônios, citocinas, anticorpos, imunoterapia (p.ex., câncer), fator de reprogramação/transdiferenciação celular, fatores de transcrição, receptor de antígeno quimérico, transposase ou nuclease, efector imunitário (p.ex., influencia a suscetibilidade a uma resposta/sinal imunitário), uma proteína efetora da morte regulada (p.ex., um indutor de apoptose ou necrose), um inibidor não lítico de um tumor (p.ex., um inibidor de uma oncoproteína), um agente modificador epigenético, enzima epigenética, um fator de transcrição, um enzima de modificação de DNA ou proteínas, um agente intercalador de DNA, um inibidor de bombas de

efluxo, um ativador ou inibidor de receptores nucleares, um inibidor de proteassomo, um inibidor competitivo de uma enzima, um efetor ou inibidor da síntese de proteínas, uma nuclease, um fragmento ou domínio de proteína, um ligando ou um receptor e um sistema CRISPR ou seu componente.

Sequências reguladoras

[0187] Em algumas modalidades, a sequência reguladora é um promotor. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos um promotor adjacente a pelo menos uma sequência de expressão. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui um promotor adjacente a cada sequência de expressão. Em algumas modalidades, o promotor está presente em um dos ou ambos os lados de cada sequência de expressão, levando à separação dos produtos de expressão, p.ex., peptídeo(s) e/ou polipeptídeo(s).

[0188] O polirribonucleotídeo circular pode modular a expressão de RNA codificado por um gene. Como múltiplos genes podem partilhar algum grau de homologia de sequências entre si, o polirribonucleotídeo circular pode ser desenhado para visar uma classe de genes com homologia de sequências suficiente. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode conter uma sequência que tem complementaridade com sequências que são compartilhadas entre diferentes alvos de genes ou são únicas de um alvo de gene específico. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode ser desenhado para visar regiões conservadas de uma sequência de RNA tendo homologia entre vários genes visando deste modo vários genes em uma família de genes. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode ser desenhado para

visar uma sequência que é única de uma sequência de RNA específica de um único gene.

[0189] Em algumas modalidades, a sequência de expressão tem um comprimento menor do que 5000 pbs (p.ex., menor do que cerca de 5000 pbs, 4000 pbs, 3000 pbs, 2000 pbs, 1000 pbs, 900 pbs, 800 pbs, 700 pbs, 600 pbs, 500 pbs, 400 pbs, 300 pbs, 200 pbs, 100 pbs, 50 pbs, 40 pbs, 30 pbs, 20 pbs, 10 pbs ou menor). Em algumas modalidades, a sequência de expressão tem, independentemente ou adicionalmente a, um comprimento maior do que 10 pbs (p.ex., pelo menos cerca de 10 pbs, 20 pbs, 30 pbs, 40 pbs, 50 pbs, 60 pbs, 70 pbs, 80 pbs, 90 pbs, 100 pbs, 200 pbs, 300 pbs, 400 pbs, 500 pbs, 600 pbs, 700 pbs, 800 pbs, 900 pbs, 1000 kb, 1,1 kb, 1,2 kb, 1,3 kb, 1,4 kb, 1,5 kb, 1,6 kb, 1,7 kb, 1,8 kb, 1,9 kb, 2 kb, 2,1 kb, 2,2 kb, 2,3 kb, 2,4 kb, 2,5 kb, 2,6 kb, 2,7 kb, 2,8 kb, 2,9 kb, 3 kb, 3,1 kb, 3,2 kb, 3,3 kb, 3,4 kb, 3,5 kb, 3,6 kb, 3,7 kb, 3,8 kb, 3,9 kb, 4 kb, 4,1 kb, 4,2 kb, 4,3 kb, 4,4 kb, 4,5 kb, 4,6 kb, 4,7 kb, 4,8 kb, 4,9 kb, 5 kb ou maior).

[0190] Em algumas modalidades, a sequência de expressão compreende uma ou mais das características descritas aqui, p.ex., uma sequência codificando um ou mais peptídeos ou proteínas, um ou mais ácidos nucleicos reguladores, um ou mais RNA não codificantes, e outras sequências de expressão.

Sítio Interno de Entrada Ribossômica (IRES)

[0191] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular descrito aqui compreende um elemento de sítio interno de entrada ribossômica (IRES). Um elemento IRES adequado para conter uma sequência de RNA capaz de envolver um ribossomo eucariótico. Em algumas modalidades, o elemento

IRES tem pelo menos cerca de 50 pares de bases, pelo menos cerca de 100 pares de bases, pelo menos cerca de 200 pares de bases, pelo menos cerca de 250 pares de bases, pelo menos cerca de 350 pares de bases ou pelo menos cerca de 500 pares de bases. Em algumas modalidades, o elemento IRES é derivado do DNA de um organismo incluindo, mas não se limitando a, um vírus, um mamífero e uma *Drosophila*. O DNA viral pode ser derivado de, por exemplo, cDNA de picornavírus, cDNA do vírus da encefalomiocardite (EMCV) e cDNA de poliovírus. Em algumas modalidades, o DNA de *Drosophila* do qual um elemento IRES é derivado pode incluir, por exemplo, um gene *Antennapedia* de *Drosophila melanogaster*.

[0192] Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares descritos neste documento incluem pelo menos um IRES flanqueando pelo menos uma (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais) sequência de expressão. Em algumas modalidades, o IRES pode flanquear ambos os lados de pelo menos uma (p.ex., 2, 3, 4, 5 ou mais) sequência de expressão. Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares podem incluir uma ou mais sequências IRES em um ou ambos os lados de cada sequência de expressão, levando à separação do(s) peptídeo(s) e/ou polipeptídeo(s) resultante(s).

Sequência de iniciação da tradução

[0193] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular codifica um polipeptídeo e pode compreender uma sequência de iniciação da tradução, p.ex., um códon de partida. Em algumas modalidades, a sequência de iniciação da tradução inclui uma sequência de Kozak ou Shine-Dalgarno. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui a sequência de iniciação da tradução, p.ex., sequência de

Kozak, adjacente a uma sequência de expressão. Em algumas modalidades, a sequência de iniciação da tradução, p.ex., sequência de Kozak, está presente em um dos ou ambos os lados de cada sequência de expressão, levando à separação dos produtos de expressão. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma sequência de iniciação da tradução adjacente a uma sequência de expressão.

[0194] As 5'-UTRs naturais podem apresentar características que desempenham um papel na iniciação da tradução. 5'-UTRs naturais podem abrigar assinaturas como sequências Kozak, que podem estar envolvidas no processo pelo qual o ribossomo inicia a tradução de muitos genes. As sequências de Kozak têm o consenso CCR(A/G)CCAUGG, onde R é uma purina (adenina ou guanina) três bases a montante do códon de partida (AUG), que é seguido por outra "G". As 5'-UTR também podem formar estruturas secundárias que estão envolvidas na ligação do fator de alongamento.

[0195] O polirribonucleotídeo circular pode incluir mais do que 1 códon de partida tal como, mas não se limitando a, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 35, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60 ou mais do que 60 códons de partida. A tradução pode se iniciar no primeiro códon de partida ou iniciar a jusante do primeiro códon de partida.

[0196] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode iniciar em um códon que não é o primeiro códon de partida, p.ex., AUG. A tradução do polirribonucleotídeo circular pode iniciar em uma sequência de iniciação da tradução alternativa, tal como, mas não se limitando a, ACG, AGG, AAG, CTG/CUG, GTG/GUG, ATA/AUA, ATT/AUU, TTG/UUG. Em algumas modalidades, a tradução começa em uma sequência de iniciação da tradução alternativa sob condições seletivas, p.ex., condições induzidas por estresse. Como um exemplo não limitante, a tradução do polirribonucleotídeo circular pode começar em sequência de iniciação da tradução alternativa, tal como ACG. Como outro exemplo não limitante, a tradução do polirribonucleotídeo circular pode começar em sequência de iniciação da tradução alternativa, CTG/CUG. Ainda como outro exemplo não limitante, a tradução do polirribonucleotídeo circular pode começar em sequência de iniciação da tradução alternativa, GTG/GUG. Ainda como outro exemplo não limitante, o polirribonucleotídeo circular pode começar a tradução em uma sequência diferente de AUG (RAN) associada à repetição, tal como uma sequência de iniciação da tradução alternativa que inclui trechos curtos de RNA repetitivo, p.ex., CGG, GGGGCC, CAG, CTG.

[0197] Os nucleotídeos que flanqueiam um códon que inicia a tradução podem afetar a eficiência da tradução, o comprimento e/ou a estrutura do polirribonucleotídeo circular. O mascaramento de qualquer um dos nucleotídeos flanqueando um códon que inicia a tradução pode ser usada para alterar a posição da iniciação da tradução, eficiência da tradução, comprimento e/ou estrutura do polirribonucleotídeo circular.

[0198] Em algumas modalidades, um agente de mascaramento pode ser usado próximo do códon de partida ou códon de partida alternativo de modo a mascarar ou esconder o códon para reduzir a probabilidade de iniciação da tradução no códon de partida mascarado ou códon de partida alternativo. Exemplos não limitantes de agentes de mascaramento incluem oligonucleotídeos de ácidos nucleicos bloqueados antissenso (LNA) e complexos de junção de éxons (EJCs). Em algumas modalidades, um agente de mascaramento pode ser usado para mascarar um códon de partida do polirribonucleotídeo circular de modo a aumentar a probabilidade de que a tradução se iniciará em um códon de partida alternativo.

[0199] Em algumas modalidades, a tradução é iniciada sob condições seletivas, tais como mas não se limitando a seleção induzida viral na presença de GRSF-1 e o polirribonucleotídeo circular inclui locais de ligação a GRSF-1.

[0200] Em algumas modalidades, a tradução é iniciada por meio de tratamento com fator de iniciação 4A eucariótico (eIF4A) com Rocaglates. A tradução pode ser reprimida bloqueando a varredura 43S, levando ao início prematuro da tradução a montante e à redução da expressão da proteína a partir de transcritos com a sequência alvo RocA-eIF4A.

Sequência de terminação

[0201] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma ou mais sequências de expressão e cada sequência de expressão pode ter uma sequência de terminação. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma ou mais sequências de expressão e as sequências de expressão não têm uma sequência de terminação, de modo que o polirribonucleotídeo circular seja continuamente

traduzido. A exclusão de uma sequência de terminação pode resultar em tradução de círculo rolante ou produção contínua de produto de expressão, p.ex., peptídeos ou polipeptídeos, devido à falta de interrupção ou queda do ribossomo. Em uma tal modalidade, a tradução de círculo rolante produz um produto de expressão contínuo através de cada sequência de expressão.

[0202] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência escalonada. Para evitar a produção de um produto de expressão contínuo, p.ex., peptídeo ou polipeptídeo, enquanto se mantém a tradução de círculo rolante, uma sequência escalonada pode ser incluído para induzir pausa ribossômica durante a tradução. A sequência escalonada pode incluir uma sequência tipo 2A ou CHYSEL (elemento de hidrolase de ação *cis*). Em algumas modalidades, o elemento escalonado codifica uma sequência com uma sequência de consenso C-terminal que é X1X2X3EX5NPGP, onde X1 está ausente ou é G ou H, X2 está ausente ou é D ou G, X3 é D ou V ou I ou S ou M, e X5 é qualquer aminoácido. Em algumas modalidades, esta sequência compreende uma sequência não conservada de aminoácidos com uma forte propensão alfa-helicoidal seguida pela sequência de consenso -D(V/I)ExNPGP, onde x = qualquer aminoácido. Alguns exemplos não limitantes de elementos escalonados incluem GDVESNPGP, GDIEENPGP, VEPNPGP, IETNPGP, GDIESNPGP, GDVELNPGP, GDIETNPGP, GDVENPGP, GDVEENPGP, GDVEQNPGP, IESNPGP, GDIELNPGP, HDIETNPGP, HDVETNPGP, HDVEMNPGP, GDMESNPGP, GDVETNPGP, GDIEQNPGP e DSEFNPGP.

[0203] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência de terminação no final de uma

ou mais sequências de expressão. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão carecem de uma sequência de terminação. Geralmente, as sequências de terminação incluem um triplete de nucleotídeos em grelha que sinaliza a terminação da tradução, p.ex., UAA, UGA, UAG. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de terminação no polirribonucleotídeo circular são sequências de terminação com desvio de grelha, tais como, mas não se limitando a, grelhas de leitura fora da grelha ou com desvio -1 e +1 (p.ex., paragem escondida) que podem terminar a tradução. As sequências de terminação com desvio de grelha incluem tripletos de nucleotídeos, TAA, TAG e TGA, que aparecem na segunda e terceira grelhas de leitura de uma sequência de expressão. As sequências de terminação com desvio de grelha podem ser importantes na prevenção de más leituras de mRNA, que é frequentemente prejudicial para a célula.

[0204] Em algumas modalidades, uma sequência escalonada aqui descrita pode terminar a tradução e/ou clivar um produto de expressão entre G e P da sequência de consenso aqui descrita. Como um exemplo não limitativo, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma sequência escalonada para terminar a tradução e/ou clivar o produto de expressão. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência escalonada adjacente a pelo menos uma sequência de expressão. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência escalonada após cada sequência de expressão. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui um sequência escalonada presente em um dos ou ambos os lados de cada sequência de expressão, levando à

tradução de peptídeo(s) e/ou polipeptídeo(s) individual(ais) a partir de cada sequência de expressão.

Sequência de poliA

[0205] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência de poli-A. Em algumas modalidades, o comprimento de uma sequência de poli-A é maior do que 10 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, a sequência de poli-A tem mais do que 15 nucleotídeos em comprimento (p.ex., pelo menos ou maior que cerca de 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 e 3.000 nucleotídeos). Em algumas modalidades, a sequência de poli-A tem cerca de 10 a cerca de 3.000 nucleotídeos (p.ex., de 30 a 50, de 30 a 100, de 30 a 250, de 30 a 500, de 30 a 750, de 30 a 1.000, de 30 a 1.500, de 30 a 2.000, de 30 a 2.500, de 50 a 100, de 50 a 250, de 50 a 500, de 50 a 750, de 50 a 1.000, de 50 a 1.500, de 50 a 2.000, de 50 a 2.500, de 50 a 3.000, de 100 a 500, de 100 a 750, de 100 a 1.000, de 100 a 1.500, de 100 a 2.000, de 100 a 2.500, de 100 a 3.000, de 500 a 750, de 500 a 1.000, de 500 a 1.500, de 500 a 2.000, de 500 a 2.500, de 500 a 3.000, de 1.000 a 1.500, de 1.000 a 2.000, de 1.000 a 2.500, de 1.000 a 3.000, de 1.500 a 2.000, de 1.500 a 2.500, de 1.500 a 3.000, de 2.000 a 3.000, de 2.000 a 2.500 e de 2.500 a 3.000).

[0206] Em algumas modalidades, a sequência de poli-A é desenhada em relação ao comprimento do polirribonucleotídeo circular global. O desenho pode ser baseado no comprimento da região codificante, no comprimento de uma característica

ou região particular (tal como a primeira ou regiões flanqueantes) ou baseado no comprimento do produto final expresso a partir do polirribonucleotídeo circular. Em este contexto, a sequência de poli-A pode ser 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100% maior em comprimento do que o polirribonucleotídeo circular ou uma sua característica. A sequência de poli-A pode ser também desenhada como uma fração do polirribonucleotídeo circular. Em este contexto, a sequência de poli-A pode ser 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais do comprimento total do construto ou do comprimento total do construto menos a sequência de poli-A. Adicionalmente, os locais de ligação manipulados e a conjugação de polirribonucleotídeo circular para a proteína de ligação a Poli-A podem intensificar a expressão.

[0207] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é desenhado para incluir um quarteto de poliA-G. O quarteto de G é um arranjo ligado a hidrogênio cíclico de quatro nucleotídeos de guanina que pode ser formado por sequências ricas em G tanto em DNA como em RNA. Em algumas modalidades, o quarteto de G pode ser incorporado no final da sequência de poli-A. O construto de polirribonucleotídeo circular resultante pode ser analisado quanto à estabilidade, produção de proteínas e/ou outros parâmetros incluindo meia-vida em vários pontos temporais. Em algumas modalidades, o quarteto de poliA-G pode resultar em produção de proteínas equivalente a pelo menos 75% daquela vista usando uma sequência de poli-A de 120 nucleotídeos sozinha.

Riboswitches

[0208] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende um ou mais *riboswitches*.

[0209] Um *riboswitch* pode ser uma parte do polirribonucleotídeo circular que pode diretamente se ligar a uma molécula pequena alvo, e cuja ligação do alvo afeta a tradução do RNA e a estabilidade e atividade do produto de expressão. Assim, o polirribonucleotídeo circular que inclui um *riboswitch* pode regular a atividade do polirribonucleotídeo circular dependendo da presença ou ausência da molécula alvo. Em algumas modalidades, um *riboswitch* tem uma região de afinidade tipo aptâmero para uma molécula separada. Qualquer aptâmero incluído em um ácido nucleico não codificante pode ser usado para sequestro de moléculas a partir de grandes volumes. Em algumas modalidades, a atividade de "*(ribo)switch*" pode ser usada para relatar o evento a jusante.

[0210] Em algumas modalidades, o *riboswitch* modula a expressão de genes por terminação transcricional, inibição da iniciação da tradução, autoclivagem de mRNA e, em eucariotas, alteração das vias de *splicing*. O *riboswitch* pode controlar a expressão de genes através da ligação ou remoção de uma molécula de desencadeamento. Assim, a sujeição de um polirribonucleotídeo circular que inclui o *riboswitch* a condições que ativam, desativam ou bloqueiam o *riboswitch* pode alterar a expressão de genes. Por exemplo, a expressão de genes pode ser alterada em resultado da terminação da transcrição ou bloqueio da ligação do ribossomo ao RNA. A ligação de uma molécula de desencadeamento, ou de um análogo desta, pode reduzir/prevenir a expressão ou promover/aumentar a expressão da molécula de RNA dependendo da natureza do *riboswitch*.

[0211] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de Cobalamina (também elemento B12), que se liga à adenosilcobalamina (a forma de coenzima da vitamina B12) para regular a biossíntese e transporte de cobalamina e metabolitos similares.

[0212] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de di-GMP cíclico, que se liga ao di-GMP cíclico para regular uma variedade de genes. Existem duas classes não relacionadas estruturalmente de *riboswitch* cíclico di-GMP: di-GMP-I cíclico e di-GMP-II cíclico.

[0213] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de FMN (também elemento RFN) que se liga ao mononucleotídeo de flavina (FMN) para regular a biossíntese e transporte de riboflavina.

[0214] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de glmS, que se cliva quando existe uma concentração suficiente de glucosamina-6-fosfato.

[0215] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de glutamina, que liga à glutamina para regular genes envolvidos no metabolismo da glutamina e nitrogênio. *Riboswitches* de glutamina também se ligam a curtos peptídeos de função desconhecida. Esses *riboswitches* se enquadram em duas classes estruturalmente relacionadas: o motivo de RNA glnA e o motivo do peptídeo a jusante.

[0216] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de glicina, que liga à glicina para regular genes do metabolismo da glicina. Compreende dois domínios de aptâmeros adjacentes no mesmo mRNA e é o único RNA natural conhecido que exhibe ligação cooperativa.

[0217] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de lisina (também caixa L), que se liga à lisina para regular a biossíntese, catabolismo e transporte da lisina.

[0218] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de preQ1, que liga à pré-queuosina para regular genes envolvidos na síntese ou transporte deste precursor da queuosina. Duas classes distintas de *riboswitches* preQ1 são *riboswitches* preQ1-I e *riboswitches* preQ1-II. O domínio de ligação dos *riboswitches* de preQ1-I é incomumente pequeno entre os *riboswitches* ocorrendo naturalmente. Os *riboswitches* de PreQ1-II, que são somente encontrados em certas espécies nos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus*, têm uma estrutura completamente diferente e são maiores do que os *riboswitches* preQ1-I.

[0219] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de purina, que liga a purinas para regular genes o metabolismo e transporte da purina. Diferentes formas de *riboswitches* de purina ligam guanina ou adenina. A especificidade para guanina ou adenina depende das interações de Watson-Crick com uma única pirimidina no *riboswitch* na posição Y74. No *riboswitch* guanina, a única pirimidina é a citosina (isto é, C74). No *riboswitch* de adenina, a única pirimidina é o uracil (isto é, U74). Os tipos homólogos de *riboswitches* de purina podem se ligar à desoxiguanosina, mas têm diferenças mais significativas do que uma única mutação de nucleotídeo.

[0220] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* S-adenosil-homocisteína (SAH), que se liga a SAH para regular genes envolvidos na reciclagem de SAH produzido a partir de S-adenosilmetionina (SAM) em reações de metilação.

[0221] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de S-adenosil metionina (SAM), que se liga ao SAM para regular a biossíntese e transporte de metionina e SAM. Existem três *riboswitches* de SAM distintos: SAM-I (originalmente chamado caixa S), SAM-II e o de caixa SMK. SAM-I é comum em bactérias. SAM-II é encontrado somente em α -, β - e algumas γ -proteobactérias. O *riboswitch* de caixa de SMK é encontrado em Lactobacillales. Essas três variedades de *riboswitch* não têm sequência óbvia ou semelhanças estruturais. Uma quarta variedade, SAM-IV, parece ter um núcleo de ligação ao ligando similar àquele de SAM-I, mas no contexto de um molde distinto.

[0222] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de SAM-SAH, que liga tanto a SAM como a SAH com afinidades similares.

[0223] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de tetra-hidrofolato, que liga ao tetra-hidrofolato para regular genes de síntese transporte.

[0224] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de ligação à teofilina ou um *riboswitch* de ligação ao pirofosfato de timina.

[0225] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* catalítico *glmS* de *Thermoanaerobacter tengcongensis*, que detecta o fosfato de glucosamina-6.

[0226] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* pirofosfato de tiamina (TPP) (também caixa-Thi), que se liga a TPP para regular a biossíntese e transporte de tiamina, bem como o transporte de metabólitos semelhantes. O *riboswitch* de TPP é encontrado em eucariotos.

[0227] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* Moco, que liga ao cofator de molibdênio, para regular genes envolvidos na biossíntese e transporte desta coenzima, bem como enzimas que o usam molibdênio ou seus derivados como cofator.

[0228] Em algumas modalidades, o *riboswitch* é um *riboswitch* de add-A de detecção da adenina, encontrado na 5' UTR do gene codificando adenina desaminase (add) de *Vibrio vulnificus*.

Aptazima

[0229] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma aptazima. A aptazima é um comutador para expressão condicional na qual uma região de aptâmero é usada como um elemento de controle alostérico e acoplada a uma região de RNA catalítico (uma "ribozima" como descrito em baixo). Em algumas modalidades, a aptazima é ativa em tradução específica de tipos de células. Em algumas modalidades, a aptazima é ativa sob tradução específica do estado celular, p.ex., células viralmente infectadas ou na presença de ácidos nucleicos ou proteínas virais.

[0230] Uma ribozima é uma molécula de RNA que catalisa uma reação química. Muitas ribozimas naturais podem catalisar a hidrólise das ligações fosfodiéster da própria ribozima ou a hidrólise das ligações fosfodiéster em outro RNA. As ribozimas naturais também podem catalisar a atividade aminotransferase do ribossomo. O RNA catalítico pode ser "evoluído" por métodos in vitro. Ribozimas e produtos de reação de ribozimas podem regular a expressão gênica. Em algumas modalidades, um RNA catalítico ou ribozima pode ser colocado dentro de um RNA não codificante maior, de modo que

a ribozima esteja presente em muitas cópias dentro da célula para transformação química de uma molécula de um volume total. Em algumas modalidades, aptâmeros e ribozimas podem ser codificados no mesmo RNA não codificante.

[0231] Exemplos não limitativos de ribozimas incluem ribozima cabeça de martelo, ribozima VL, leadzima e ribozima em grampo.

[0232] Em algumas modalidades, a aptazima é uma ribozima que pode clivar sequências de RNA e pode ser regulada em resultado da ligação de ligando ou modulador. A ribozima pode ser uma ribozima autoclivável. Como tal, essas ribozimas podem combinar as propriedades das ribozimas e aptâmeros.

[0233] Em algumas modalidades, a aptazima está incluída em uma região não traduzida de polirribonucleotídeos circulares descritos aqui. Uma aptazima na ausência de ligante/modulador é inativa, o que pode permitir a expressão do transgene. A expressão pode ser desligada ou subregulada por adição do ligando. As aptazimas que são subreguladas em resposta à presença de um modulador particular podem ser usadas em sistemas de controle onde é desejada sobrerregulação da expressão de genes em resposta ao modulador.

[0234] As aptazimas também podem ser usadas para desenvolver sistemas para auto-regulação da expressão de polirribonucleotídeos circulares. Por exemplo, o produto de proteína de polirribonucleotídeos circulares aqui descritos que é a enzima determinante da taxa na síntese de uma molécula pequena particular pode ser modificada para incluir uma aptazima que é selecionada para ter atividade catalítica

aumentada na presença da molécula pequena para fornecer um circuito de retroalimentação autoregulador para a síntese da molécula. Alternativamente, a atividade de aptazima pode ser selecionada para ser sensível ao acúmulo do produto de proteína a partir do polirribonucleotídeo circular ou qualquer outra macromolécula celular.

[0235] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir uma sequência de aptâmero. Exemplos não limitativos de aptâmeros incluem aptâmeros de RNA que se ligam à lisozima, Toggle-25t (um aptâmero de RNA contendo nucleotídeos 2'-fluoropirimidina que se liga à trombina com alta especificidade e afinidade), RNA-Tat que se liga ao elemento responsivo de ação trans do vírus da imunodeficiência humana (HIV TAR), aptâmeros de RNA que se ligam à hemina, aptâmeros de RNA que se ligam ao interferon γ , aptâmeros de RNA que se ligam ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), aptâmeros de RNA que se ligam antígeno específico da próstata (PSA), aptâmeros de RNA que se ligam à dopamina e aptâmeros de RNA que se ligam ao fator de choque térmico 1 (HSF1).

[0236] Em algumas modalidades, o circRNA aqui descrito pode ser usado para transcrição e replicação de RNA. Por exemplo, o circRNA pode ser usado para codificar RNA não codificante, lncRNA, miRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, ncRNA, siRNA ou shRNA. Em algumas modalidades, o circRNA pode incluir miRNA antissenso e um elemento de transcrição. Após a transcrição, esse circRNA pode produzir miRNAs lineares funcionais. Exemplos não limitativos de aplicações da expressão e modulação de circRNA estão listados na TABELA 5.

TABELA 4

Processo	MOA (exemplo)
Terapia combinatória de inibição e tradução	Inibição de uma proteína e suplementação de outra (ou mesma)

Elemento de replicação

[0237] O polirribonucleotídeo circular pode codificar uma sequência e/ou motivo úteis para replicação. A replicação de um polirribonucleotídeo circular pode ocorrer por geração de um polirribonucleotídeo circular do complemento. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui um motivo para iniciar a transcrição, onde a transcrição é dirigida por máquinas celulares endógenas (RNA polimerase dependente de DNA) ou uma polimerase RNA dependente de RNA codificada pelo polirribonucleotídeo circular. O produto do evento transcricional de círculo rolante pode ser cortado por uma ribozima para gerar polirribonucleotídeo circular complementar ou propagado no comprimento unitário. As ribozimas podem ser codificadas pelo polirribonucleotídeo circular, seu complemento ou por uma sequência de RNA em *trans*. Em algumas modalidades, as ribozimas codificadas podem incluir uma sequência ou motivo que regula (inibe ou promove) a atividade da ribozima para controlar a propagação de circRNA. Em algumas modalidades, as sequências de comprimento unitário podem ser ligadas em uma forma circular por uma RNA ligase celular. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui um elemento de replicação que auxilia na autoamplificação. Exemplos de tais elementos de replicação incluem domínios de replicação de HDV e de ribozimas antissenso e/ou senso de RNA circular

competente para replicação, tais como antígenômico 5'-
CGGGUCGGCAUGGCAUCUCCACCUCUCGCGGUCCGACCUGGGCAUCCGAAGGAGGACG
CACGUCCACUCGGAUGGCUAAGGGAGAGCCA-3' (SEQ ID NO: 1) ou
genômico 5'-
UGGCCGGCAUGGUCCCAGCCUCCUCGCUGGCGCCGGCUGGGCAACAUUCCGAGGGGACC
GUCCCCUCGGUAAUGGCGAAUGGGACCCA-3' (SEQ ID NO: 2).

[0238] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma sequência de clivagem conforme descrito neste documento para auxiliar na replicação. Uma sequência de clivagem dentro do polirribonucleotídeo circular pode clivar transcritos longos replicados a partir do polirribonucleotídeo circular até um comprimento específico que pode subsequentemente circularizar para formar um complemento do polirribonucleotídeo circular.

[0239] Em outra modalidade, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma sequência de ribozima para clivar transcritos longos replicados a partir do polirribonucleotídeo circular até um comprimento específico, onde outra ribozima codificada corta os transcritos na sequência de ribozima. A circularização forma um complemento do polirribonucleotídeo circular.

[0240] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é substancialmente resistente à degradação, p.ex., por exonucleases.

[0241] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular se replica dentro de uma célula. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular se replica dentro de uma célula a uma taxa de entre cerca de 10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95%, 95%-99% ou qualquer

percentagem intermédia. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é replicado dentro de uma célula e é passado para as células-filhas. Em algumas modalidades, uma célula passa pelo menos um polirribonucleotídeo circular para células-filhas com uma eficiência de pelo menos 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99%. Em algumas modalidades, a célula sofrendo meiose passa o polirribonucleotídeo circular para células-filhas com uma eficiência de pelo menos 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99%. Em algumas modalidades, uma célula sofrendo mitose passa o polirribonucleotídeo circular para células-filhas com uma eficiência de pelo menos 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99%.

[0242] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular se replica dentro da célula hospedeira. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é capaz de se replicar em uma célula de mamífero, p.ex., célula humana.

[0243] Enquanto em algumas modalidades o polirribonucleotídeo circular se replique na célula hospedeira, o polirribonucleotídeo circular não se integra no genoma do hospedeiro, p.ex., com os cromossomos do hospedeiro. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma frequência de recombinação negligenciável, p.ex., com os cromossomos do hospedeiro. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma frequência de recombinação, p.ex., menor do que cerca de 1,0 cM/Mb, 0,9 cM/Mb, 0,8 cM/Mb, 0,7 cM/Mb, 0,6 cM/Mb, 0,5 cM/Mb, 0,4 cM/Mb, 0,3 cM/Mb, 0,2 cM/Mb, 0,1 cM/Mb ou menor, p.ex., com os cromossomos do hospedeiro.

Outras sequências

[0244] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui adicionalmente outra sequência de ácido nucleico. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir DNA, RNA ou sequências de ácido nucleico artificiais. As outras sequências podem incluir, mas não estão limitadas a, DNA genômico, cDNA ou sequências que codificam tRNA, mRNA, rRNA, miRNA, gRNA, siRNA ou outras moléculas de RNAi. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência que codifica um siRNA para direcionar um locus ou loci diferente do mesmo produto de expressão gênica que o polirribonucleotídeo circular. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência que codifica um siRNA para direcionar um produto de expressão gênica diferente como o polirribonucleotídeo circular.

[0245] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular não tem uma 5'-UTR. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular não tem uma 3'-UTR. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular não tem uma sequência de poli-A. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular não tem uma sequência de terminação. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular não tem um local interno de entrada ribossômica. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular não tem suscetibilidade à degradação por exonucleases. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular carece de ligação a proteínas de ligação a cap. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular não tem um cap em 5'.

[0246] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma ou mais das seguintes sequências: uma sequência que codifica um ou mais miRNA, uma sequência que codifica uma ou mais proteínas de replicação, uma sequência que codifica um gene exógeno, uma sequência que codifica uma sequência terapêutica, reguladora (por exemplo, um promotor, intensificador), uma sequência que codifica uma ou mais sequências reguladoras que visam genes endógenos (siRNA, lncRNAs, shRNA) e uma sequência que codifica um mRNA ou proteína terapêutica.

[0247] A outra sequência pode ter um comprimento de cerca de 2 a cerca de 5.000 nts, cerca de 10 a cerca de 100 nts, cerca de 50 a cerca de 150 nts, cerca de 100 a cerca de 200 nts, cerca de 150 a cerca de 250 nts, cerca de 200 a cerca de 300 nts, cerca de 250 a cerca de 350 nts, cerca de 300 a cerca de 500 nts, cerca de 10 a cerca de 1.000 nts, cerca de 50 a cerca de 1.000 nts, cerca de 100 a cerca de 1.000 nts, cerca de 1.000 a cerca de 2.000 nts, cerca de 2.000 a cerca de 3.000 nts, cerca de 3.000 a cerca de 4.000 nts, cerca de 4.000 a cerca de 5.000 nts, ou qualquer gama entre eles.

[0248] Em resultado de sua circularização, o polirribonucleotídeo circular pode incluir certas características que o distinguem do RNA linear. Por exemplo, o polirribonucleotídeo circular é menos suscetível à degradação por exonuclease em comparação com o RNA linear. Como tal, o polirribonucleotídeo circular é mais estável do que um RNA linear, especialmente quando incubado na presença de uma exonuclease. A estabilidade aumentada do polirribonucleotídeo circular em comparação com o RNA linear torna o polirribonucleotídeo circular mais útil como um

reagente de transformação de células para produzir polipeptídeos e pode ser armazenado mais facilmente e durante mais tempo do que o RNA linear. A estabilidade do polirribonucleotídeo circular tratado com exonuclease pode ser testada usando métodos padrão na técnica que determinam se a degradação do RNA ocorreu (p.ex., por eletroforese em gel).

[0249] Além disso, ao contrário do RNA linear, o polirribonucleotídeo circular é menos suscetível à desfosforilação quando o polirribonucleotídeo circular é incubado com fosfatase, tal como fosfatase do intestino de bezerro.

Sequências espaçadoras de nucleotídeos

[0250] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma sequência espaçadora.

[0251] O espaçador pode ser uma molécula de ácido nucleico com baixo teor de GC, por exemplo, menos de 65%, 60%, 55%, 50%, 55%, 50%, 45%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31 %, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11 %, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1%, ao longo do comprimento total do espaçador, ou ao longo de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de resíduos de ácido nucleico contíguos do espaçador. Em algumas modalidades, o espaçador está substancialmente isento de uma estrutura secundária, tal como menos do que 40 kcal/mol, menos do que -39, -38, -37, -36, -35, -34, -33, -32, -31, -30, -29, -28, -27, -26, -25, -24, -23, -22, -20, -19, -18, -17, -16, -15, -14, -13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6, -5,

-4, -3, -2 ou -1 kcal/mol. O espaçador pode incluir um ácido nucleico, tal como DNA ou RNA.

[0252] A sequência espaçadora pode codificar uma sequência de RNA e preferencialmente uma sequência de proteína ou peptídeo, incluindo um peptídeo de sinal de secreção.

[0253] A sequência espaçadora pode ser não codificante. Quando o espaçador é uma sequência não codificante, um códon de início pode ser fornecido na sequência de codificação de uma sequência adjacente. Em algumas modalidades, considera-se que o primeiro resíduo de ácido nucleico da sequência de codificação pode ser o resíduo A de um códon de início, tal como AUG. Quando o espaçador codifica um RNA ou proteína ou sequência de peptídeo, um códon de início pode ser fornecido na sequência espaçadora.

[0254] Em algumas modalidades, o espaçador está operacionalmente ligado a outra sequência descrita aqui.

Ligantes diferentes de ácido nucleico

[0255] O polirribonucleotídeo circular descrito aqui pode também compreender um ligante diferente de ácido nucleico. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular descrito aqui tem um ligante diferente de ácido nucleico entre uma ou mais das sequências ou elementos descritos aqui. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências ou elementos descritos aqui estão ligados com o ligante. O ligante diferente de ácido nucleico pode ser uma ligação química, p.ex., uma ou mais ligações covalentes ou ligações não covalentes. Em algumas modalidades, o ligante diferente de ácido nucleico é um ligante de peptídeo ou proteína. Um tal ligante pode ter entre 2-30 aminoácidos ou mais. O ligante

inclui quaisquer ligantes flexíveis, rígidos ou cliváveis descritos aqui.

[0256] Os ligantes flexíveis mais comumente usados têm sequências consistindo maioritariamente em trechos de resíduos de Gly e Ser (ligante "GS"). Os ligantes flexíveis podem ser úteis para unir domínios que requerem um certo grau de movimento ou interação e podem incluir aminoácidos pequenos, não polares (p.ex., Gly) ou polares (p.ex., Ser ou Thr). A incorporação de Ser ou Thr pode também manter a estabilidade do ligante em soluções aquosas por formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água e, portanto, reduzir as interações desfavoráveis entre o ligante e as frações de proteína.

[0257] Os ligantes rígidos são úteis para manter uma distância fixa entre domínios e para manter suas funções independentes. Os ligantes rígidos podem ser também úteis quando uma separação espacial dos domínios é crítica para conservar a estabilidade ou bioatividade de um ou mais componentes na fusão. Os ligantes rígidos podem ter uma estrutura em hélice alfa ou sequência rica em Pro, $(XP)_n$, com X designando qualquer aminoácido, preferencialmente Ala, Lys ou Glu.

[0258] Os ligantes cliváveis podem liberar domínios funcionais livres *in vivo*. Em algumas modalidades, os ligantes podem ser clivados sob condições específicas, tais como a presença de reagentes redutores ou proteases. Os ligantes cliváveis *in vivo* podem utilizar a natureza reversível de uma ligação de dissulfeto. Um exemplo inclui uma sequência sensível à trombina (p.ex., PRS) entre os dois resíduos de Cys. O tratamento com trombina *in vitro* de CPRSC

resulta na clivagem da sequência sensível à trombina, enquanto a ligação de dissulfeto reversível permanece intata. A clivagem *in vivo* de ligantes em fusões pode ser também levada a cabo por proteases que são expressas *in vivo* sob condições patológicas (p.ex., câncer ou inflamação), em células ou tecidos específicos, ou restritas dentro de certos compartimentos celulares. A especificidade de muitas proteases oferece clivagem mais lenta do ligante em compartimentos restritos.

[0259] Exemplos de moléculas de ligação incluem um ligante hidrofóbico, tal como um grupo sulfonato negativamente carregado; lipídeos, tais como uma cadeia de poli (-CH₂-ídeos, tais como poli (-CH₂-g grupo polietilenoglicol (PEG), suas variantes insaturadas, suas variantes hidroxiladas, suas variantes amidadas ou de outro modo contendo N, ligantes diferentes de carbono; ligantes de carboidratos; ligantes de fosfodiéster ou outra molécula capaz de ligar covalentemente dois ou mais polipeptídeos. Ligantes não covalentes são também incluídos, tais como glóbulos de lipídeos hidrofóbicos aos quais o polipeptídeo está ligado, por exemplo através de uma região hidrofóbica do polipeptídeo ou uma extensão hidrofóbica do polipeptídeo, tal como uma série de resíduos ricos em leucina, isoleucina, valina ou, talvez, também alanina, fenilalanina ou, mesmo, tirosina, metionina, glicina ou outro resíduo hidrofóbico. O polipeptídeo pode estar ligado usando química à base da carga, de modo que uma fração positivamente carregada do polipeptídeo esteja ligada a uma carga negativa de outro polipeptídeo ou ácido nucleico.

Circularização

[0260] Em algumas modalidades, um polirribonucleotídeo circular linear pode ser ciclizado ou concatemerizado. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular linear pode ser ciclizado in vitro antes da formulação e/ou administração. Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares lineares podem ser ciclizados dentro de uma célula.

Circularização extracelular

[0261] Em algumas modalidades, um polirribonucleotídeo circular linear é ciclizado ou concatemerizado usando um método químico para formar um polirribonucleotídeo circular. Em alguns métodos químicos, a extremidade 5' e a extremidade 3' do ácido nucleico (p.ex., um polirribonucleotídeo circular linear) incluem grupos quimicamente reativos que, quando próximos, podem formar uma nova ligação covalente entre a extremidade 5' e a extremidade 3' da molécula. A extremidade 5' pode conter um grupo reativo NHS-éster e a extremidade 3' pode conter um nucleotídeo terminado em 3'-amino de modo que em um solvente orgânico o nucleotídeo terminado em 3'-amino na extremidade 3' de uma molécula de RNA linear sofrerá um ataque nucleofílico na porção de 5'-NHS-éster formando uma nova ligação de 5'- ou 3'-amida.

[0262] Em algumas modalidades, uma DNA ou RNA ligase pode ser usada para ligar enzimaticamente uma molécula de ácido nucleico 5'-fosforilada (p.ex., um polirribonucleotídeo circular linear) ao grupo 3'-hidroxila de um ácido nucleico (p.ex., um ácido nucleico linear) formando uma nova ligação de fosfodiéster. Em uma reação exemplificativa, um polirribonucleotídeo circular linear é incubado a 37 °C

durante 1 hora com 1-10 unidades de RNA ligase T4 de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de ligação pode ocorrer na presença de um ácido nucleico linear capaz de emparelhar em termos de bases com ambas as regiões 5' e 3' em justaposição para auxiliar a reação de ligação enzimática.

[0263] Em algumas modalidades, uma DNA ou RNA ligase pode ser usada na síntese dos polinucleotídeos circulares. Como um exemplo não limitante, a ligase pode ser uma ligase circ ou ligase circular.

[0264] Em algumas modalidades, a extremidade 5' ou 3' do polirribonucleotídeo circular linear pode codificar uma sequência de ribozima de ligase de modo que, durante a transcrição *in vitro*, o polirribonucleotídeo circular linear resultante inclua uma sequência de ribozima ativa capaz de ligar a extremidade 5' do polirribonucleotídeo circular linear até à extremidade 3' do polirribonucleotídeo circular linear. A ribozima de ligase pode ser derivada do Íntron de Grupo I, Vírus da Hepatite Delta, Ribozima de gancho de cabelo ou pode ser selecionada por SELEX (evolução sistemática de ligandos por enriquecimento exponencial). A reação de ribozima de ligase pode levar 1 a 24 horas a temperaturas entre 0 e 37 °C.

[0265] Em algumas modalidades, um polirribonucleotídeo circular linear pode ser ciclizado ou concatermerizado por uso de pelo menos uma fração diferente de ácido nucleico. Em um aspecto, a pelo menos uma fração diferente de ácido nucleico pode reagir com regiões ou características próximas do terminal 5' e/ou próximas do terminal 3' do polirribonucleotídeo circular linear de modo a ciclizar ou concatermerizar o polirribonucleotídeo circular linear. Em

outro aspecto, a pelo menos uma fração diferente de ácido nucleico pode estar localizada no ou ligada ao ou próxima do terminal 5' e/ou terminal 3' do polirribonucleotídeo circular linear. As frações diferentes de ácido nucleico contempladas podem ser homólogas ou heterólogas. Como um exemplo não limitante, a fração diferente de ácido nucleico pode ser uma ligação tal como uma ligação hidrofóbica, ligação iônica, uma ligação biodegradável e/ou uma ligação clivável. Como outro exemplo não limitante, a fração diferente de ácido nucleico é uma fração de ligação. Ainda como outro exemplo não limitante, a fração diferente de ácido nucleico pode ser uma fração de oligonucleotídeo ou peptídeo, tal como um aptâmero ou um ligante diferente de ácido nucleico como descrito aqui.

[0266] Em algumas modalidades, um polirribonucleotídeo circular linear pode ser ciclizado ou concatermerizado devido a uma fração diferente de ácido nucleico que causa uma atração entre átomos, superfícies moleculares nas, próximas das ou ligadas às extremidades 5' e 3' do polirribonucleotídeo circular linear. Como um exemplo não limitante, um ou mais polirribonucleotídeos circulares lineares podem ser ciclizados ou concatemizados por forças intermoleculares ou forças intramoleculares. Exemplos não limitantes de forças intermoleculares incluem forças dipolo-dipolo, forças dipolo induzidas por dipolo, forças dipolo induzidas por dipolo induzido, forças de Van der Waals e forças de dispersão de London. Exemplos não limitantes de forças intramoleculares incluem ligações covalentes, ligações metálicas, ligações iônicas, ligações ressonantes,

ligações agnósticas, ligações dipolares, conjugação, hiperconjugação e antiligação.

[0267] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular linear pode compreender uma sequência de RNA de ribozima próxima do terminal 5' e próxima do terminal 3'. A sequência de RNA de ribozima pode se ligar covalentemente a um peptídeo quando a sequência é exposta ao restante da ribozima. Em um aspecto, os peptídeos covalentemente ligados à sequência de RNA de ribozima próxima do terminal 5' e do terminal 3' podem se associar entre si fazendo com que um polirribonucleotídeo circular linear ciclize ou concatemerize. Em outro aspecto, os peptídeos covalentemente ligados ao RNA de ribozima próximo do terminal 5' e do terminal 3' podem fazer com que o construto primário linear ou mRNA linear ciclize ou concatemerize após ter sido sujeito à ligação usando vários métodos conhecidos na técnica tais como, mas não se limitando a, ligação de proteínas.

[0268] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular linear pode incluir um 5' trifosfato do ácido nucleico convertido em um 5' monofosfato, p.ex., por contato do 5' trifosfato com RNA 5' pirofosfo-hidrolase (RppH) ou uma ATP difosfo-hidrolase (apirase). Alternativamente, a conversão do 5' trifosfato do polirribonucleotídeo circular linear em um 5' monofosfato pode ocorrer por uma reação em dois passos compreendendo: (a) contato do 5' nucleotídeo do polirribonucleotídeo circular linear com uma fosfatase (p.ex., Fosfatase Antártica, Fosfatase Alcalina de Camarão ou Fosfatase Intestinal de Bezerro) para se removerem todos os três fosfatos; e (b) contato do 5' nucleotídeo após o

passo (a) com uma cinase (p.ex., Polinucleotídeo Cinase) que adiciona um único fosfato.

Elemento de splicing

[0269] Em alguma modalidade, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos um elemento de *splicing*. Em algumas modalidades, o elemento de *splicing* é adjacente a pelo menos uma sequência de expressão. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui um elemento de *splicing* adjacente a cada sequência de expressão. Em algumas modalidades, o elemento de *splicing* está em um dos ou ambos os lados de cada sequência de expressão, levando à separação dos produtos de expressão, p.ex., peptídeo(s) e/ou polipeptídeo(s).

[0270] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui um elemento de *splicing* interno que quando replicado as extremidades *spliced* são unidas. Alguns exemplos podem incluir íntrons miniatura (<100 nt) com sequências de locais de *splice* e curtas repetições invertidas (30-40 nt) tais como AluSq2, AluJr e AluSz, sequências invertidas em íntrons flanqueantes, elementos Alu em íntrons flanqueantes e motivos encontrados em (motivos enriquecidos em *suptable4*) elementos de sequência cis próximos de eventos de *backsplice* tais como sequências nas 200 pb precedendo (a montante de) ou após (a jusante de) um local de *backsplice* com éxons flanqueantes. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma sequência de nucleotídeos repetitiva descrita em outro lugar aqui como um elemento de *splicing* interno. Em tais modalidades, a sequência de nucleotídeos repetitiva pode incluir sequências repetidas da família Alu de íntrons. Em

algumas modalidades, uma proteína de ligação ao ribossomo relacionada com o *splicing* pode regular a biogênese de polirribonucleotídeos circulares, p.ex., os fatores de *splicing* Muscleblind e Quaking (QKI).

[0271] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir locais de *splice* canônicos que flanqueiam as junções cabeça-para-cauda do polirribonucleotídeo circular.

[0272] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir um motivo de protuberância-hélice-protuberância, compreendendo uma haste de 4 pares de bases flanqueada por duas protuberâncias de 3 nucleotídeos. A clivagem ocorre em um local na região de protuberância, gerando fragmentos característicos com grupo 5'-hidroxila terminal e fosfato 2',3'-cíclico. A circularização prossegue por ataque nucleofílico do grupo 5'-OH no fosfato 2',3'-cíclico da mesma molécula formando uma ponte de 3',5'-fosfodiéster.

[0273] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir uma sequência de RNA repetitiva multimérica que abriga um elemento de HPR. O HPR compreende um fosfato 2',3'-cíclico e um terminal 5'-OH. O elemento HPR autoprocessa as extremidades 5' e 3' do polirribonucleotídeo circular linear, ligando deste modo as extremidades em conjunto.

[0274] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir uma sequência que medeia a autoligação. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir uma sequência de HDV (p.ex., sequência conservada no domínio de replicação de HDV,

GGCUCAUCUCGACAAGAGGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUUCUGUAAAGAGGA
GACUGCUGGACUCGCCGCCCAAGUUCGAGCAUGAGCC (SEQ ID NO: 3)
(Beeharry et al 2004) ou
GGCUAGAGGGCGGCAGUCCUCAGUACUCUUACUCUUUUCUGUAAAGAGGAGACUGCUGGA
CUCGCCGCCCGAGCC (SEQ ID NO: 4)) para autoligar. Em algumas
modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir a
sequência de alça E (p.ex., em PSTVd) para se autoligar. Em
outra modalidade, o polirribonucleotídeo circular pode
incluir um íntron autocircularizante, p.ex., uma junção de
fatias 5' e 3', ou um íntron catalítico autocircularizante
tal como um Íntron do Grupo I, Grupo II ou Grupo III. Exemplos
não limitantes de sequências de *self-splicing* de íntron do
grupo I podem incluir sequências de íntron-éxon permutadas
de *self-splicing* derivadas do gene do bacteriófago T4 td e
do rRNA da sequência intermediária (IVS) de *Tetrahymena*.

Outros métodos de circularização

[0275] Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos
circulares lineares podem incluir sequências complementares,
incluindo sequências de ácido nucleico repetitivas ou não
repetitivas dentro de íntrons individuais ou através de
íntrons flanqueantes. Sequências de ácido nucleico
repetitivas são sequências que ocorrem dentro de um segmento
do polirribonucleotídeo circular. Em algumas modalidades, o
polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência de ácido
nucleico repetitiva. Em algumas modalidades, a sequência de
nucleotídeos repetitiva inclui sequências de poli CA ou poli
UG. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular
inclui pelo menos uma sequência de ácido nucleico repetitiva
que hibrida com uma sequência de ácido nucleico repetitiva
complementar em outro segmento do polirribonucleotídeo

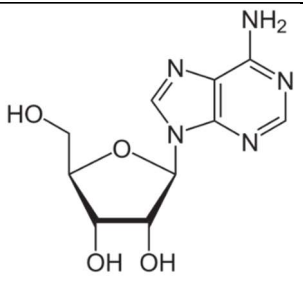
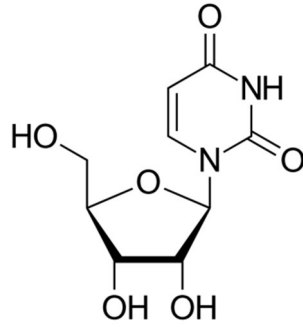
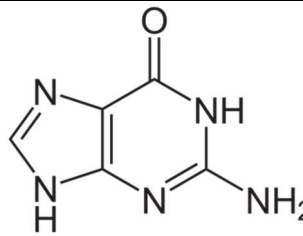
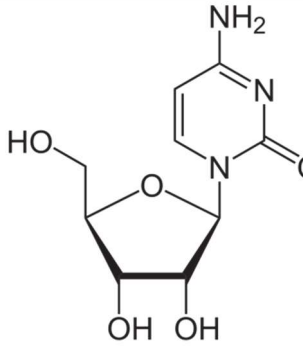
circular, com o segmento hibridado formando uma cadeia dupla interna. Em algumas modalidades, as sequências de ácido nucleico repetitivas e as sequências de ácido nucleico repetitivas complementares de dois polirribonucleotídeos circulares separados hibridam para gerar um único polirribonucleotídeo circularizado, com os segmentos hibridados formando cadeias duplas internas. Em algumas modalidades, as sequências complementares são encontradas nas extremidades 5' e 3' dos polirribonucleotídeos circulares lineares. Em algumas modalidades, as sequências complementares incluem cerca de 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 ou mais nucleotídeos emparelhados.

Modificações

[0276] Em alguns aspectos, a invenção descrita aqui compreende composições e métodos de uso e preparação de polirribonucleotídeos circulares modificados e administração de polirribonucleotídeos circulares modificados. O termo "nucleotídeo modificado" pode se referir a qualquer análogo de nucleotídeo ou derivado que tem uma ou mais modificações químicas na composição química de um ribonucleotídeo natural não modificado, tal como um nucleotídeo natural não modificado adenosina (A), uridina (U), guanina (G), citidina (C) como mostrado pelas fórmulas químicas na TABELA 5 e monofosfato. As modificações químicas do ribonucleotídeo modificado podem ser modificações em qualquer um ou mais grupos funcionais do ribonucleotídeo, tal como o açúcar a nucleobase ou a ligação internucleosídica (por exemplo, para

um fosfato de ligação/para uma ligação fosfodiéster/para a estrutura fosfodiéster).

TABELA 5 Ribonucleosídeos Naturais Não Modificados

Ribonucleosídeo	Nome IUPAC	Fórmula Química
Adenosina	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-2-(6-amino-9 <i>H</i> -purin-9-il)-5-(hidroximetil)oxolano-3,4-diol	 C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄
Uridina	1-[(3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidina-2,4-diona	 C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆
Guanina	2-amino-9 <i>H</i> -purin-6(1 <i>H</i>)-ona	 C ₅ H ₅ N ₅ O
Citidina	4-amino-1-[(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pyrimidin-2(1 <i>H</i>)-ona	 C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅

[0277] O polirribonucleotídeo circular pode incluir uma ou mais substituições, inserções e/ou adições, deleções e

modificações covalentes no que diz respeito às sequências de referência, em particular, o polirribonucleotídeo genitor, são incluídas dentro do escopo desta invenção. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma ou mais modificações pós-transcricionais (p.ex., *capping*, clivagem, poliadenilação, *splicing*, sequência de poli-A, metilação, acilação, fosforilação, metilação de resíduos de lisina e arginina, acetilação e nitrosilação de grupos tiol e resíduos de tirosina, etc.). O polirribonucleotídeo circular pode incluir qualquer modificação útil, tal como ao açúcar, à nucleobase ou à ligação internucleosídeos (p.ex., a um fosfato de ligação/a uma ligação de fosfodiéster/ao esqueleto de fosfodiéster). Um ou mais átomos de uma nucleobase de pirimidina podem estar reposicionados ou substituídos por amino opcionalmente substituído, tiol opcionalmente substituído, alquila opcionalmente substituída (p.ex., metila ou etila) ou halo (p.ex., cloro ou flúor). Em certas modalidades, modificações (p.ex., uma ou mais modificações) estão presentes em cada um do açúcar e da ligação internucleosídica. As modificações podem ser modificações de ácidos ribonucleicos (RNA) para ácidos desoxirribonucleicos (DNA), ácidos nucleicos de treose (TNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA), ácidos nucleicos de peptídeo (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) ou seus híbridos). Modificações adicionais são descritas aqui.

[0278] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma modificação de N(6)metiladenosina (m6A) para aumentar a eficiência de tradução.

[0279] Em algumas modalidades, a modificação pode incluir uma modificação induzida química ou celular. Por exemplo, alguns exemplos não limitantes de modificações de RNA intracelulares são descritos por Lewis e Pan em "RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions" a partir da *Nat Reviews Mol Cell Biol*, 2017, 18: 202-210.

[0280] "Pseudouridina" se refere, numa outra modalidade, a $m^1acp^3\Psi$ (1-metil-3- (3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina). Em outra modalidade, o termo se refere a $m^1\Psi$ (1-metilpseudouridina). Em outra modalidade, o termo se refere a $m\Psi$ (2'-O- metilpseudouridina). Em outra modalidade, o termo se refere a $m5D$ (5- metildi-hidrouridina). Em outra modalidade, o termo se refere a $m^3\Psi$ (3- metilpseudouridina). Em outra modalidade, o termo se refere a uma fração de pseudouridina que não é modificada posteriormente. Em outra modalidade, o termo se refere a um monofosfato, difosfato ou trifosfato de qualquer uma das pseudouridinas acima. Em outra modalidade, o termo se refere a qualquer outra pseudouridina conhecida na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0281] Em algumas modalidades, as modificações químicas aos ribonucleotídeos do polirribonucleotídeo circular podem intensificar o escape imunitário. As modificações incluem, por exemplo, modificações de extremidades, p.ex., modificações da extremidade 5' (fosforilação (mono-, di- e tri-), conjugação, ligações invertidas, etc.), modificações da extremidade 3' (conjugação, nucleotídeos de DNA, ligações invertidas, etc.), modificações de bases (p.ex., substituição por bases estabilizantes, bases

desestabilizantes ou bases que emparelham em termos de bases com um repertório expandido de parceiros), remoção de bases (nucleotídeos abásicos) ou bases conjugadas. As bases de ribonucleotídeos modificadas podem também incluir 5-metilcitidina e pseudouridina. Em algumas modalidades, as modificações de bases podem modular a expressão, resposta imunitária, estabilidade, localização subcelular, para nomear alguns efeitos funcionais, do polirribonucleotídeo circular. Em algumas modalidades, a modificação inclui nucleotídeo bi-ortogonal, p.ex., uma base não natural.

[0282] Em algumas modalidades, modificações de açúcar (p.ex., na posição 2' ou posição 4') ou substituição do açúcar de um ou mais ribonucleotídeos do polirribonucleotídeo circular podem, bem como modificações do esqueleto, incluir modificação ou substituição das ligações de fosfodiéster. Exemplos não limitativos de polirribonucleotídeo circular incluem polirribonucleotídeo circular com estruturas modificadas ou ligações internucleosídicas não naturais, tais como aqueles modificados ou substituídos das ligações fosfodiéster. Os polirribonucleotídeos circulares tendo esqueletos modificados incluem, entre outros, aqueles que não têm um átomo de fósforo no esqueleto. Para os propósitos deste pedido, e como por vezes referenciado na técnica, os RNAs modificados que não têm um átomo de fósforo em seu esqueleto internucleosídeos podem ser também considerados como sendo oligonucleosídeos. Em modalidades particulares, o polirribonucleotídeo circular incluirá ribonucleotídeos com um átomo de fósforo em seu esqueleto internucleosídeos.

[0283] Os esqueletos de polirribonucleotídeos circulares modificados podem incluir, por exemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirais, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfatos de metila e outras alquilas tais como fosfonatos de 3'-alquileno e fosfonatos quirais, fosfinatos, fosforamidatos tais como fosforamidato de 3'-amino e aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres e boranofosfatos tendo ligações 3'-5' normais, análogos ligados em 2'-5' destes e aqueles tendo polaridade inversa em que os pares adjacentes de unidades de nucleosídeos estão ligados 3'-5' para 5'-3' ou 2'-5' para 5'-2'. Vários sais, sais mistos e formas de ácidos livres são também incluídos. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode estar negativamente ou positivamente carregado.

[0284] Os nucleotídeos modificados, que podem ser incorporados no polirribonucleotídeo circular, podem ser modificados na ligação internucleosídeos (p.ex., esqueleto de fosfato). Aqui, no contexto do esqueleto de polinucleotídeo, as frases "fosfato" e "fosfodiéster" são usadas indistintamente. Os grupos fosfato do esqueleto podem ser modificados por substituição de um ou mais dos átomos de oxigênio por um substituinte diferente. Adicionalmente, os nucleósidos e nucleotídeos modificados podem incluir a substituição total de uma fração de fosfato não modificada por outra ligação internucleosídicos como descrito aqui. Exemplos de grupos fosfato modificados incluem, mas não estão limitados a, fosforotioato, fosforosselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato,

hidrogenofosfonatos, fosforamidatos, fosforodiamidatos, fosfonatos de alquila ou arila e fosfotriésteres. Os fosforoditioatos têm ambos os oxigênios não ligados substituídos por enxofre. O ligante de fosfato pode ser também modificado pela substituição de um oxigênio de ligação por nitrogênio (fosforamidatos em ponte), enxofre (fosforotioatos em ponte) e carbono (metileno-fosfonatos em ponte).

[0285] A fração de fosfato substituída por α -tio é proporcionada para conferir estabilidade aos polímeros de RNA e DNA através das ligações do esqueleto de fosforotioato não naturais. O DNA e RNA com fosforotioato têm resistência a nucleases aumentada e subseqüentemente uma meia-vida mais longa em um ambiente celular. É esperado que o fosforotioato ligado ao polirribonucleotídeo circular reduza a resposta imunitária inata através de ligação/ativação mais fracas das moléculas imunitárias celulares inatas.

[0286] Em algumas modalidades, um nucleosídeo modificado inclui um α -tio-nucleosídeo (p.ex., 5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina (α -tio-citidina), 5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-uridina ou 5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina). Outras ligações internucleosídicas podem incluir ligações internucleosídicas que não contêm um átomo de fósforo.

[0287] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular pode incluir um ou mais nucleosídeos citotóxicos. Por exemplo, os nucleosídeos citotóxicos podem ser incorporados no polirribonucleotídeo circular, tal como modificação bifuncional. Os nucleosídeos citotóxicos podem incluir, mas não estão limitados a, arabinosídeo de

adenosina, 5-azacitidina, 4'-tio-aracitidina, ciclopentenilcitosina, cladribina, clofarabina, citarabina, arabinosídeo de citosina, 1-(2-C-ciano-2-desóxi-beta-D-arabino-pentofuranosil)-citosina, decitabina, 5-fluorouracila, fludarabina, floxuridina, gencitabina, uma combinação de tegafur e uracila, tegafur ((R,S)-5-fluoro-1-(tetra-hidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona), troxacitabina, tezacitabina, 2'-desóxi-2'-metilidenocitidina (DMDC) e 6-mercaptopurina. Exemplos adicionais incluem fosfato de fludarabina, N4-be-henoil-1-beta-D-arabinofuranosilcitosina, N4-octadecil-1-beta-D-arabinofuranosilcitosina, N4-palmitoil-1-(2-C-ciano-2-desóxi-beta-D-arabino-pentofuranosil)citosina e P-4055 (éster do ácido 5'-elaídico de citarabina).

[0288] O polirribonucleotídeo circular pode ser uniformemente modificado ao longo do comprimento inteiro da molécula. Por exemplo, um ou mais dos ou todos os tipos de nucleotídeos (p.ex., nucleotídeos ocorrendo naturalmente, purina ou pirimidina ou qualquer um ou mais de ou todos os A, G, U, C, I, pU) podem ser uniformemente modificados no polirribonucleotídeo circular ou em uma sua dada região de sequência predeterminada. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma pseudouridina. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma inosina, que pode auxiliar no sistema imunitário caracterizando o polirribonucleotídeo circular como RNAs endógenos *versus* virais. A incorporação de inosina pode também mediar a estabilidade de RNA melhorada/degradação reduzida.

[0289] Em algumas modalidades, todos os nucleotídeos no polirribonucleotídeo circular (ou em uma sua dada região de sequência) são modificados. Em algumas modalidades, a modificação pode incluir um m6A, que pode aumentar a expressão; uma inosina, que pode atenuar uma resposta imunitária; pseudouridina, que pode aumentar a estabilidade de RNA ou leitura translacional (códon de terminação = potencial de codificação), um m5C, que pode aumentar a estabilidade; e uma 2,2,7-trimetilguanosina, que auxilia a translocação subcelular (p.ex., localização nuclear).

[0290] Diferentes modificações de açúcares, modificações de nucleotídeos e/ou ligações internucleosídeos (p.ex., estruturas de esqueleto) podem existir em várias posições no polirribonucleotídeo circular. Um perito na técnica apreciará que os análogos de nucleotídeos ou outra(s) modificação(ões) podem estar localizados em qualquer(qualsquer) posição(ões) do polirribonucleotídeo circular, de modo que a função do polirribonucleotídeo circular não seja substancialmente diminuída. Uma modificação pode ser também uma modificação em região não codificante. O polirribonucleotídeo circular pode incluir de cerca de 1% a cerca de 100% de nucleotídeos modificados (em relação ao conteúdo global de nucleotídeos ou em relação a um ou mais tipos de nucleotídeos, *i.e.*, qualquer um de ou mais de A, G, U ou C) ou qualquer percentagem intermediária (p.ex., de 1% a 20%, de 1% a 25%, de 1% a 50%, de 1% a 60%, de 1% a 70%, de 1% a 80%, de 1% a 90%, de 1% a 95%, de 10% a 20%, de 10% a 25%, de 10% a 50%, de 10% a 60%, de 10% a 70%, de 10% a 80%, de 10% a 90%, de 10% a 95%, de 10% a 100%, de 20% a 25%, de 20% a 50%, de 20% a 60%, de 20% a 70%, de

20% a 80%, de 20% a 90%, de 20% a 95%, de 20% a 100%, de 50% a 60%, de 50% a 70%, de 50% a 80%, de 50% a 90%, de 50% a 95%, de 50% a 100%, de 70% a 80%, de 70% a 90%, de 70% a 95%, de 70% a 100%, de 80% a 90%, de 80% a 95%, de 80% a 100%, de 90% a 95%, de 90% a 100% e de 95% a 100%).

[0291] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular fornecido aqui é um polirribonucleotídeo circular modificado. Por exemplo, um polirribonucleotídeo circular completamente modificado compreende todos ou substancialmente todos os resíduos de adenosina modificados, todos ou substancialmente todos os resíduos de uridina modificados, todos ou substancialmente todos os resíduos de guanina modificados, todos ou substancialmente todos os resíduos de citidina modificados, ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular fornecido aqui é um polirribonucleotídeo circular modificado híbrido. Um polirribonucleotídeo circular modificado híbrido pode ter pelo menos um nucleotídeo modificado e pode ter uma porção de nucleotídeos não modificados contíguos. Esta porção não modificada do polirribonucleotídeo circular modificado com híbrido pode ter pelo menos cerca de 5, 10, 15 ou 20 nucleotídeos não modificados contíguos ou qualquer número entre eles. Em algumas modalidades, a porção não modificada do polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem pelo menos cerca de 30, 40, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 250, 280, 300, 320, 350, 380, 400, 420, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 ou 1000 nucleotídeos não modificados contíguos ou qualquer número entre eles. Em algumas modalidades, o

polirribonucleotídeo circular modificado de híbrido tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais porções não modificadas. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 ou mais nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem pelo menos 1%, 2%, 5%, 7%, 8%, 10%, 12%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99%, mas menos de 100% de nucleotídeos que são modificados. Em algumas modalidades, a porção não modificada compreende um sítio de ligação. Em algumas modalidades, a porção não modificada compreende um sítio de ligação configurado para ligar uma proteína, DNA, RNA ou uma célula alvo. Em algumas modalidades, a porção não modificada compreende um IRES.

[0292] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma imunogenicidade mais baixa do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma imunogenicidade que é de pelo menos cerca de 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes menor do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, a imunogenicidade conforme descrito neste documento é avaliada pelo nível de expressão ou sinalização ou ativação de pelo menos um dentre RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR e IFN-beta. Em algumas

modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma meia-vida maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma meia-vida que é de pelo menos cerca de 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida é medida pela introdução do polirribonucleotídeo circular ou o polirribonucleotídeo circular correspondente em uma célula e medindo um nível do polirribonucleotídeo circular introduzido ou polirribonucleotídeo circular correspondente dentro da célula.

[0293] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido compreende uma ou mais sequências de expressão. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular modificado com híbrido têm uma eficiência de tradução semelhante ou superior a um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular modificado híbrido têm uma eficiência de tradução de pelo menos cerca de 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8 ou 3 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular modificado híbrido têm uma maior eficiência de tradução do que um polirribonucleotídeo

circular correspondente com uma porção que compreende um nucleotídeo modificado (por exemplo, a porção corresponde à porção não modificada do polirribonucleotídeo circular modificado híbrido). Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular são configuradas para ter uma eficiência de tradução mais elevada do que um polirribonucleotídeo circular correspondente tendo uma primeira porção compreendendo mais de 10%, ou pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma eficiência de tradução que é de pelo menos cerca de 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular correspondente tendo uma porção compreendendo um nucleotídeo modificado (por exemplo, a porção corresponde à porção não modificada do polirribonucleotídeo circular modificado híbrido). Conforme descrito neste documento, em algumas modalidades, a eficiência de tradução é medida em uma célula que compreende o polirribonucleotídeo circular ou o polirribonucleotídeo circular correspondente, ou em um sistema de tradução in vitro (por exemplo, lisado de reticulócito de coelho).

[0294] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem um sítio de ligação que é não modificado, por exemplo nucleotídeos, não tendo modificados. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem um sítio de ligação

configurado para se ligar a uma proteína, DNA, RNA ou célula alvo que não está modificada, por exemplo, não tendo nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem um sítio interno de entrada ribossômica (IRES) que não é modificado, por exemplo, não tendo nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido não tem mais do que 10% dos nucleotídeos no sítio de ligação que são nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido não tem mais do que 10% dos nucleotídeos no sítio de ligação configurados para se ligar a uma proteína, DNA, RNA ou célula alvo que são nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido não tem mais do que 10% dos nucleotídeos no sítio interno de entrada ribossômico (IRES) que são nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, um polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem nucleotídeos modificados por toda parte, exceto o sítio de ligação. Em algumas modalidades, um polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem nucleotídeos modificados, exceto o sítio de ligação configurado para ligar uma proteína, DNA, RNA ou uma célula alvo. Em algumas modalidades, um polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem nucleotídeos modificados por toda parte, exceto o elemento IRES. Em outras modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem nucleotídeos modificados, exceto o elemento IRES e uma ou mais outras porções. Sem desejar ser limitado por uma determinada teoria, o elemento IRES não modificado torna a

tradução do polirribonucleotídeo circular modificado híbrido competente, por exemplo, tendo uma eficiência de tradução para uma ou mais sequências de expressão que é semelhante ou superior a um polirribonucleotídeo circular correspondente que não têm quaisquer nucleotídeos modificados.

[0295] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem nucleotídeos modificados, por exemplo, 5' metilcitidina e pseudouridina, ao longo do polirribonucleotídeo circular, exceto o elemento IRES ou um sítio de ligação configurado para ligar-se uma proteína, DNA, RNA, ou uma célula alvo. Nestes casos, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma maior e menor imunogenicidade em comparação com um polirribonucleotídeo circular correspondente que não compreende 5' metilcitidina e pseudouridina. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma imunogenicidade que é de pelo menos cerca de 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes menor do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, a imunogenicidade conforme descrito neste documento é avaliada pela expressão ou sinalização ou ativação de pelo menos um dentre RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR e IFN-beta. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma meia-vida maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente, por exemplo, um polirribonucleotídeo circular correspondente que não compreende 5' metilcitidina e pseudouridina. Em

algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido tem uma meia-vida maior que é de pelo menos cerca de 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida é medida pela introdução do polirribonucleotídeo circular ou o polirribonucleotídeo circular correspondente em uma célula e medindo um nível do polirribonucleotídeo circular introduzido ou polirribonucleotídeo circular correspondente dentro da célula.

[0296] Em alguns casos, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido, tal como aqui descrito tem a imunogenicidade semelhante, em comparação com um polirribonucleotídeo circular correspondente que é de outro modo o mesmo, mas completamente modificado. Por exemplo, um polirribonucleotídeo circular modificado híbrido que tem 5' metilcitidina e pseudouridina, exceto seu elemento IRES, pode ter imunogenicidade semelhante ou imunogenicidade inferior em comparação com um polirribonucleotídeo circular correspondente que é o mesmo, mas tem 5' metilcitidina e pseudouridina em toda e citidina e uridina não modificadas. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modificado híbrido que tem 5' metilcitidina e pseudouridina, exceto que seu elemento IRES tem eficiência de tradução que é semelhante ou superior à eficiência de tradução de um polirribonucleotídeo circular correspondente que é o mesmo, mas tem 5' metilcitidina e pseudouridina total e citidina e uridina não modificadas.

Conjugação de polirribonucleotídeos circulares

[0297] Um circRNA da divulgação pode ser conjugado, por exemplo, a um composto químico (por exemplo, uma molécula pequena), um anticorpo ou fragmento do mesmo, um peptídeo, uma proteína, um aptâmero, um fármaco ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, uma molécula pequena pode ser conjugada a um circRNA, gerando assim um circRNA compreendendo uma molécula pequena.

[0298] Um circRNA da divulgação pode compreender uma fração de conjugação para facilitar a conjugação. Uma fração de conjugação pode ser incorporada, por exemplo, em um sítio interno de um polinucleotídeo circular, ou em uma extremidade 5', extremidade 3' ou sítio interno de um polinucleotídeo linear. Uma fração de conjugação pode ser incorporada quimicamente ou enzimaticamente. Por exemplo, uma fração de conjugação pode ser incorporada durante a síntese de oligonucleotídeo em fase sólida, cotranscricionalmente (por exemplo, com uma RNA polimerase tolerante) ou pós-transcricionalmente (por exemplo, com uma RNA metiltransferase). Uma fração de conjugação pode ser um nucleotídeo modificado ou de um análogo de nucleotídeo, por exemplo, bromodesoxiuridina. Uma fração de conjugação pode compreender um grupo reativo ou um grupo funcional, por exemplo, um grupo azida ou um grupo alcino. Uma fração de conjugação pode ser capaz de sofrer uma reação quimiosseletiva. Uma fração de conjugação pode ser um grupo hapteno, por exemplo, digoxigenina, compreendendo, 2,4-dinitrofenila, biotina, avidina, ou selecionado de entre os azoles, compostos nitroarila, benzofurazanos, triterpenos, ureias, tioureias, rotenonas, oxazoles, tiazoles, cumarinas,

ciclolignanos, compostos heterobiarila, compostos azoarila ou benzodiazepinas. Uma fração de conjugação pode compreender um fotointerruptor de diariletano capaz de sofrer um rearranjo eletrocíclico reversível. Uma fração de conjugação pode compreender um nucleófilo, um carbânion e/ou um composto de carbonila α,β -insaturado.

[0299] Um circRNA pode ser conjugado por meio de uma reação química, por exemplo, usando química de clique, ligação de Staudinger, formação de ligação C-C catalisada por Pd (por exemplo, reação de Suzuki-Miyaura), adição de Michael, metátese de olefina ou demanda inversa de elétron Diels-Alder. A química do clique pode utilizar pares de grupos funcionais que reagem rápida e seletivamente ("clique") entre si em condições de reação apropriadas. As reações de química de clique não limitantes incluem cicloadição de azida-alquino, cicloadição 1,3-dipolar de azida-alquino catalisada por cobre (CuAAC), reação Química de Clique de Azida - Alquino promovida por cadeia (SPAAC) e Ligação de tetrazina-alqueno.

[0300] Exemplos não limitativos de nucleotídeos funcionalizados incluem análogos de UTP modificados por azida, 5-Azidometil-UTP, 5-Azido-C3-UTP, 5-Azido-PEG4-UTP, 5-Etínil-UTP, DBCO-PEG4-UTP, Vinil-UTP, 8-Azido-ATP, 3'-Azido-2',3'-ddATP, 5-Azido-PEG4-CTP, 5-DBCO-PEG4-CTP, N6-Azidohexil-3'-dATP, 5-DBCO-PEG4-dCpG, e 5-azidopropilo-UTP. Em algumas modalidades, um circRNA compreende pelo menos um 5-Azidometil-UTP, 5-Azido-C3-UTP, 5-Azido-PEG4-UTP, 5-Etínil-UTP, DBCO-PEG4-UTP, Vinil-UTP, 8-Azido-ATP, 5-Azido-PEG4-CTP, 5-DBCO-PEG4-CTP ou 5-azidopropil-UTP.

[0301] Um único nucleotídeo modificado de escolha (por exemplo, A, C, G, U ou T modificado contendo uma azida na posição 2') pode ser incorporado especificamente no sítio sob condições otimizadas (por exemplo, via química de fase sólida síntese). Uma pluralidade de nucleotídeos contendo uma azida na posição 2' pode ser incorporada, por exemplo, substituindo um nucleotídeo durante uma reação de transcrição *in vitro* (por exemplo, substituindo UTP por 5-azido-C3-UTP).

[0302] Um conjugado de circRNA pode ser gerado usando uma reação de clique catalisada por cobre, por exemplo, cicloadição 1,3-dipolar azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC) de uma molécula pequena funcionalizada com alcino e um ácido polirribonucleico funcionalizado com azida. Um RNA linear pode ser conjugado com uma molécula pequena. Por exemplo, um RNA linear pode ser modificado em sua extremidade 3' por uma polimerase poli(A) com um nucleotídeo derivado de azido. A azida pode ser conjugada a uma molécula pequena por meio da reação de clique de azida-alcino catalisada por cobre ou promovida por cadeia, e o RNA linear pode ser circularizado.

[0303] Um conjugado de circRNA pode ser gerado usando uma reação de Staudinger. Por exemplo, um RNA circular compreendendo um nucleotídeo funcionalizado com azida pode ser conjugado com uma molécula pequena funcionalizada com alcino na presença de ácido trifetilfosfina-3,3',3''-trissulfônico (TPPTS).

[0304] Um conjugado de circRNA pode ser gerado usando uma reação de Suzuki-Miyaura. Por exemplo, um circRNA compreendendo um análogo de nucleotídeo halogenado pode ser

submetido à reação de Suzuki-Miyaura na presença de um parceiro reativo cognato. Um circRNA compreendendo trifosfato de 5-iodouridina (IUTP), por exemplo, pode ser usado em um sistema catalítico com $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ e 2-aminopirimidina-4,6-diol (ADHP) ou ADHP substituído com dimetilamino (DMADHP) para funcionalizar circRNA marcado com iodouridina na presença de vários substratos de éster e ácido borônico. Em outro exemplo, um circRNA compreendendo 8-bromoguanosina pode ser reagido com ácidos arilborônicos na presença de um sistema catalítico feito de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ e um ligando trifenilfosfano 3,3',3''-trisulfonato solúvel em água.

[0305] Um circRNA conjugado pode ser gerado utilizando adição de Michael, por exemplo, através da reação de um dador de Michael um rico em elétrons, com um composto α,β -insaturado (aceitador de Michael).

Estrutura

[0306] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende uma estrutura de ordem superior, p.ex., uma estrutura secundária ou terciária. Em algumas modalidades, segmentos complementares do polirribonucleotídeo circular se dobram em um segmento de cadeia dupla, mantido unido com ligações de hidrogênio entre pares, p.ex., A-U e C-G. Em algumas modalidades, as hélices, também conhecidas como hastes, são formadas intramolecularmente, tendo um segmento de cadeia dupla conectado a uma alça final. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem pelo menos um segmento com uma estrutura secundária de cadeia quase dupla. Em algumas modalidades, um segmento tendo uma estrutura secundária de cadeia quase dupla tem pelo menos 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 ou mais nucleotídeos emparelhados. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem um ou mais segmentos (p.ex., 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) tendo uma estrutura secundária de cadeia quase dupla. Em algumas modalidades, os segmentos são separados por 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 ou mais nucleotídeos.

[0307] Existem 16 possíveis emparelhamentos de bases, no entanto, destes, seis (AU, GU, GC, UA, UG, CG) podem formar pares de bases reais. O restante é chamado incompatibilidade e ocorre a frequências muito baixas em hélices. Em algumas modalidades, a estrutura do polirribonucleotídeo circular não pode ser facilmente interrompida sem impacto em sua função e consequências letais, o que proporciona uma seleção para manter a estrutura secundária. Em algumas modalidades, a estrutura primária das hastes (*i.e.*, sua sequência de nucleotídeos) pode ainda variar, enquanto se mantêm as regiões helicoidais. A natureza das bases é secundária à estrutura superior, e são possíveis substituições desde que preservem a estrutura secundária. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma estrutura quase helicoidal. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem pelo menos um segmento com uma estrutura quase helicoidal. Em algumas modalidades, um segmento tendo uma estrutura quase helicoidal tem pelo menos 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 ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem um ou mais segmentos (p.ex., 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) tendo uma estrutura quase helicoidal. Em algumas modalidades, os segmentos são separados por 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 ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma de uma sequência rica em U ou rica em A ou uma sua combinação. Em algumas modalidades, as sequências ricas em U e/ou ricas em A estão dispostas de uma maneira que produziria uma estrutura de quase hélice tripla. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma estrutura quase helicoidal dupla. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem um ou mais segmentos (p.ex., 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) tendo uma estrutura quase helicoidal dupla. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui pelo menos uma de uma sequência rica em C e/ou rica em G. Em algumas modalidades, as sequências ricas em C e/ou ricas em G estão dispostas de uma maneira que produziria estrutura tripla de quase hélice. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma estrutura de quase hélice tripla intramolecular que auxilia na estabilização.

[0308] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem duas estruturas quase helicoidais (p.ex., separadas por uma ligação de fosfodiéster), de modo que seus pares de bases terminais se empilhem, e as estruturas quase

helicoidais se tornem colineares, resultando em uma subestrutura "coaxialmente empilhada".

[0309] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem pelo menos um sítio de ligação de miRNA, pelo menos um sítio de ligação de lncRNA e/ou pelo menos um motivo de tRNA.

Entrega

[0310] O polirribonucleotídeo circular descrito aqui pode ser incluído em composições farmacêuticas com um transportador de entrega.

[0311] As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser formuladas, por exemplo, incluindo um excipiente ou transportador farmacêutico. Um transportador farmacêutico pode ser uma membrana, bicamada lipídica e/ou um transportador polimérico, por exemplo, um lipossomo ou partícula, como uma nanopartícula, por exemplo, uma nanopartícula de lipídeo, e entregue por métodos conhecidos a um sujeito em necessidade (por exemplo, um humano, um animal agrícola ou doméstico não humano, por exemplo, gado, cão, gato, cavalo, aves domésticas). Tais métodos incluem, mas não se limitam a, transfecção (por exemplo, polímeros catiônicos mediados por lipídeos, fosfato de cálcio); eletroporação ou outros métodos de ruptura da membrana (por exemplo, nucleofecção), fusão e distribuição viral (por exemplo, lentivírus, retrovírus, adenovírus, AAV).

[0312] A invenção está adicionalmente dirigida a um hospedeiro ou célula hospedeira compreendendo o polirribonucleotídeo circular descrito aqui. Em algumas modalidades, o hospedeiro ou célula hospedeira é uma planta,

inseto, bactéria, fungo, vertebrado, mamífero (p.ex., humano) ou outro organismo ou célula.

[0313] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é não imunogênico no hospedeiro. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular tem uma resposta diminuída ou falha em produzir uma resposta pelo sistema imunitário do hospedeiro em comparação com a resposta desencadeada por um composto de referência, p.ex., um polinucleotídeo linear correspondente ao polirribonucleotídeo circular descrito, polirribonucleotídeo circular não modificado, ou um polirribonucleotídeo circular sem um criptogênico. Algumas respostas imunológicas incluem, mas não estão limitadas a, respostas imunológicas humorais (por exemplo, produção de anticorpos específicos para antigênicos) e respostas imunológicas mediadas por células (por exemplo, proliferação de linfócitos).

[0314] Em algumas modalidades, um hospedeiro ou uma célula hospedeira é contatada com (p.ex., entregue ao ou administrada ao) polirribonucleotídeo circular. Em algumas modalidades, o hospedeiro é um mamífero, tal como um humano. A quantidade do polirribonucleotídeo circular, produto de expressão ou ambos no hospedeiro pode ser medida em qualquer momento após administração. Em certas modalidades é determinado um decurso temporal de crescimento de hospedeiro em uma cultura. Se o crescimento for aumentado ou reduzido na presença do polirribonucleotídeo circular, o polirribonucleotídeo circular ou produto de expressão ou ambos são identificados como sendo eficazes no aumento ou redução do crescimento do hospedeiro.

Métodos de Produção

[0315] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular inclui uma sequência de ácido desoxirribonucleico que não ocorre naturalmente e pode ser produzida usando tecnologia de DNA recombinante ou síntese química.

[0316] Está dentro do escopo da invenção que uma molécula de DNA usada para produzir um círculo de RNA possa compreender uma sequência de DNA de uma sequência de ácido nucleico original ocorrendo naturalmente, uma sua versão modificada ou uma sequência de DNA codificando um polipeptídeo sintético não normalmente encontrado na natureza (p.ex., moléculas quiméricas ou proteínas de fusão). As moléculas de DNA podem ser modificadas usando uma variedade de técnicas incluindo, mas não se limitando a, técnicas clássicas de mutagênese e técnicas de DNA recombinante, tais como mutagênese sítio-dirigida, tratamento químico de uma molécula de ácido nucleico para induzir mutações, clivagem com enzimas de restrição de um fragmento de ácido nucleico, ligação de fragmentos de ácido nucleico, amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e/ou mutagênese de regiões selecionadas de uma sequência de ácido nucleico, síntese de misturas de oligonucleotídeos e ligação de grupos de mistura para "construir" uma mistura de moléculas de ácidos nucleicos e suas combinações.

[0317] O polirribonucleotídeo circular pode ser preparado, por exemplo, por síntese química e a síntese enzimática. Em algumas modalidades, um construto primário linear ou mRNA linear pode ser ciclizado ou concatemerizado para criar um polirribonucleotídeo circular descrito aqui. O mecanismo de

ciclização ou concatemerização pode ocorrer através de métodos tais como, mas não se limitando a, ligação química, enzimática ou métodos catalisados por ribozima. A ligação 5'- ou 3'- recém-formada pode ser uma ligação intramolecular ou uma ligação intermolecular.

Composições Farmacêuticas

[0318] A presente invenção inclui composições em combinação com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis. As composições farmacêuticas podem opcionalmente compreender uma ou mais substâncias ativas adicionais, p.ex., substâncias terapeuticamente e/ou profilaticamente ativas. As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser estéreis e/ou estar isentas de pirogênios. Considerações gerais na formulação e/ou fabricação de agentes farmacêuticos podem ser encontradas, por exemplo, em Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005, que é aqui incorporado por referência. Em um aspecto, a invenção inclui um método de produção da composição farmacêutica aqui descrita, compreendendo a geração do polirribonucleotídeo circular.

[0319] Embora as descrições de composições farmacêuticas proporcionadas aqui estejam principalmente dirigidas a composições farmacêuticas que são adequadas para administração a humanos será entendido pelo perito que tais composições são geralmente adequadas para administração a qualquer outro animal, p.ex., animais não humanos, e mamíferos não humanos. A modificação de composições farmacêuticas adequadas para administração a humanos de modo a tornar as composições adequadas para administração a vários animais é bem entendida, e o farmacologista veterinário

perito pode desenhar e/ou realizar tal modificação com experimentação meramente habitual, se alguma. Os sujeitos para os quais a administração das composições farmacêuticas é contemplada incluem, mas não estão limitados a, humanos e/ou outros primatas; mamíferos, incluindo mamíferos comercialmente relevantes tais como gado, porcos, cavalos, ovelhas, gatos, cães, camundongos e/ou ratos; e/ou aves, incluindo aves comercialmente relevantes tais como aves domésticas, galinhas, patos, gansos e/ou perus.

[0320] As formulações das composições farmacêuticas descritas aqui podem ser preparadas por qualquer método conhecido ou doravante desenvolvido na técnica de farmacologia. Em geral, tais métodos preparatórios incluem o passo de colocação do ingrediente ativo em associação a um excipiente e/ou um ou mais outros ingredientes acessórios e, depois, se necessário e/ou desejável, divisão, modelação e/ou empacotamento do produto.

[0321] As composições farmacêuticas aqui descritas podem estar em formas de dosagem unitária adequadas para administração única de dosagens precisas. Na forma de dosagem unitária, a formulação é dividida em doses unitárias contendo quantidades apropriadas de um ou mais compostos. A dosagem unitária pode estar na forma de uma embalagem contendo quantidades discretas da formulação. Exemplos não limitantes são injetáveis embalados, frascos ou ampolas. As composições de suspensão aquosa podem ser embaladas em recipientes não reutilizáveis de dose única. Recipientes de dose múltipla com fecho reutilizável podem ser usados, por exemplo, em combinação com ou sem um conservante. As formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de

dosagem unitária, por exemplo, em ampolas, ou em recipientes multidose com um conservante.

[0322] Em um aspecto, a invenção inclui uma composição farmacêutica compreendendo (a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, por exemplo, um RNA, DNA, proteína, a membrana de uma célula, etc ; e (b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável; em que o alvo e o polirribonucleotídeo circular formam um complexo, em que o alvo não é um microRNA.

[0323] Em algumas modalidades, o sítio de ligação é um primeiro sítio de ligação e o alvo é um primeiro alvo. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a um segundo alvo.

[0324] Em um aspecto, a invenção inclui uma composição farmacêutica compreendendo (a) um polirribonucleotídeo circular que compreende: (i) um primeiro sítio de ligação que se liga a um primeiro alvo; e (ii) um segundo sítio de ligação que se liga a um segundo alvo; e (b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável; em que o primeiro sítio de ligação é diferente do segundo sítio de ligação, em que o primeiro alvo e o segundo alvo são microRNA.

[0325] Em algumas modalidades, o primeiro alvo compreende um primeiro motivo de ligação a polirribonucleotídeo circular (circ-RNA). Em algumas modalidades, o segundo alvo compreende um segundo motivo de ligação a polirribonucleotídeo circular (circRNA). Em algumas modalidades, o primeiro alvo, o segundo alvo e o polirribonucleotídeo circular formam um complexo. Em algumas

modalidades, o primeiro alvo e o segundo alvos interagem um com o outro. Em algumas modalidades, o complexo modula um processo celular quando em contato com a célula. Em algumas modalidades, a formação do complexo modula um processo celular quando em contato com a célula. Em tais modalidades, o processo celular está associado à patogênese de uma doença ou afeção.

[0326] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular modula um processo celular associado ao primeiro ou segundo alvo quando em contato com a célula. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo alvos interagem um com o outro no complexo. Em algumas modalidades, o processo celular está associado à patogênese de uma doença ou afeção. Em algumas modalidades, o processo celular é diferente da tradução do polirribonucleotídeo circular. Em algumas modalidades, o primeiro alvo compreende uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) e o alvo compreende uma proteína. Em algumas modalidades, o complexo modula a transcrição direcionada da molécula de DNA, a remodelação epigenética da molécula de DNA ou a degradação da molécula de DNA.

[0327] Em algumas modalidades, o primeiro alvo compreende uma primeira proteína e o segundo alvo compreende uma segunda proteína. Em tais modalidades, o complexo modula a degradação da primeira proteína, translocação da primeira proteína ou transdução de sinal, ou modula a formação de um complexo formado pela interação direta entre a primeira e a segunda proteínas (por exemplo, inibe ou promove a formação de um complexo).

[0328] Em algumas modalidades, o primeiro alvo compreende uma primeira molécula de ácido ribonucleico (RNA) e o segundo

alvo compreende uma segunda molécula de RNA. Em tais modalidades, o complexo pode modular a degradação da primeira molécula de RNA.

[0329] Em algumas modalidades, o alvo compreende uma proteína e o segundo alvo compreende uma molécula de RNA. Em tais modalidades, o complexo modula a translocação da proteína ou inibe a formação de um complexo formado pela interação direta entre a proteína e a molécula de RNA.

[0330] Em algumas modalidades, o primeiro alvo é um receptor e o segundo alvo é um substrato do receptor. Em tais modalidades, o complexo inibe a ativação do receptor. Tal como aqui utilizado, um "receptor" pode referir-se a uma molécula de proteína que recebe sinais químicos de fora de uma célula. Os sinais químicos podem incluir, sem limitação, compostos orgânicos de moléculas pequenas (por exemplo, aminoácidos e seus derivados, por exemplo, glutamato, glicina, ácido gama-butirático), lipídeos, proteínas ou polipeptídeos, moléculas de DNA e RNA e íons. Um receptor pode estar presente na membrana celular, no citoplasma ou no núcleo da célula. Os sinais químicos que se ligam a um receptor podem ser geralmente referidos como "substrato" do receptor. Ao se ligar ao sinal químico, um receptor pode causar alguma forma de resposta celular ao iniciar um ou mais processos celulares, por exemplo, vias de sinalização. Um receptor como aqui fornecido pode ser de qualquer tipo que um perito na técnica reconheceria, incluindo: (1) receptores ionotrópicos, que podem ser os alvos de neurotransmissores rápidos, tais como acetilcolina (nicotínico) e GABA; e a ativação desses receptores resulta em mudanças no movimento iônico através de uma membrana.

Eles podem ter uma estrutura heteromérica em que cada subunidade consiste no domínio de ligação ao ligante extracelular e um domínio transmembranar onde o domínio transmembranar, por sua vez, inclui quatro hélices alfa transmembranares. As cavidades de ligação ao ligante podem estar localizadas na interface entre as subunidades; (2) receptores acoplados à proteína G, que podem incluir os receptores para vários hormônios e transmissores lentos, por exemplo, dopamina, glutamato metabotrópico. Eles podem ser compostos por sete hélices alfa transmembranares. As alças que conectam as hélices alfa podem formar domínios extracelulares e intracelulares; (3) receptores ligados e relacionados à quinase (ou receptor tirosina quinase), que podem ser compostos de um domínio extracelular contendo o sítio de ligação do ligante e um domínio intracelular, frequentemente com função enzimática, ligado por uma única hélice alfa transmembranar. O receptor de insulina é um exemplo desse tipo de receptor, do qual a insulina pode ser seu substrato correspondente; (4) https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor receptores nucleares, que podem estar localizados em qualquer um dos núcleos ou no citoplasma e migrar para o núcleo após a ligação com seus ligantes. Eles podem ser compostos por uma região de ligação ao ligando em C-terminal, um domínio de ligação ao DNA central (DBD) e um domínio em N-terminal que contém a região *AF1* (função de ativação 1). Receptores de esteroide e hormônio da tireoide são exemplos de tais receptores, e seus substratos correspondentes podem incluir vários esteroides e hormônios.

[0331] Em um aspecto, a invenção inclui uma composição farmacêutica compreendendo (a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo; e (b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável; em que o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou com defeito na tradução, em que o alvo não é um microRNA.

[0332] Em um aspecto, a invenção inclui uma composição farmacêutica compreendendo (a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, em que o alvo compreende um primeiro motivo de ligação ao ácido ribonucleico (RNA); e (b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável; em que o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou com defeito na tradução, em que o alvo é um microRNA.

[0333] Em tais modalidades, o alvo compreende uma molécula de DNA. Em tais modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interferência da transcrição da molécula de DNA. Em tais modalidades, o alvo compreende uma proteína. Em tais modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular inibe a interação da proteína com outras moléculas. Em tais modalidades, a proteína é um receptor e a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular ativa o receptor. Em tais modalidades, a proteína é uma primeira enzima, o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a uma segunda enzima, e a ligação da primeira e da segunda enzimas ao polirribonucleotídeo circular modula a atividade enzimática da primeira e da segunda enzimas. Em tais modalidades, o

alvo compreende uma molécula de RNA mensageiro (mRNA). Em tais modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interferência da tradução da molécula de mRNA. Em tais modalidades, o alvo compreende um ribossomo. Em tais modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interferência de um processo de tradução. Em tais modalidades, o alvo compreende uma molécula de RNA circular. Em tais modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular sequestra a molécula de RNA circular. Em tais modalidades, a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular sequestra o alvo.

[0334] Em um aspecto, a invenção inclui uma composição farmacêutica compreendendo (a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a uma membrana celular de uma célula alvo; e em que a membrana celular de uma célula alvo compreende um primeiro motivo de ligação ao ácido ribonucleico (RNA); e (b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0335] Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a uma segunda membrana de uma segunda célula alvo, em que a segunda membrana celular da segunda célula alvo compreende um segundo motivo de ligação a RNA. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular liga-se à membrana celular na célula alvo e à segunda membrana celular da segunda célula alvo, e a fusão celular da primeira e segunda células alvo é modulada.

[0336] Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a um segundo alvo, e a ligação do primeiro e segundo

alvos ao polirribonucleotídeo circular induz uma mudança conformacional no primeiro alvo, induzindo assim a transdução de sinal a jusante de o primeiro alvo na primeira célula. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou defeituoso na tradução.

[0337] Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular compreende ainda pelo menos um elemento estrutural selecionado a partir de: a) um criptogênio; b) um elemento de *splicing*; c) uma sequência regulatória; d) uma sequência de replicação; e) estrutura secundária quase de dupla cadeia; e f) sequência de expressão. Em tais modalidades, a estrutura quase helicoidal compreende pelo menos um segmento de RNA de cadeia dupla com pelo menos um segmento de cadeia não dupla. Em tais modalidades, a estrutura quase helicoidal compreende uma primeira sequência e uma segunda sequência ligadas a uma sequência repetitiva, p.ex., uma sequência rica em A. Em algumas modalidades, o criptogênico compreende um elemento de *splicing*.

[0338] Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular compreende pelo menos um ácido nucleico modificado. Em tais modalidades, o pelo menos um ácido nucleico modificado é selecionado do grupo que consiste em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido nucleico de 1',5'-anidroxitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um

nucleotídeo de tiolfosfonato e um 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidito. Os polirribonucleotídeos circulares podem ser polirribonucleotídeos circulares completamente modificados. Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares administrados são polirribonucleotídeos circulares modificados híbridos. Em algumas modalidades, o polirribonucleotídeo circular compreende nucleotídeos modificados e um IRES não modificado.

[0339] Em algumas modalidades, o criptogênico compreende pelo menos um ácido nucleico modificado, p.ex., pseudo-uridina e N(6)metiladenosina (m6A). Em algumas modalidades, o criptogênico compreende um local de ligação à proteína, p.ex., proteína de ligação a ácido ribonucleico. Em algumas modalidades, o criptogênico compreende um local de ligação a imunoproteínas, p.ex., para evitar respostas CTL.

[0340] Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular tem pelo menos 2x menos imunogenicidade do que uma contraparte não tendo o criptogênico, como avaliado por expressão ou sinalização ou ativação de pelo menos um de RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR e IFN-beta. Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular tem um tamanho na gama de cerca de 20 bases a cerca de 20 kb. Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular é sintetizado através da circularização de um polinucleotídeo linear. Em algumas modalidades, o ácido polirribonucleico circular é substancialmente resistente à degradação.

Aplicações

[0341] Os polirribonucleotídeos circulares aqui descritos podem ser administrados a uma célula, tecido ou um sujeito

em necessidade do mesmo, por exemplo, para modular a função celular ou um processo celular, por exemplo, a expressão genética na célula, tecido ou um sujeito. A invenção também contempla métodos de modular a função celular ou um processo celular, por exemplo, expressão gênica, compreendendo a administração a uma célula, tecido ou sujeito em necessidade de um polirribonucleotídeo circular aqui descrito. Os polirribonucleotídeos circulares administrados podem ser polirribonucleotídeos circulares modificados. Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares administrados são polirribonucleotídeos circulares completamente modificados. Em algumas modalidades, os polirribonucleotídeos circulares administrados são polirribonucleotídeos circulares modificados híbridos. Em outras modalidades, os polirribonucleotídeos circulares administrados são polirribonucleotídeos circulares não modificados.

Parágrafos de modalidades

[1] Uma composição farmacêutica compreendendo:

(a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, por exemplo, um RNA, DNA, proteína, membrana celular, etc.; e

(b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável;

em que o alvo e o polirribonucleotídeo circular formam um complexo, e

em que o alvo não é um microRNA.

[2] Uma composição farmacêutica compreendendo:

(a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo:

- (i) (i) um primeiro sítio de ligação que liga um primeiro alvo, e
- (ii) (ii) um segundo sítio de ligação que liga um segundo alvo; e
- (b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável;

em que o primeiro sítio de ligação é diferente do segundo sítio de ligação, e

em que o primeiro alvo e o segundo alvo são ambos microRNA.

[3] A composição farmacêutica do parágrafo [1], em que o sítio de ligação compreende uma sequência de aptâmero.

[4] A composição farmacêutica do parágrafo [2], em que o primeiro sítio de ligação compreende uma primeira sequência de aptâmero e o segundo sítio de ligação compreende uma segunda sequência de aptâmero.

[5] A composição farmacêutica da reivindicação [3], em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao alvo.

[6] A composição farmacêutica da reivindicação [4], em que a primeira sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao primeiro alvo e a segunda sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao segundo alvo.

[7] A composição farmacêutica da reivindicação [1], em que o sítio de ligação é um primeiro sítio de ligação e o alvo é um primeiro alvo.

[8] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [3], [5] e [7], em que o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a um segundo alvo.

[9] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6], [7] e [8], em que o primeiro alvo compreende um primeiro motivo de ligação a polirribonucleotídeo circular (circRNA).

[10] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6], e [7]-[9], em que o segundo alvo compreende um segundo motivo de ligação a polirribonucleotídeo circular (circRNA).

[11] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [10], em que o primeiro alvo, o segundo alvo e o polirribonucleotídeo circular formam um complexo.

[12] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [11], em que o primeiro e o segundo alvos interagem um com o outro.

[13] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1], [3], [5] e [7] - [12], em que o complexo modula um processo celular.

[14] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [13], em que o primeiro e o segundo alvos são iguais e o primeiro e o segundo sítios de ligação se ligam diferentes sítios de ligação no primeiro alvo e no segundo alvo.

[15] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [13], em que o primeiro alvo e o segundo alvo são diferentes.

[16] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [15], em que o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um ou mais sítios de ligação adicionais que se ligam a um terceiro ou mais alvos.

[17] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [16], em que um ou mais alvos são os mesmos e um ou mais sítios de ligação adicionais ligam sítios de ligação diferentes em um ou mais alvos.

[18] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1], [3], [5] e [7] - [17], em que a formação do complexo modula um processo celular.

[19] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [18], em que o polirribonucleotídeo circular modula um processo celular associado ao primeiro ou segundo alvo quando em contato com o primeiro e o segundo alvos.

[20] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [19], em que o primeiro e o segundo alvos interagem um com o outro no complexo.

[21] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [13] - [20], em que o processo celular está associado à patogênese de uma doença ou afeção.

[22] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [13] - [21], em que o processo celular é diferente da tradução do ácido polirribonucleico circular.

[23] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [22], em que o primeiro alvo compreende uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) e o segundo alvo compreende uma proteína.

[24] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1], [3], [5] e [7] - [23], em que o complexo modula a transcrição dirigida da molécula de DNA, remodelação epigenética da molécula de DNA, ou degradação da molécula de DNA.

[25] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [24], em que o primeiro alvo compreende uma primeira proteína e o segundo alvo compreende uma segunda proteína.

[26] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1], [3], [5] e [7] - [25], em que o complexo modula a degradação da primeira proteína, translocação da primeira proteína ou sinal transdução, ou modula a função de uma proteína nativa, inibe ou modula a formação de um complexo formado pela interação direta entre a primeira e a segunda proteínas.

[27] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [26], em que o primeiro alvo ou o segundo alvo é uma ubiquitina ligase.

[28] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [27], em que o primeiro alvo compreende uma primeira molécula de ácido ribonucleico (RNA) e o segundo alvo compreende uma segunda molécula de RNA.

[29] A composição farmacêutica do parágrafo [28], em que o complexo modula a degradação da primeira molécula de RNA.

[30] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [29], em que o primeiro alvo compreende uma proteína e o segundo alvo compreende uma molécula de RNA.

[31] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1], [3], [5] e [7] - [30], em que o complexo modula a translocação da proteína ou inibe a formação de um complexo formado por interação direta entre a proteína e a molécula de RNA.

[32] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [2], [4], [6] e [7] - [31], em que o primeiro alvo é um receptor e o segundo alvo é um substrato do receptor.

[33] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1], [3], [5] e [7] - [32], em que o complexo inibe a ativação do receptor.

[34] Uma composição farmacêutica compreendendo:

(a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo; e

(b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável;

em que o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou com defeito na tradução e em que o alvo não é um microRNA.

[35] Uma composição farmacêutica compreendendo:

(a) um ácido polirribonucleico circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, em que o alvo compreende um motivo de ligação a ácido ribonucleico (RNA);

e

(b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável;

em que o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou com defeito na tradução e em que o alvo é um microRNA.

[36] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [34] e [35], em que o sítio de ligação compreende uma sequência de aptâmero com uma estrutura secundária que se liga ao alvo.

[37] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [34] e [36], em que o alvo compreende uma molécula de DNA.

[38] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [34] - [37], em que a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo

circular modula a interferência da transcrição de uma molécula de DNA.

[39] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [34] e [36]-[38], em que o alvo compreende uma proteína.

[40] A composição farmacêutica do parágrafo [39], em que a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interação da proteína com outras moléculas.

[41] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [39] - [40], em que a proteína é um receptor e em que a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular ativa o receptor.

[42] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [39] - [41], em que a proteína é uma primeira enzima, em que o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a uma segunda enzima, e em que a ligação da primeira e as segundas enzimas ao polirribonucleotídeo circular modulam a atividade enzimática da primeira e da segunda enzimas.

[43] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [39] e [40], em que a proteína é uma ubiquitina ligase.

[44] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [34], [36] e [38], em que o alvo compreende uma molécula de RNA mensageiro (mRNA).

[45] A composição farmacêutica do parágrafo [44], em que a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interferência da tradução da molécula de mRNA.

[46] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [34], [36], [39] e [40], em que o alvo compreende um ribossomo.

[47] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [34] - [46], em que a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular modula a interferência do processo de tradução.

[48] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [34], [36] e [38], em que o alvo compreende uma molécula de RNA circular.

[49] A composição farmacêutica do parágrafo [48], em que a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular sequestra a molécula de RNA circular.

[50] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [35], [36], [38] e [47], em que a ligação do alvo ao polirribonucleotídeo circular sequestra a molécula de microRNA.

[51] Uma composição farmacêutica compreendendo:

(a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a uma membrana de uma célula (por exemplo, a membrana da parede celular, membrana organela, etc), em que a membrana da célula compreende um motivo de ligação de ácido ribonucleico (RNA); e

(b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[52] A composição farmacêutica do parágrafo [51], em que o sítio de ligação compreende uma sequência de aptâmero com uma estrutura secundária que se liga à membrana da célula (por exemplo, membrana da parede celular, membrana de organelo, etc.).

[53] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [51] e [52], em que o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a

um segundo alvo, em que o segundo alvo compreende um segundo motivo de ligação a RNA.

[54] A composição farmacêutica do parágrafo [53], em que o polirribonucleotídeo circular se liga à membrana da célula e ao segundo alvo.

[55] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [51] - [54], em que o polirribonucleotídeo circular compreende ainda um segundo sítio de ligação que se liga a uma segunda célula alvo, e em que a ligação da célula alvo e da segunda célula alvo ao polirribonucleotídeo circular induz uma mudança conformacional na célula alvo, induzindo assim a transdução de sinal a jusante da célula alvo.

[56] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1] - [55], em que o polirribonucleotídeo circular é incompetente ou defeituoso na tradução.

[57] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1] - [56], em que o polirribonucleotídeo circular compreende ainda pelo menos um elemento estrutural selecionado a partir do grupo que consiste em:

[58] a) um criptogênico;

[59] b) um elemento de *splicing*;

[60] c) uma sequência reguladora;

[61] d) uma sequência de replicação;

[62] e) estrutura secundária de cadeia quase dupla.

f) uma estrutura quase helicoidal; e

g) uma sequência de expressão.

[63] A composição farmacêutica do parágrafo [57], em que a estrutura quase helicoidal compreende pelo menos um segmento de RNA de cadeia dupla com pelo menos um segmento de cadeia não dupla.

[64] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [57] e [58], em que a estrutura quase-helicoidal compreende uma primeira sequência e uma segunda sequência ligada a uma sequência repetitiva.

[65] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [57] - [59], em que o criptogênico compreende um elemento de *splicing*.

[66] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1] - [60], em que o ácido polirribonucleico circular compreende pelo menos um ácido nucleico modificado.

[67] A composição farmacêutica do parágrafo [61], em que pelo menos um ácido nucleico modificado é selecionado a partir do grupo que consiste em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), um ácido nucleico bloqueado (LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido nucleico de 1',5'-anidroxitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e um 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidito.

[68] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [57] - [62], em que o criptogênico compreende pelo menos um ácido nucleico modificado.

[69] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [57] - [63], em que o criptogênico compreende um sítio de ligação de proteína.

[70] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [57] - [64], em que o criptogênico compreende um sítio de ligação de imunoproteína.

[71] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [57] - [65], em que o ácido polirribonucleico circular tem pelo menos 2x menor imunogenicidade do que uma contraparte sem o criptogênio, conforme avaliado pela expressão, sinalização ou ativação de pelo menos um de RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR e IFN-beta.

[72] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1] - [66], em que o ácido polirribonucleico circular tem um tamanho de cerca de 20 bases a cerca de 20 kb.

[73] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1] - [67], em que o ácido polirribonucleico circular é sintetizado através da circularização de um polinucleotídeo linear.

[74] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1] - [68], em que o ácido polirribonucleico circular é substancialmente resistente à degradação.

[75] Uma composição farmacêutica, compreendendo:

(a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, em que o alvo compreende um motivo de ligação a ácido ribonucleico (RNA); e

(b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável,

em que o polirribonucleotídeo circular compreende pelo menos um nucleotídeo modificado e uma primeira porção que compreende pelo menos cerca de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 600, 700, 800, 900 ou 1000 nucleotídeos não modificados contíguos.

[76] Uma composição farmacêutica, compreendendo:

- (a) um polirribonucleotídeo circular compreendendo um sítio de ligação que se liga a um alvo, em que o alvo compreende um motivo de ligação a ácido ribonucleico (RNA); e
- (b) um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável,

em que o polirribonucleotídeo circular compreende pelo menos um nucleotídeo modificado e uma primeira porção que compreende pelo menos cerca de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1000 nucleotídeos contíguos, e em que a primeira porção carece de pseudouridina ou 5'-metilcitidina.

[77] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] e [71], em que o sítio de ligação compreende uma sequência de aptâmero com uma estrutura secundária que se liga ao alvo.

[78] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [72], em que o polirribonucleotídeo circular tem uma imunogenicidade inferior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente.

[79] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [72], em que o polirribonucleotídeo circular tem uma imunogenicidade que é de pelo menos cerca de 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes menor do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente, conforme avaliado por expressão ou sinalização ou ativação de pelo menos um do grupo que consiste de RIG-I, TLR-3, TLR-7, TLR-8, MDA-5, LGP-2, OAS, OASL, PKR e IFN-beta.

[80] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [74], em que o polirribonucleotídeo circular tem uma meia-vida maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente.

[81] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [74], em que o polirribonucleotídeo circular tem uma meia-vida que é de pelo menos cerca de 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente.

[82] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [75] e [76], em que a meia-vida é medida pela introdução do polirribonucleotídeo circular ou o polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente em uma célula e medindo um nível do polirribonucleotídeo circular introduzido ou polirribonucleotídeo circular correspondente dentro da célula.

[83] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [77], em que pelo menos um nucleotídeo modificado é selecionado do grupo que consiste em: N(6)metiladenosina (m6A), 5'-metilcitidina e pseudouridina.

[84] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos 70- [77], em que pelo menos um ácido nucleico modificado é selecionado a partir do grupo que consiste em 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropil (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietil (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), um ácido nucleico bloqueado

(LNA), um ácido nucleico de etileno (ENA), um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido nucleico de 1',5'-anidrohexitol (HNA), um morfolino, um nucleotídeo de metilfosfonato, um nucleotídeo de tiolfosfonato e um 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidito.

[85] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [79], em que pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% dos nucleotídeos do polirribonucleotídeo circular são nucleotídeos modificados.

[86] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [80], em que o polirribonucleotídeo circular compreende um sítio de ligação que se liga a uma proteína, DNA, RNA ou uma célula alvo, consistindo em nucleotídeos não modificados.

[87] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [81], em que o polirribonucleotídeo circular compreende um sítio interno de entrada ribossômica (IRES) que consiste em nucleotídeos não modificados.

[88] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [80], em que o sítio de ligação consiste em nucleotídeos não modificados.

[89] A composição farmacêutica do parágrafo [83], em que o sítio de ligação compreende um IRES que consiste em nucleotídeos não modificados.

[90] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [84], em que a primeira porção compreende um sítio de ligação que se liga a uma proteína, DNA, RNA ou uma célula alvo.

[91] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [85], em que a primeira porção compreende um IRES.

[92] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [86], em que o polirribonucleotídeo circular compreende uma ou mais sequências de expressão.

[93] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [82] - [87], em que o polirribonucleotídeo circular compreende uma ou mais sequências de expressão e o IRES, e em que o polirribonucleotídeo circular compreende uma 5'-metilcitidina, uma pseudouridina ou uma combinação dos mesmos fora do IRES.

[94] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [88], em que uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular são configuradas para ter uma maior eficiência de tradução do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente.

[95] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [89], em que uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular têm uma eficiência de tradução de pelo menos cerca de 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8 , ou 3 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular não modificado correspondente.

[96] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [90], em que uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular têm uma maior eficiência de tradução do que um polirribonucleotídeo circular correspondente tendo uma primeira porção compreendendo um nucleotídeo modificado.

[97] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [90], em que uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular têm uma maior eficiência de tradução do que um polirribonucleotídeo circular

correspondente tendo uma primeira porção compreendendo mais de 10% de nucleotídeos modificados.

[98] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [92], em que uma ou mais sequências de expressão do polirribonucleotídeo circular têm uma eficiência de tradução que é de pelo menos cerca de 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes maior do que um polirribonucleotídeo circular correspondente tendo uma primeira porção compreendendo um nucleotídeo modificado.

[99] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [89] - [93], em que a eficiência de tradução é medida em uma célula que compreende o polirribonucleotídeo circular ou o polirribonucleotídeo circular correspondente, ou em um sistema de tradução in vitro (por exemplo, lisado de reticulócito de coelho).

[100] A composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [70] - [94], em que o polirribonucleotídeo circular é o polirribonucleotídeo circular de qualquer uma das reivindicações de 0 - [69].

[101] Um método de tratamento, compreendendo a administração da composição farmacêutica de qualquer um dos parágrafos [1] - [95] a um sujeito com uma doença ou afeção.

[102] Um método de produção de uma composição farmacêutica, compreendendo a geração do polirribonucleotídeo circular de qualquer um dos parágrafos [1] - [95].

[103] O polirribonucleotídeo circular de qualquer um dos parágrafos [1] - [95] formulado em um transportador, por exemplo, membrana ou bicamada lipídica.

[104] Um método para fazer o polirribonucleotídeo circular de qualquer um dos parágrafos [1] - [95], compreendendo circularizar um polirribonucleotídeo linear tendo uma sequência de ácido nucleico como o polirribonucleotídeo circular.

[105] Uma célula manipulada que compreende a composição de qualquer uma das reivindicações [1] - [95].

[106] Um método de ligação de um alvo a uma célula, o método compreendendo:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao alvo; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o alvo detectável pelo menos 5 dias após a entrega.

[107] Um método de ligação de um alvo a uma célula, o método compreendendo:

entrega de um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreende uma sequência de aptâmero que se liga ao alvo e em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o alvo detectável pelo menos 5 dias após a entrega.

[108] O método de qualquer um dos parágrafos [101] e [102], em que o alvo é selecionado do grupo que consiste em uma molécula de ácido nucleico, uma molécula pequena, uma proteína, um carboidrato e um lipídeo.

[109] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [103], em que o alvo é uma proteína de regulação gênica.

[110] O método do parágrafo 104 em que a proteína de regulação gênica é um fator de transcrição.

[111] O método do parágrafo [103], em que a molécula de ácido nucleico é uma molécula de DNA ou uma molécula de RNA.

[112] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [106], em que o complexo modula a expressão gênica.

[113] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [107], em que o complexo modula a transcrição direcionada de uma molécula de DNA, a remodelação epigenética de uma molécula de DNA ou a degradação de uma molécula de DNA.

[114] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [108], em que o complexo modula a degradação do alvo, a translocação do alvo ou a transdução do sinal alvo.

[115] O método de qualquer um dos parágrafos [107] - [109], em que a expressão gênica está associada à patogênese de uma doença ou afeção.

[116] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [110], em que o complexo é detectável pelo menos 7, 8, 9 ou 10 dias após a entrega.

[117] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [111], em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução está presente pelo menos cinco dias após a entrega.

[118] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [112], em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução está presente pelo menos 6, 7, 8, 9 ou 10 dias após a entrega.

[119] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [113], em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução é um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução não modificado.

[120] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [114], em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução tem uma estrutura secundária quase de dupla cadeia.

[121] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [115], em que a sequência de aptâmero tem ainda uma estrutura terciária que se liga ao alvo.

[122] O método de qualquer um dos parágrafos [101] - [116], em que a célula é uma célula eucariótica.

[123] O método de qualquer parágrafo [117], em que a célula eucariótica é uma célula humana.

[124] Um método de ligação a um fator de transcrição em uma célula, o método compreendendo:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o fator de transcrição e modula a expressão gênica.

[125] Um método de ligação a um fator de transcrição em uma célula, o método compreendendo:

entrega de um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução para a célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreende uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição e em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o fator de transcrição e modula a expressão gênica.

[126] Um método para sequestrar um fator de transcrição em uma célula, o método compreendendo:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução sequestra o fator de transcrição ligando-se ao fator de transcrição para formar um complexo na célula.

[127] Um método para sequestrar um fator de transcrição em uma célula, o método compreendendo:

entrega de um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução para a célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreende uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição e em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução sequestra o fator de transcrição ligando-se ao fator de transcrição para formar um complexo.

[128] O método de qualquer um dos parágrafos [121] e [122], em que a viabilidade celular diminui após a formação do complexo.

[129] O método de sensibilização de uma célula a um agente citotóxico, o método compreendendo:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição; e

entregar o agente citotóxico e o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o fator de transcrição na célula; sensibilizando assim a célula para o agente citotóxico em comparação com uma célula sem o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

[130] O método de sensibilização de uma célula a um agente citotóxico, o método compreendendo:

entrega do agente citotóxico e um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução para a célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreende uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição e em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o fator de transcrição na célula.

sensibilizando assim a célula para o agente citotóxico em comparação com uma célula sem o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

[131] O método de qualquer um dos parágrafos [124] e [125], em que a sensibilização da célula ao agente citotóxico resulta em viabilidade celular diminuída após a distribuição do agente citotóxico e do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

[132] O método do parágrafo [126], em que a viabilidade celular diminuída é diminuída em 40% ou mais pelo menos dois dias após a entrega do agente citotóxico e do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

[133] O método de ligação de uma proteína patogênica em uma célula, o método compreendendo:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga à proteína patogênica; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a proteína patogênica para degradar a proteína patogênica.

[134] O método de ligação de uma proteína patogênica em uma célula, o método compreendendo:

entregar um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreende uma sequência de aptâmero que se liga à proteína patogênica; e em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a proteína patogênica para degradar a proteína patogênica.

[135] Um método de ligação de uma molécula de ácido ribonucleico em uma célula, o método compreendendo:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência complementar a uma sequência da molécula de ácido ribonucleico; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular

incompetente para tradução forma um complexo com a molécula de ácido ribonucleico na célula.

[136] Um método de ligação de uma molécula de ácido ribonucleico em uma célula, o método compreendendo:

entregar um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreende uma sequência de aptâmero que se liga à molécula de ácido ribonucleico; em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula de ácido ribonucleico na célula.

[137] Um método de ligação da molécula de ácido desoxirribonucleico genômico em uma célula, o método compreendendo:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga à molécula de ácido desoxirribonucleico genômico; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula de ácido desoxirribonucleico genômico e modula a expressão gênica.

[138] Um método de ligação da molécula de ácido desoxirribonucleico genômico em uma célula, o método compreendendo:

entregar um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreende uma sequência de aptâmero que se liga à molécula de ácido desoxirribonucleico genômico; em que o polirribonucleotídeo circular

incompetente para tradução forma um complexo com a molécula de ácido desoxirribonucleico genômico e modula a expressão gênica.

[139] Um método de ligação de uma molécula pequena em uma célula, o método compreendendo:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga à molécula pequena; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula pequena e modula um processo celular (por exemplo, degradação de proteína, sinalização celular, expressão gênica, etc.).

[140] Um método de ligação de uma molécula pequena em uma célula, o método compreendendo:

entregar um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreende uma sequência de aptâmero que se liga à molécula pequena; em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula pequena e modula um processo celular (por exemplo, degradação de proteínas, sinalização celular, expressão gênica, etc.).

[141] O método de qualquer um dos parágrafos [134] e [135], em que a molécula pequena é um composto orgânico com um peso molecular de não mais do que 900 daltons e modula um processo celular.

[142] O método de qualquer um dos parágrafos [134] - [136], em que a molécula pequena é um fármaco.

[143] O método de qualquer um dos parágrafos [134] e [135], em que a molécula pequena é um fluoróforo.

[144] O método de qualquer um dos parágrafos [134] - [136], em que a molécula pequena é um metabólito.

[145] Um composição compreendendo um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga a um alvo.

[146] Um composição farmacêutica compreendendo um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução que compreende uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao alvo; e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[147] Uma célula que compreende o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução de qualquer um dos parágrafos [101] - [141].

[148] Um método de tratamento de um sujeito em necessidade, compreendendo a administração da composição de qualquer um dos parágrafos [101] - [140] ou da composição farmacêutica do parágrafo [141].

[149] Um polinucleotídeo que codifica o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução de qualquer um dos parágrafos [101] - [141].

[150] Um método de produção do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução de qualquer um dos parágrafos [101] - [141].

[0342] Todas as referências e publicações e referências citadas aqui são deste modo incorporadas por referência.

[0343] Os seguintes exemplos são fornecidos para ilustrar ainda mais algumas modalidades da presente invenção, por exemplo, usando elementos modelo, mas não se destinam a limitar o escopo da invenção; será entendido por sua natureza exemplificativa que outros procedimentos, metodologias ou técnicas conhecidas por aqueles peritos na técnica podem ser usados alternativamente.

EXEMPLOS

Exemplo 1: RNA circular que se liga ao DNA para regular a expressão gênica

[0344] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular ao DNA para regular a expressão gênica.

[0345] Um RNA circular que não ocorre naturalmente foi manipulado para incluir uma sequência dentro de um gene alvo modelo, neste caso, o gene de di-hidrofolato redutase (DHFR). Encontrado em todos os organismos, DHFR desempenha um papel crítico na regulação da quantidade de tetra-hidrofolato na célula. O tetra-hidrofolato e seus derivados são essenciais para a síntese de purinas e timidilatos, importantes para a proliferação e crescimento celular. DHFR desempenha um papel central na síntese de precursores de ácido nucleico. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga ao gene de DHFR para suprimir sua transcrição.

[0346] O RNA circular é desenhado para incluir a sequência de ligação de DHFR 5'-ACAAAUGGGGACGAGGGGGCGGGGCGGCC-3' (SEQ ID NO: 5).

[0347] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA incluindo a sequência de ligação de DHFR descrita acima. O RNA transcrito é purificado com um sistema de

purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0348] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0349] Conforme mostrado na **FIG. 5C**, uma ligação de RNA circular ao DNA genômico de DHFR é avaliada por meio de vários métodos, incluindo CHART-qPCR, que avalia a ligação direta de RNA ao DNA genômico, qPCR específico de transcrição de DHFR, bem como proliferação celular e ensaios de crescimento celular. Espera-se que a ligação ativa do RNA circular ao gene DHFR resulte em diminuição da transcrição de DHFR, diminuição da síntese de purina e timidilato e diminuição da proliferação celular e crescimento celular.

Exemplo 2: RNA circular que se liga ao dsDNA para regular a expressão gênica

[0350] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular ao dsDNA para regular a expressão gênica.

[0351] Conforme mostrado na **FIG. 5D**, um RNA circular de ocorrência não natural é manipulado para incluir uma sequência que se liga a um gene alvo modelo, neste caso, sequências alvo do fator de crescimento beta transformador (TGF- β). O TGF- β é secretado por muitos tipos de células. Após a ligação ao receptor TGF- β , o receptor fosforila e

ativa uma cascata de sinalização que leva à ativação de diferentes substratos e proteínas reguladoras a jusante. O seguinte exemplo descreve a ligação circular do RNA aos genes alvo de TGF- β para suprimir sua transcrição.

[0352] RNA circular é desenhado para incluir a sequência de ligação ao alvo TGF- β 5'-CGGAGAGCAGAGAGGGAGCG-3' (SEQ ID NO: 6).

[0353] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo a sequência de ligação de TGF- β . O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0354] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0355] RNA circular se ligando ao dsDNA é avaliada através de um ensaio de captura imune triplex. Aqui, a formação de estruturas triplas de RNA-DNA é avaliada usando uma molécula de ssRNA de Oligonucleotídeo Formador de Triplex marcado com biotina (TFO) (sequência de controle ou sequência de direcionamento 5'-CGGAGAGCAGAGAGGGAGCG-3' (SEQ ID NO: 7)) para suspender as sequências de DNA alvo de dentro das células ou de núcleos isolados das células. O DNA suspenso pelo TFOs de controle ou de direcionamento biotinilado é

sequenciado para determinar as sequências de DNA enriquecidas após suspensão do RNA-dsDNA.

[0356] Os métodos alternativos para demonstrar a ligação RNA-DNA incluem CHART-qPCR e ensaio de mudança de mobilidade em gel, onde o oligo ssRNA de direcionamento (5'-CGGAGAGCAGAGAGGGAGCG-3' (SEQ ID NO: 7)) interage com o oligo de dsDNA alvo (5'-AGAGAGAGGGAGAGAG-3' (SEQ ID NO: 8) e 3'-TCTCTCTCCCTCTCTC-5' (SEQ ID NO: 9)), mas não oligos de DNA de controle.

[0357] Avaliações adicionais para alterações funcionais induzidas a seguir à ligação de RNA alvo incluem alterações nos genes alvo TGF-beta, incluindo TGFB2, TGFBR1 e/ou SMAD2, medido por qPCR.

Exemplo 3: RNA circular que se liga ao DNA para regular a expressão gênica

[0358] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular ao DNA para inibir a ligação do fator de transcrição.

[0359] Um RNA circular que não ocorre naturalmente foi concebido para incluir uma sequência de ligação a uma sequência alvo, aqui uma sequência do fator de transcrição de globina gama. A hemoglobina fetal é a principal proteína de transporte de oxigênio no feto humano durante os últimos sete meses de desenvolvimento no útero e persiste no recém-nascido até aproximadamente 6 meses de idade após o nascimento. A hemoglobina fetal se liga ao oxigênio com uma maior afinidade do que a hemoglobina de adulto, dando ao feto em desenvolvimento melhor acesso ao oxigênio da corrente sanguínea da mãe. Em recém-nascidos, a hemoglobina fetal é quase completamente substituída pela hemoglobina do adulto em aproximadamente 6 meses após o nascimento.

[0360] GATA-1 é um constituinte do complexo repressor GATA-1-FOG-1-Mi2b que se liga aos motivos GATA -567 γ / γ -566 γ -globina. O exemplo a seguir descreve a ligação de RNA circular aos motivos GATA -567 γ / γ -566 γ -globina (coordenadas do GenBank 33992 a 33945 do ficheiro de acesso GI455025 e coordenadas do GenBank 38772 a 38937 do ficheiro de acesso GI455025, respectivamente) para evitar fatores inibitórios da transcrição/complexos repressivos de ligação.

[0361] RNA circular foi desenhado para incluir a sequência de ligação não-deleção onde o complexo do fator inibitório de transcrição GATA1, Mi2b ou Fogl, se liga.

[0362] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo a sequência de ligação do fator de transcrição. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0363] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0364] A ligação de RNA circular ao DNA é avaliada através de um método de ligação de DNA direta como CHART-qPCR e a função é avaliada através de métodos como a ativação e expressão de hemoglobina fetal. Espera-se que a ligação ativa

do RNA circular a elementos reguladores a montante dos genes da γ -globina resulte na inibição competitiva do fator de transcrição, BCL11A, ou outros fatores de transcrição inibitórios para ativar a transcrição de HbF. Mudanças nos níveis de HbF podem ser medidas por meio de análise de HPLC, análise de citometria de fluxo e/ou qPCR.

Exemplo 4: RNA circular que se liga a um DNA duplex

[0365] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a um DNA duplex

[0366] Um RNA circular de ocorrência não natural pode ser manipulado para incluir uma sequência de ligação de DNA ao sulco maior. Oligonucleotídeos de RNA curtos (15-mer) (oligonucleotídeo formador de triplex (TFO)) podem formar um complexo de RNA:DNA de hélice tripla estável. A terceira cadeia na estrutura triplex (ou seja, o TFO) segue um caminho através do sulco principal do DNA duplex. A especificidade e estabilidade da estrutura triplex é fornecida por ligações de hidrogênio de Hoogsteen, que são diferentes daquelas formadas no emparelhamento de bases clássico de Watson-Crick em DNA duplex. O TFO se liga à cadeia rica em purinas do duplex alvo através do sulco principal.

[0367] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA com sequência de polipurina de 10-15 bases. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0368] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA

usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0369] A ligação de RNA circular ao DNA é avaliada através de um método de DNA direto, tal como CHART-qPCR, que avalia a ligação direta de RNA ao DNA genômico. Métodos alternativos para avaliar a ligação de RNA circular ao dsDNA incluem um ensaio de captura imune triplex e ensaio de mudança de mobilidade em gel.

Exemplo 5: RNA circular que se liga e sequestra transcritos de RNA

[0370] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a e sequestra transcritos de RNA.

[0371] Um RNA circular de ocorrência não natural é manipulado para incluir uma ou mais novas sequências de ligação para os transcritos de RNA. Moléculas de RNA com tratos CGG expandidos são direcionadas para a ligação de RNA circular. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga à região de repetição do RNA para sequestro.

[0372] O RNA circular foi desenhado para incluir a sequência complementar em repetições de expansão de FMR1 50-220 5'-CGG-3'.

[0373] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo repetições de expansão de FMR1 50-220. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher

Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0374] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0375] A ligação do RNA circular ao mRNA FMR1 é avaliada por um ensaio de qPCR suspenso de oligonucleotídeo, no qual oligonucleotídeos modificados complementares ao RNA circular são usados para suspender o mRNA FMR1, que é transcrito reversamente e amplificado por qPCR. A ligação também é avaliada pela co-localização de dois oligos fluorescentes, um específico para o mRNA FMR1 e outro complementar ao RNA circular e avaliação por RNA FISH.

Exemplo 6: RNA circular que se liga e sequestra transcritos de RNA

[0376] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a e sequestra transcritos de RNA.

[0377] Um RNA circular de ocorrência não natural é manipulado para incluir uma ou mais novas sequências de ligação para os transcritos de RNA. SCA8 utiliza uma repetição de expansão de CTG. A repetição CTG ocorre em um gene que é transcrito, mas não traduzido. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga à região de repetição do mRNA para sequestro.

[0378] O RNA circular foi desenhado para incluir a sequência complementar em repetições de expansão de SCA8 50-120 5'-CUG-3'.

[0379] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo repetições de expansão de SCA8 50-120. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0380] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0381] A ligação do RNA circular ao RNA SCA1 é avaliada por um ensaio de qPCR suspenso de oligonucleotídeo, no qual oligonucleotídeos modificados complementares ao RNA circular são usados para suspender as repetições de expansão SCA8, que são transcritas reversamente e amplificadas por qPCR. RNA FISH também é usado para avaliar a ligação por colocalização de dois oligos fluorescentes, um específico para o mRNA SCA8 e um complementar ao RNA circular é avaliado por RNA FISH.

Exemplo 7: RNA circular que se liga e sequestra transcritos de RNA

[0382] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a e sequestra transcritos de RNA.

[0383] Um RNA circular sintético é manipulado para incluir uma ou mais novas sequências de ligação para os transcritos de RNA. O gene huntingtina (HTT) inclui um segmento de 6-35 resíduos de glutamina na sua forma selvagem. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga à região de repetição do mRNA para sequestro.

[0384] O RNA circular foi desenhado para incluir a sequência complementar em repetições de expansão de HTT 40-120 5'-CAG-3'.

[0385] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo repetições de expansão de HTT 40-120. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0386] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0387] Um método para avaliar a ligação do RNA circular ao RNA HTT é avaliada por um ensaio de qPCR suspenso de oligonucleotídeo, no qual oligonucleotídeos modificados complementares ao RNA circular são usados para suspender o RNA HTT, que é transcrito reversamente e amplificado por qPCR. RNA FISH também é usado para avaliar a ligação por colocalização de dois oligos fluorescentes, um específico

para o HTTA e um complementar ao RNA circular é avaliado por RNA FISH.

Exemplo 8: RNA circular que se liga e sequestra transcritos de RNA e enzimas

[0388] Este exemplo descreve a ligação simultânea de RNA circular a e sequestro de transcritos de RNA e proteína para auxílio na degradação de RNA.

[0389] Um RNA circular de ocorrência não natural é manipulado para incluir uma ou mais novas sequências de ligação para transcritos, bem como uma proteína para auxílio na degradação do transcrito. A proteína atrofina-1 é codificada pelo ATN1 e é usada como sistema modelo. A proteína codificada inclui uma repetição de serina, uma região de alternância de aminoácidos ácidos e básicos, bem como a repetição variável de glutamina. O gene ATN1 possui um segmento de DNA denominado repetição de trinucleotídeos CAG.

[0390] Em células eucarióticas, a maioria dos mRNAs tem uma estrutura *cap* de guanosina monometílica em 5' e cauda poli(A) em 3', que são importantes para a tradução e estabilidade de mRNA. A remoção da estrutura *cap* 5' (decapagem) é um pré-requisito para a decaimento do corpo do mRNA da extremidade 5'. A proteína Dcp2 foi identificada como a principal enzima de decapagem de mRNA nas células. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular liga-se à região de repetição do mRNA para sequestro e proteína Dcp2 para decapagem do mRNA.

[0391] O RNA circular foi desenhado para incluir a sequência complementar em repetições de expansão de ATN1 40-120 5'-

CAG-3' e estrutura de *cap* de RNA para reconhecimento por Dcp2.

[0392] O RNA circular foi desenhado para incluir a sequência complementar em repetições de expansão de ATN1 40-120 5'-CAG-3' e estrutura de *cap* de RNA para reconhecimento por Dcp2. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA. O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0393] Um método para avaliar a ligação do RNA circular ao RNA ATN1 é avaliada por um ensaio de qPCR suspenso de oligonucleotídeo, no qual oligonucleotídeos modificados complementares ao RNA circular são usados para suspender o RNA ATN1, que é transcrito reversamente e amplificado por qPCR. A função de decapagem é avaliada por qSL-RT-PCR, que combina ligação imobilizada e RT-PCR quantitativo (Blewett, et al., RNA, 2011, Mar, 17 (3): 535-543).

Exemplo 9: RNA circular para substituição de mRNA

[0394] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a um mRNA alvo, criando um sítio de clivagem de ribozima.

[0395] Um RNA circular que não ocorre naturalmente foi manipulado para incluir uma sequência que se liga à isoforma M2 do mRNA de piruvato-quinase. Conforme mostrado no exemplo

a seguir, o RNA circular se liga à isoforma M2 alvo da piruvato quinase (PK), resultando em sua clivagem.

[0396] O RNA circular é desenhado para incluir as sequências complementares para a isoforma M2 de piruvato-quinase que vai gerar um sítio de clivagem de ribozima VS no alvo. O RNA circular inclui adicionalmente sequências para a ribozima VS de ação trans e a sequência codificadora para a isoforma M1 da piruvato quinase.

[0397] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA com a sequência complementar da isoforma M2, a ribozima VS e a sequência codificadora M1. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0398] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0399] A ligação de RNA circular a, e degradação concomitante de, mRNA PK M2 é avaliada por RT-PCR. A expressão restaurada de mRNA PK M1 é avaliada de maneira semelhante. Além disso, a expressão das proteínas PK M1 e PK M2 é avaliada por western blotting. As evidências de alterações funcionais induzidas após a ligação e clivagem do RNA alvo incluem ensaios de proliferação celular.

Exemplo 10: RNA circular para clivagem de mRNA alvo

[0400] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a um mRNA alvo modelo, criando um sítio de clivagem de ribozima.

[0401] Um RNA circular que não ocorre naturalmente foi manipulado para incluir uma sequência que se liga ao mRNA SRSF1. O exemplo seguinte descreve a ligação de RNA circular ao alvo mRNA SRSF1, resultando na sua clivagem.

[0402] O RNA circular é desenhado para incluir sequências complementares ao mRNA tSRSF1 que irá gerar um sítio de clivagem de ribozima VS no alvo. O RNA circular contém adicionalmente sequências para a ribozima VS de ação trans e a sequência codificante para a isoforma M1 de piruvato quinase. São utilizadas outras ribozimas de ação trans, tais como HDV, cabeça de martelo, grupo I e/ou grupo II.

[0403] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo sequência complementar SRSF1, ribozima VS. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0404] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0405] A ligação de RNA circular a, e degradação concomitante de, mRNA SRSF1 é avaliada por RT-PCR. A

expressão da proteína SRSF1 é avaliada por Western blotting. Evidências adicionais para alterações induzidas após a ligação e clivagem do RNA alvo incluem ensaios de proliferação celular.

Exemplo 11: RNA circular que sequestra RNA circular

[0406] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a RNA circular.

[0407] RNA circular pode estar presente em certas linhas celulares. Um exemplo é circ-Dnmt1. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga a circ-Dnmt1.

[0408] Um RNA circular é desenhado para incluir uma sequência complementar à do circ-DNMT1 para inibir as suas interações de RNA-proteína.

[0409] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo as sequências apropriadas. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0410] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0411] O método para avaliar a ligação de RNA circular a circ-Dnmt1 é por suspensão de RNA circular usando um oligo biotinilado complementar a uma região do RNA circular seguido

por RT-PCR. Além disso, o ensaio de mudança de mobilidade eletroforética é usado para visualizar complexos circulares de RNA-circDnmt1.

Exemplo 12: RNA circular que sequestra dois miRNA

[0412] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a dois miRNAs separados.

[0413] Um RNA circular é desenhado para incluir uma sequência complementar a dois miRNAs modelo, aqui miR-9 e miR-1269.

[0414] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo as sequências apropriadas. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0415] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0416] O método para avaliar a ligação de RNA circular a miR-9 e miR-1269 é por suspensão de RNA circular usando um oligo biotinizado complementar a uma região do RNA circular seguido por RT-PCR. Além disso, o ensaio de mudança de mobilidade eletroforética é usado para visualizar complexos circulares de RNA-miRNA-miRNA.

Exemplo 13: RNA circular que se liga e sequestra pelo menos dois transcritos de RNA individuais

[0417] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a e sequestra pelo menos dois transcritos de RNA modelo.

[0418] Um RNA circular sintético é manipulado para incluir duas ou mais novas sequências de ligação para os transcritos de RNA. SCA8 utiliza uma repetição de expansão de CTG. O gene FMR1 inclui expansões CGG. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga à região de repetição dos transcritos de RNA para sequestro.

[0419] Tal como mostrado no Exemplo seguinte, o RNA circular se liga à região de repetição do RNA para o sequestro de repetições de expansão FMR1 ou SCA8.

[0420] O RNA circular foi desenhado para incluir a sequência complementar de repetições de expansão de FMR1 50-220 5'-CGG-3' e a sequência complementar de repetições de expansão de SCA8 50-120 5'-CUG-3'.

[0421] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo as repetições de expansão. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0422] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A

qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0423] A ligação do RNA circular ao mRNA FMR1 ou SCA1 é avaliada por um ensaio de qPCR suspenso de oligonucleotídeo, no qual oligonucleotídeos modificados complementares ao RNA circular são usados para suspender o mRNA FMR1 ou SCA1, que é transcrito reversamente e amplificado por qPCR. A ligação também é avaliada pela co-localização de oligos fluorescentes, um específico para o mRNA FMR1 ou SCA1 e outro complementar ao RNA circular e a fluorescência é avaliada por RNA FISH.

Exemplo 14: RNA circular que se liga à proteína

[0424] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular à proteína para o sequestro.

[0425] A proteína 43 de ligação a TAR-DNA (TDP-43) é uma ribonucleoproteína heterogênea multifuncional implicada no processamento e estabilização de mRNA. TDP-43 compreende dois motivos de reconhecimento de RNA (RRMs), um sinal de localização nuclear e uma sequência de exportação nuclear mediando o transporte nuclear, bem como um domínio C-terminal rico em glicina (GRD) implicado nas interações e funções da proteína TDP-43. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga a TDP-43 para sequestro.

[0426] O RNA circular é desenhado para incluir os motivos de ligação de RNA TDP-43: 5'-(UG)_nUA(UG)_m-3', 5'-GAGAGAGCGUGUGUGUGUGUGUGUGUGGUGGUGCAUA-3' (SEQ ID NO: 10) ou ((UG)₆) e uma sequência de ligação à proteína para o domínio rico em glicina C-terminal para ligação competitiva a TDP-43 e inibir as suas funções de ligação/jusante.

[0427] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA compreendendo o motivo de RNA TDP-43 e a sequência de ligação a proteína para o domínio C-terminal rico em glicina. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0428] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0429] A ligação do RNA circular a TDP-43 é avaliada *in vitro* por EMSA (ensaio de mudança de mobilidade eletroforética do RNA). Quando TDP-43 está ligado ao circRNA, a velocidade de migração durante a eletroforese em gel é mais lenta do que a do RNA circular não ligado. Além disso, RIP (imunoprecipitação de RNA) usando anticorpo anti-TDP-43, acoplado com qPCR específico de RNA circular é usado para avaliar a ligação do transcrito em extratos celulares. Para avaliar se o RNA circular se liga a TDP-43 para sequestro, a localização de TDP-43 é analisada em células tratadas com e sem RNA circular. Se o RNA circular sequestrar TDP-43, espera-se que a localização de TDP-43 permaneça no citoplasma. Além disso, em TDP43, o sequestro por RNA circular deve resultar em maior sobrevivência.

Exemplo 15: RNA circular que se liga à proteína

[0430] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular à proteína para o sequestro.

[0431] O fator 8 de processamento de *splicing* de pré-mRNA é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene PRPF8 e é um componente de spliceossomos dependentes de U2 e U12, e considerada essencial para a etapa catalítica II no processo de *splicing* do mRNA. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga a PRPF8 para sequestro.

[0432] O RNA circular é desenhado para incluir no motivo de ligação de RNA PRPF85'-
 AUUGCCUAUAGAACUUAUAACGAACAUGGUUCUUGCCUUUUACCAGAACCAUCCGGGUG
 UUGUCUCCAUAGA-3' (SEQ ID NO: 11) para se ligar competitivamente a PRPF8 e inibir sua função.

[0433] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um segmento de DNA que compreende a sequência de ligação a PRPF8. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0434] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0435] Um método de avaliar a ligação de RNA circular a PRPF8 é EMSA (ensaio de mudança de mobilidade eletroforética de RNA). Quando PRPF8 está ligado ao RNA circular, a velocidade de migração durante a eletroforese em gel é mais lenta do que a do RNA circular não ligado. Além disso, RIP (imunoprecipitação de RNA) usando anticorpo anti-PRPF8, acoplado com qPCR específico de RNA circular é usado para avaliar a ligação do transcrito em extratos celulares. Para avaliar se o RNA circular sequestra PRPF8 e altera a função celular, a expressão de marcadores de superfície de células-tronco como CD44+/CD24+ é avaliada por FACS após a entrega de RNA circular.

Exemplo 16: RNA circular que se liga à proteína

[0436] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a uma proteína modelo para o sequestro.

[0437] O homólogo humano LIN28A é uma proteína de ligação a RNA (RBP) com um domínio N-terminal de frio-choque (CSD) e dois domínios em dedo de zinco (CCHC) CysCysHisCys em C-terminal. LIN28A humano é predominantemente citoplasmático e está associado a componentes celulares, tais como ribossomos, corpos P e grânulos de estresse. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga a LIN28A para sequestro.

[0438] O RNA circular é desenhado para incluir a sequência preE_M-let-7f 5'-GGGGUAGUGAUUUUACCCUGGAGAU-3' (SEQ ID NO: 12), uma sequência de RNA com o motivo de ligação LIN28A GGAG para se ligar competitivamente a LIN28A.

[0439] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um segmento de DNA que compreende uma sequência de ligação a

LIN28A. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0440] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0441] Um método de avaliar a ligação de RNA circular a LIN28A é EMSA (ensaio de mudança de mobilidade eletroforética de RNA). Quando LIN28A está ligado ao RNA circular, a velocidade de migração durante a eletroforese em gel é mais lenta do que a do RNA circular não ligado. Além disso, RIP (imunoprecipitação de RNA) usando anticorpo anti-LIN28A, acoplado com qPCR específico de RNA circular é usado para avaliar a ligação do transcrito em extratos celulares e uma imunofluorescência LIN28A combinada com FISH de RNA circular é usada para avaliar a co-localização nas células. Para avaliar se o RNA circular se liga a LIN28A para sequestro e alteração da função celular, o RNA circular é entregue nas células humanas. Após o tratamento de RNA circular, os níveis de expressão de LET-7g maduro são medidos por q-RT-PCR. Além disso, o crescimento celular das células tratadas é medido pelo método MTT.

Exemplo 17: RNA circular que se liga à proteína

[0442] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a uma proteína modelo para o sequestro.

[0443] A proteína 1 de ligação a CUG (CUGBP1) regula a expressão gênica nos níveis de *splicing* alternativo, degradação de mRNA e tradução. A rede regulatória pós-transcricional envolve a proteína 1 de ligação a CUG e ligação a RNA (CUGBP1), também conhecida como CUGBP- e membro 1 da família semelhante a ELAV (CELF1), que se liga a um elemento rico em GU (GRE) residente em 3'-UTR de transcritos alvo e medeia a degradação de transcritos contendo GRE. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga a CUGBP1 para sequestro.

[0444] RNA circular é desenhado para incluir pelo menos um motivo de RNA tendo UGU(G/U)UGU(G/U)UGU que é reconhecido por CUGBP1 e se ligam de forma competitiva a CUGBP1.

[0445] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um segmento de DNA que compreende uma sequência de ligação a CUGBP1. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0446] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A

qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0447] Um método de avaliar a ligação de RNA circular a CUGBP1 é EMSA (ensaio de mudança de mobilidade eletroforética de RNA). Quando CUGBP1 está ligado ao RNA circular, a velocidade de migração durante a eletroforese em gel é mais lenta do que a do RNA circular não ligado. Além disso, RIP (imunoprecipitação de RNA) usando anticorpo anti-CUGBP1, acoplado com qPCR específico de RNA circular é usado para avaliar a ligação do transcrito em extratos celulares e uma imunofluorescência CUGBP1 combinada com FISH de RNA circular é usada para avaliar a co-localização nas células. Para avaliar se RNA circular se liga a CUGBP1 para o sequestro e a função celular alterada, RNA circular é entregue nas células e proliferação celular pode ser medida utilizando um ensaio MTT colorimétrico.

Exemplo 18: RNA circular que se liga à proteína

[0448] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a uma proteína modelo para o sequestro.

[0449] Gemin 5 é uma proteína de ligação a RNA (RBP) é uma proteína predominantemente citoplasmática com um domínio C-terminal que alberga um sítio de ligação a RNA bipartido não canônico consistindo em domínios RBS1 e RBS2. Adicionalmente, Gemin5 liga-se a cap 7-metilguanossina (m7G) presente em transcritos de RNA Polimerase II e regula negativamente a tradução dependente de sítio interno de entrada ribossômica. Gemin5 pode controlar a síntese de proteína global por meio de sua ligação direta ao ribossomo, agindo como uma plataforma, servindo como um centro para

redes distintas de RNA-proteína. O exemplo seguinte descreve a ligação do RNA circular a GEMIN5 para sequestro.

[0450] O RNA circular é desenhado para incluir o domínio 5 da sequência IRES do vírus da febre aftosa (FMDV) e competitivamente se ligam a GEMIN5.

[0451] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um segmento de DNA que compreende uma sequência de ligação a GEMIN5. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0452] Um método de avaliar a ligação de RNA circular a GEMIN5 é EMSA (ensaio de mudança de mobilidade eletroforética de RNA). Quando GEMIN5 está ligado ao RNA circular, a velocidade de migração durante a eletroforese em gel é mais lenta do que a do RNA circular não ligado. Além disso, RIP (imunoprecipitação de RNA) usando anticorpo anti-GEMIN5, acoplado com qPCR específico de RNA circular é usado para avaliar a ligação do transcrito em extratos celulares e uma imunofluorescência GEMIN5 combinada com FISH de RNA circular é usada para avaliar a co-localização nas células. Para

avaliar se o RNA circular sequestra GEMIN5 e altera a tradução, o RNA circular é adicionado a um ensaio de tradução *in vitro*. A tradução de um RNA circular que codifica uma luciferase com um FMDV IRES é medida na presença e ausência da proteína GEMIN5 com e sem o RNA circular. O sequestro de GEMIN5 tem efeito na tradução mediada por proteína GEMIN5, como medido por leitura luminescente.

Exemplo 19: RNA circular que se liga a duas proteínas

[0453] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular simultaneamente a dois modelos de proteínas.

[0454] A ubiquitina ligase E3, MDM2, se liga e ubiquitina proteínas, tal como p53, marcando-as para degradação pelo proteassoma. O exemplo a seguir descreve o RNA circular que se liga simultaneamente a MDM2 e p53 para aumentar a ubiquitinação dependente de MDM2 de p53, como ilustrado na FIG. 16.

[0455] O RNA circular foi desenhado para incluir a sequência de RNA FOX3 que se liga a MDM2 e p53.

[0456] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo a sequência apropriada. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0457] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A

qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0458] Um método para avaliar a ligação de RNA circular a MDM2 e p53 é por ensaio de desvio de mobilidade eletroforética para visualizar cada complexo RNA-proteína ou, alternativamente, por suspensão de RNA circular usando um oligo biotinizado complementar a uma região do RNA circular seguido por imunotransferência. Além disso, a ubiquitinação de p53 por MDM2 através da ligação de RNA circular é testada por meio de imunotransferência com anticorpos anti-ubiquitina ou por espectrometria de massa.

Exemplo 20: RNA circular que se liga a DNA e proteína

[0459] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular simultaneamente a DNA e um modelo de proteína, aqui CBP/p300.

[0460] As proteínas CBP/p300 se associam a regiões potenciadoras por meio de interações com eRNAs. A ligação do RNA por CBP/p300, por sua vez, aumenta a atividade da histona acetil transferase (HAT) de CBP. Além disso, CBP e p300 se associam a outros HATs, bem como a fatores de transcrição e componentes da maquinaria de transcrição.

[0461] O RNA circular foi desenhado para incluir a região de ligação a CBP/p300 de eRNA, bem como uma região complementar de um sítio genômico alvo.

[0462] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo as sequências apropriadas. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0463] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0464] Um método para avaliar a ligação de RNA circular a CBP/p300 e DNA é suspensão de RNA circular usando um oligo biotinilado complementar a uma região do RNA circular, seguida de imunotransferência e PCR. Além disso, o ensaio de mudança de mobilidade eletroforética é usado para visualizar complexos circulares de RNA-proteína-DNA. A imunoprecipitação da cromatina (ChIP) com anti-H3K27ac é realizada para detectar mudanças na acetilação da histona no locus de interesse e detectar a ligação entre o RNA circular, CBP e a região genômica de interesse. Além disso, a expressão melhorada de um locus genômico silencioso é testada via qPCR ou Northern/Western blot.

Exemplo 21: RNA circular que se liga ao mRNA viral e ao miRNA

[0465] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular simultaneamente a mRNA e miRNA viral.

[0466] O vírus herpes simplex-1 (VHS-1) codifica vários miRNAs que regulam a transcrição viral. HSV-1-miR-H27 liga-se a mRNA do regulador da transcrição do hospedeiro semelhante a Kelch 24 (KLHL24) para induzir a transcrição de genes virais imediatos e iniciais.

[0467] O RNA circular foi desenhado para incluir as sequências complementares em HSV-1 miR-H27 e KLHL24.

[0468] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo as sequências apropriadas. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0469] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0470] O método para avaliar a ligação de RNA circular a ambos os transcritos é por suspensão de RNA circular usando um oligo biotinizado complementar a uma região do RNA circular seguido por RT-PCR. Além disso, o ensaio de mudança de mobilidade eletroforética é usado para visualizar complexos circulares de RNA-mRNA-miRNA.

Exemplo 22: RNA circular que se liga a uma membrana lipídica

[0471] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a uma membrana lipídica.

[0472] O RNA circular pode ser desenhado para se ligar especificamente a membranas lipídicas. O exemplo a seguir descreve uma ligação de RNA circular a uma membrana. Ao mediar a ligação das membranas celulares, o RNA circular é capaz de aproximar as células adjacentes umas das outras.

[0473] O RNA circular é desenhado para incluir pelo menos um motivo de RNA (sequências aqui descritas) que é desenhado para se ligar a uma membrana:

GUGAUGGCGCCUACGUCGAAGAAAGGAGUCUCAAGGGAAGGAGCGUAUAUGGUCGAUGA
AUCGGUCAUGUCGUCAGGGU (SEQ ID NO: 13);

GAGUCAUAGGACGCUCGCUCUUGCGACCAUGGGGCACGGGGAGCCCACUGCAUGGAUCU
AUCGUAU CAUAGUGCGGU (SEQ ID NO: 14);

GUAGCUUCCAUGAGACUUGAUCGGGGUCAUGGCUCUAGGCAUCGGAGAAGCUGACUAAC
U UGGUCACGUCGUACCGUGU (SEQ ID NO: 15);

GGACGCGUACGAAGGGCUGAUAGGGCAGAGCUCCAACUAUGCGUCCAGCUCGUGCAGUG
GAUCGGGUCGUGCCUGGU (SEQ ID NO: 16); e

CUUUGUCGGCCGAACUCGCUGUUUAACUGCCCGGCGAGAUCGCAGGGUGUUGUGCUAAU
CGCGUGCCGUGUG (SEQ ID NO: 17).

[0474] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA que compreende um ou mais dos motivos de ligação a lipídeos de RNA. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0475] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0476] Um método para avaliar a ligação de RNA circular a uma membrana lipídica é a incubação dos RNA circulares com lipossomos. Os lipossomos são fracionados usando uma coluna

Sephacryl S-1000. Todo o RNA não ligado é descartado. O RNA circular ligado é avaliado por qPCR, ou Northern blotting.

Exemplo 23: RNA circular para entrega de siRNA

[0477] Este exemplo descreve a RNA circular para entregar vários siRNA.

[0478] Um RNA circular que não ocorre naturalmente foi desenhado para incluir sequências de siRNA que se ligam ao modelo alvo de mRNA de Transtirretina (TTR). O seguinte Exemplo descreve o RNA circular derivado da ligação de siRNAs ao mRNA TTR alvo para inibir a tradução de proteína transtirretina.

[0479] O RNA circular é desenhado para incluir sequências complementares ao mRNA TTR (por exemplo *auggauacu cuugguactt*), que se ligam a mRNA de transtirretina que resulta na clivagem deste mRNA.

[0480] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo a sequência complementar de TTR. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0481] Para gerar RNA circular, as duas extremidades do RNA, carregando um 5'-fosfato e 3'-OH, são desenhadas com sequências complementares flanqueadoras adicionais. Essas sequências complementares hibridizam, resultando em um círculo cortado. Este corte é fechado pela T4 DNA ligase. A qualidade do RNA circular é avaliada por gel PAGE ou de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0482] A ligação de RNA circular a mRNA TTR é avaliada por suspensão de RNA circular usando um oligo biotilado complementar a uma sequência específica dentro do círculo seguida por RT-PCR. A função de siRNA é avaliada medindo os níveis de mRNA TTR alvo por RT-PCR em células tratadas vs não tratadas. A expressão da proteína TTR é avaliada por Western blotting.

Exemplo 24: RNA circular com nucleotídeos modificados foi gerado e seletivamente ligado a proteínas

[0483] Este Exemplo demonstra a geração de polirribonucleotídeo circular modificado que suporta a ligação à proteína. Além disso, este Exemplo demonstra que o RNA circular desenhado com modificações de nucleotídeos que interagiu seletivamente com proteínas envolvidas no monitoramento do sistema imunológico teve imunogenicidade reduzida em comparação com o RNA não modificado.

[0484] Um RNA circular de ocorrência não natural manipulado para incluir incorporação completa ou parcial de nucleotídeos modificados foi produzido. Como mostrado no seguinte Exemplo, o RNA linear modificado de comprimento total ou um híbrido de RNA linear modificado e não modificado foi circularizado e a estrutura da proteína foi avaliada através de medições da expressão de nLuc. Além disso, o RNA circular seletivamente modificado tinha reduzidas interações com proteínas que ativam genes relacionados imunes (q-PCR de MDA5, expressão de OEA e IFN-beta) em células BJ, como comparado com um RNA circular não modificado.

[0485] RNA circular com WT EMCV Nluc paragem espaçador foi gerado. Para substituição de modificação, os nucleotídeos modificados, pseudouridina e metilcitosina ou m6A, foram

adicionados em vez dos nucleotídeos não modificados padrão, uridina e citosina ou adenosina, respectivamente, durante a reação de transcrição *in vitro*. O WT EMCV IRES foi sintetizado separadamente da ORF de nLuc. O WT EMCV IRES foi sintetizado usando nucleotídeos modificados (completamente modificados) ou não modificados (híbridos modificados). Em contraste, a sequência de ORF de nLuc foi sintetizada usando os nucleotídeos modificados, pseudouridina e metilcitosina ou m6A, em vez dos nucleotídeos não modificados padrão, uridina e citosina ou adenosina, respectivamente, para a sequência completa durante a reação de transcrição *in vitro*. Após síntese do IRES modificado ou não modificado e da ORF modificada, estes dois oligonucleotídeos foram ligados em conjunto usando T4 DNA ligase. Como mostrado na **FIG. 9A**, foram gerados RNAs circulares completamente modificados (construto superior) ou modificados híbridos (construto inferior).

[0486] Para medir a eficiência de estrutura da proteína, foi medida a expressão de nLuc dos construtos completamente modificados ou modificados híbridos. Após 0,1 pmol de RNA linear e circular serem transfectados para fibroblastos BJ durante 6 h, a expressão de nLuc foi medida às 6 h, 24 h, 48 h e 72 h pós-transfecção.

[0487] Conforme mostrado na **FIG. 9B** e **FIG. 9C**, o RNA circular completamente modificado reduziu muito a capacidade de ligação à proteína, conforme medido pelo resultado de tradução da proteína, em comparação com o RNA circular não modificado. Em contraste, a modificação híbrida demonstrou tanto quanto ou aumentou a ligação a proteínas, por exemplo, maquinaria de tradução de proteínas.

[0488] Para adicional medição da eficiência de estrutura da proteína, RNA circular completamente modificado foi transfectado em células e a estrutura da proteína para proteínas imunitárias foi medida. O nível de estrutura de proteína para proteínas imunitárias que ativam genes de resposta imune inata foi monitorado em células BJ transfectadas com RNA circular não modificado, ou RNA circular completamente modificado com modificações de pseudouridina e metilcitosina ou m6A. O RNA total foi isolado das células usando um reagente de extração à base de fenol (Invitrogen) e submetido a transcrição reversa para gerar cDNA. A análise de qRT-PCR para genes relacionados ao sistema imunológico foi realizada usando uma mistura de PCR quantitativa baseada em corante (BioRad).

[0489] Tal como mostrado nas **FIGS 10A-C**, níveis de qRT-PCR dos genes relacionados com a imunidade de células BJ transfectadas com RNA circular completamente modificado, ambos RNAs circulares completamente modificados em pseudouridina e metilcitosina ou M6A, mostraram uma redução dos níveis de expressão de MDA5, OEA e IFN-beta em comparação com células transfectadas com RNA circular não modificado, indicando redução da estrutura de proteína entre RNAs circulares modificados e proteínas imunitárias que ativam genes imunogênicos relacionados. Assim, a modificação do RNA circular, em comparação com o RNA circular não modificado, teve um impacto na estrutura da proteína. A modificação seletiva permitiu a ligação da maquinaria de tradução de proteínas, enquanto a modificação completa reduziu a ligação a proteínas que ativam genes imunogênicos relacionados em células receptoras transfectadas.

Exemplo 25: RNA circular com nucleotídeos modificados reduziu a imunogenicidade

[0490] Este Exemplo demonstra a geração de polirribonucleotídeo circular modificado que produziu um produto de proteína. Adicionalmente, este Exemplo demonstra o RNA circular manipulado com modificações de nucleotídeos tinha imunogenicidade reduzida em comparação com um RNA não modificado.

[0491] Um RNA circular não ocorrendo naturalmente manipulado para incluir uma ou mais propriedades desejáveis e com incorporação completa ou parcial de nucleotídeos modificados foi produzido. Como mostrado no seguinte Exemplo, o RNA linear modificado de comprimento total ou um híbrido de RNA linear modificado e não modificado foi circularizado e a expressão de nLuc foi avaliada. Adicionalmente foi mostrado que o RNA circular modificado tinha ativação reduzida de genes imunorrelacionados (q-PCR da expressão de MDA5, OAS e IFN-beta) em células BJ, em comparação com um RNA circular não modificado.

[0492] RNA circular com WT EMCV Nluc paragem espaçador foi gerado. Para substituição de modificação, os nucleotídeos modificados, pseudouridina e metilcitosina ou m6A, foram adicionados em vez dos nucleotídeos não modificados padrão, uridina e citosina ou adenosina, respectivamente, durante a reação de transcrição *in vitro*. O WT EMCV IRES foi sintetizado separadamente da ORF de nLuc. O WT EMCV IRES foi sintetizado usando nucleotídeos modificados (completamente modificados) ou não modificados (híbridos modificados). Em contraste, a sequência de ORF de nLuc foi sintetizada usando os nucleotídeos modificados, pseudouridina e metilcitosina

ou m6A, em vez dos nucleotídeos não modificados padrão, uridina e citosina ou adenosina, respectivamente, para a sequência completa durante a reação de transcrição *in vitro*. Após síntese do IRES modificado ou não modificado e da ORF modificada, estes dois oligonucleotídeos foram ligados em conjunto usando T4 DNA ligase. Como mostrado na **FIG. 9**, foram gerados RNAs circulares modificados híbridos.

[0493] Para medir a eficiência da expressão, RNA circular modificado híbrido foi transfectado em células e expressão de proteínas imunitárias foi medida. Os níveis de expressão de genes de resposta imune inata foram monitorados em células BJ transfectadas com RNA circular não modificado ou RNAs circulares modificados híbridos com modificações de pseudouridina e metilcitosina ou m6A. O RNA total foi isolado das células usando um reagente de extração à base de fenol (Invitrogen) e submetido a transcrição reversa para gerar cDNA. A análise de qRT-PCR para genes relacionados ao sistema imunológico foi realizada usando uma mistura de PCR quantitativa baseada em corante (BioRad).

[0494] Conforme mostrado na **FIG. 11**, os níveis de qRT-PCR de genes relacionados com a imunidade de células BJ transfectadas com RNAs circulares modificados híbridos, RNAs circulares modificados híbridos de pseudouridina e metilcitosina mostraram níveis reduzidos de expressão de RIG-I, MDA5, IFN-beta e OAS em comparação com células transfectadas com RNA circular não modificado, indicando imunogenicidade reduzida deste RNA circular modificado híbrido que ativou os genes imunogênicos relacionados. Ao contrário do RNA circular completamente modificado mostrado no Exemplo 24, o RNA circular modificado híbrido m6A mostrou

níveis semelhantes de expressão de RIG-I, MDA5, IFN-beta e OAS, tal como células transfectadas com RNA circular não modificado. Assim, a modificação do RNA circular, em comparação com o RNA circular não modificado, bem como o nível de modificação, teve um impacto na ativação de genes imunogênicos relacionados.

Exemplo 26: RNA circular ligado a uma molécula pequena

[0495] Este exemplo demonstra a ligação de RNA circular a uma molécula pequena para sequestro/bioatividade.

[0496] Aptâmeros de RNA linear mango fluorescem quando ligados por uma molécula pequena, corante biotina TO-1. Como mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular Mango se liga ao derivado de laranja tiazol, biotina TO-1 para sequestro/bioatividade.

[0497] RNA circular foi concebido para incluir sítios de aptâmero de ligação à molécula pequena de RNA mango e uma haste de estabilização: 5'- AATAGCCG GUCUACGGCC AUACCACCCU GAACGCGCCC GAUCUCGUCU GAUCUCGGAAGCUAAGCAGG GUCGGGCCUG GUUAGUACUU GGAUGGGAGA CCGCCUGGAAUACCGGGUG CUGUAGGCGU CGACUUGCCA UGUGUAUGUG GGUACGAAGGAAGGAUUGGU AUGUGGUAUA UUCGUACCCA CAUACUCUGA UGAUCCUUCG GGAUCAUUCA UGGCAA CGGCTATT-3' (SEQ ID NO: 18), bem como sequências de circularização: 5'-AATAGCCG-3' (SEQ ID NO: 19) e 5'-CGGCTATT-3' (SEQ ID NO: 20).

[0498] O RNA linear não modificado foi sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um segmento de DNA compreendendo o motivo de RNA Mango, hastes e sequências de circularização. O RNA transcrito foi purificado com um estojo de limpeza de RNA (New England Biolabs, T2050), tratado com RNA 5'-fosfo-hidrolase (RppH)

(New England Biolabs, M0356) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com a coluna de purificação de RNA. O RNA tratado com RppH foi circularizado usando um DNA *splint* complementar a sequências de circularização e T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs, M0239). O RNA circular foi purificado por Ureia-PAGE, eluído em um tampão contendo (Acetato de Sódio a 0,5 M, SDS a 0,1%, EDTA a 1 mM, precipitado com etanol e ressuspenso em água isenta de RNase. A qualidade do RNA é avaliada por Ureia-PAGE ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0499] A ligação do RNA circular à biotina TO-1 foi avaliada *in vitro* em células de fibroblastos BJ, usando microscopia fluorescente. Quando a biotina TO-1 foi ligada ao RNA, ela aumentou sua fluorescência em mais de 100 vezes. Aptâmeros lineares ou circulares (50nM) foram adicionados ao meio de culturas de fibroblastos BJ, bem como um controle sem RNA. Um reagente de transfecção, lipofectamina, foi adicionado para garantir a entrega de RNA. As culturas foram tratadas com biotina TO-1 e a fluorescência foi analisada após 3 e 6 horas. Como mostrado na **FIG. 12**, aumento da fluorescência/estabilidade foi detectado a partir do aptâmero circular, em 3 e 6 horas.

[0500] A entrega mais eficiente e fluorescência mais persistente foram observadas com aptâmeros circulares.

Exemplo 27: RNA circular que se liga à proteína

[0501] Este exemplo demonstra a ligação de RNA circular à proteína para o sequestro.

[0502] O receptor de antígeno humano (HuR) pode ser uma proteína patogênica, por exemplo, é conhecido por se ligar e estabilizar os transcritos de mRNA relacionados com o

câncer, tal como mRNA de proto-oncogenes, citocinas, fatores de crescimento e fatores de invasão. HuR tem uma atividade tumorigênica central, permitindo vários fenótipos de câncer. O sequestro de HuR com RNA circular pode atenuar o crescimento tumorigênico em vários tipos de câncer. Conforme mostrado no Exemplo a seguir, um RNA circular pode se ligar a HuR para sequestro.

[0503] O RNA circular foi desenhado para incluir os motivos de aptâmero de ligação de RNA HuR: 5'-UCAUAAUCAAUUUUAUUUUUCUUUUUAUUUUA UUCACAUAAUUUUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 21), 5'-AUUUUGUUUUUAA CAUUUC-3' (SEQ ID NO: 22), 5'-UCAUAAUCAAUUUUAUUUUUCUUUUUAUUUUAUUCACAUAAUUUUGUUUUUAUUUUUGUUUUUAACAUUUC-3' (SEQ ID NO: 23) para ligar HuR de forma competitiva e inibir suas funções de ligação/a jusante.

[0504] O RNA linear não modificado foi sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA compreendendo o motivo RNA HuR e a sequência de ligação à proteína.

[0505] O RNA transcrito foi purificado com um estojo de limpeza de RNA Monarch (New England Biolabs, T2050), tratado com RNA 5'-fosfo-hidrolase (RppH) (New England Biolabs, M0356) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com a coluna de purificação de RNA. O RNA tratado com RppH foi circularizado usando um DNA *splint* complementar a sequências de circularização e T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs, M0239). O RNA circular foi purificado por Ureia-PAGE, eluído em um tampão contendo (Acetato de Sódio a 0,5 M, SDS a 0,1%, EDTA a 1 mM, precipitado com etanol e ressuspenso em água isenta de RNase. A qualidade do RNA foi

avaliada por Ureia-PAGE ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0506] A ligação do RNA circular a HuR foi avaliada in vitro por imunoprecipitação de RNA (RIP) para HuR. Os RNAs circulares contendo o motivo de ligação a RNA HuR se ligaram à proteína HuR, enquanto os RNAs circulares sem o motivo de ligação a RNA HuR não exibiram nenhuma ligação acima da base (**FIG. 13**).

[0507] Este resultado demonstrou ligação seletiva de um circRNA a biomolécula de interesse terapêutico.

Exemplo 28: RNA circular com uma molécula pequena ligada a uma proteína

[0508] Este exemplo demonstra RNA circular ligado a uma molécula pequena para ligar e recrutar uma proteína de escolha.

[0509] A talidomida, um fármaco clinicamente aprovado (*Thalomid*), é conhecida por associar um membro da maquinaria de degradação das proteínas das células, a ubiquitina-ligase E3. Ao conjugar a talidomida com o RNA circular (por exemplo, por meio da *química do clique*), o RNA circular conjugado com a talidomida pode recrutar a maquinaria de degradação das células para uma segunda proteína causadora de doenças (por exemplo, *também direcionada pelo RNA circular*). Conforme mostrado no Exemplo a seguir, uma molécula pequena foi conjugada a um RNA circular para se ligar à ubiquitina ligase E3 Cereblon.

[0510] O RNA circular foi desenhado para incluir resíduos de uridina reativos (por exemplo, 5-azido-C3-UTP) para a conjugação de moléculas pequenas funcionalizadas com alcino,

conhecidas por interagirem com uma proteína intracelular de interesse.

[0511] O RNA linear foi sintetizado pela transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase (Lucigen). Todo o UTP foi substituído por 5-azido-C3-UTP (Jena Biosciences) na reação de transcrição *in vitro* para gerar RNA funcionalizado com azida. O RNA linear sintetizado foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolabs) e submetido a tratamento com RNA 5' Pirofosfo-hidrolase (RppH, New England Biolabs) para remover o pirofosfato. O RNA linear tratado com RppH foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolabs).

[0512] O RNA circular foi gerado por ligação *splint*. O RNA linear tratado com RppH (100uM) e DNA *splint* (200uM) foram emparelhados por aquecimento a 75 °C por 5 min e resfriamento gradual à temperatura ambiente por 20 min. A reação de ligação foi realizada com T4 RNA ligase 2 (0,2 U/ul, New England Biolabs) por 4 horas a 37 °C. A mistura ligada foi purificada por precipitação com etanol. Para isolar o RNA circular, a mistura ligada foi separada em UREA-PAGE desnaturante a 4%. O RNA no gel foi corado com SYBR-green (Thermo Fisher) e visualizado com transiluminador (Transiluminadores). Bandas de RNA correspondentes para RNA circular foram excisadas e esmagadas por tubos de quebra de gel (Ist Engineering). Para eluição de RNA circular, géis esmagados com RNA circular foram incubados com tampão de eluição (acetato de sódio 0,5 M, EDTA 1 mM, SDS a 0,1%) a 37 °C por uma hora e o sobrenadante foi cuidadosamente colhido. A eluição do gel triturado restante foi submetida a outra ronda de eluição e repetida três vezes no total. O tampão de

eluição com RNA circular foi filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,45 µm para remover os resíduos do gel e o RNA circular foi purificado/concentrado por precipitação com etanol.

[0513] Talidomida alcino-funcionalizada (Jena Bioscience) foi conjugada com RNA circular funcionalizado com azida através de reações de química de clique de Aquino-Azida catalizadas por Cobre (CuAAC) com o kit de reação de química de clique com base nas instruções do fabricante (Jena Bioscience). O RNA circular conjugado com talidomida foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolab).

[0514] As propriedades de ligação do RNA circular conjugado com talidomida foram analisadas utilizando suspensão GST seguido de qPCR para a detecção de RNA. Para o ensaio de suspensão GST, RNA circular conjugado com talidomida (2nM) foi incubado com GST-E3 ubiquitina ligase Cereblon (50nM), que interage com a talidomida, por 2 horas à temperatura ambiente na presença de Tris-Cl 25mM (pH 7,0), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, NP-40 a 0,5%, glicerol a 5%. RNA circular funcionalizado com azida sem conjugação com talidomida foi utilizado como controle negativo.

[0515] A mistura de RNA-proteína foi ainda incubada durante uma hora à temperatura ambiente com grânulos de GSH-agarose para avaliar as interações de GST-GSH. Depois de lavar três vezes com tampão de ligação, o RNA especificamente ligado aos grânulos de GSH foi extraído com Trizol (Thermo Fisher). O RNA circular extraído foi transcrito reversamente e detectado por RT-PCR quantitativo com iniciadores específicos para RNA circular (direto: TACGCCTGCAACTGTGTTGT

(SEQ ID NO: 24), reverso: TCGATGATCTTGTCGTCGTC (SEQ ID NO: 25)).

[0516] IG. 14 demonstra que o RNA circular conjugado à molécula pequena da talidomida foi altamente enriquecido no ensaio de suspensão GST, demonstrando que o RNA circular com uma molécula pequena, e ligado a proteínas específicas através da molécula pequena.

Exemplo 29: RNA circular ligado a uma molécula pequena

[0517] Este exemplo demonstra RNA circular ligado a uma molécula pequena especificamente ligada uma proteína secundária.

[0518] Tal como mostrado no Exemplo seguinte, uma molécula pequena foi clicada para um RNA circular para criar uma estrutura de suporte para proteínas secundárias de ligação específicas, por exemplo, E3 ubiquitina ligase e um alvo.

[0519] O RNA circular foi desenhado para incluir resíduos reativos de uridina (por exemplo, 5-azido-C3-UTP ou 5-etil-UTP) para a conjugação de moléculas pequenas funcionalizadas com alcino ou funcionalizadas com azida, para qualquer funcionalidade a jusante.

[0520] O RNA linear foi sintetizado pela transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase (Lucigen). Todo o UTP foi substituído com 5-azido-C3-UTP ou 5-etil UTP (Jena Biosciences) na reação de transcrição *in vitro* para gerar RNA funcionalizado com azida ou funcionalizado com alcino, respectivamente. O RNA linear sintetizado foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolabs) e submetido a tratamento com RNA 5' Pirofosfo-hidrolase (RppH, New England Biolabs) para remover o pirofosfato. O RNA linear

tratado com RppH foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolabs).

[0521] O RNA circular foi gerado por ligação *splint*. O RNA linear tratado com RppH (100uM) e DNA *splint* (200uM) foram emparelhados por aquecimento a 75 °C por 5 min e resfriamento gradual à temperatura ambiente por 20 min. A reação de ligação foi realizada com T4 RNA ligase 2 (0,2 U/ul, New England Biolabs) por 4 horas a 37 °C. A mistura ligada foi purificada por precipitação com etanol.

[0522] Para isolar o RNA circular, a mistura ligada foi separada em UREA-PAGE desnaturante a 6%. O RNA no gel foi corado com SYBR-green (Thermo Fisher) e visualizado com um transiluminador (Transiluminadores). Bandas de RNA correspondentes para RNA circular foram excisadas e esmagadas por tubos de quebra de gel (Ist Engineering). Para eluição de RNA circular, géis esmagados com RNA circular foram incubados com tampão de eluição (acetato de sódio 0,5 M, EDTA 1 mM, SDS a 0,1%) a 37 °C por uma hora e o sobrenadante foi cuidadosamente colhido. A eluição do gel triturado restante foi submetida a outra ronda de eluição e repetida três vezes no total. O tampão de eluição com RNA circular foi filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,45 µm para remover os resíduos do gel e o RNA circular foi purificado/concentrado por precipitação com etanol.

[0523] Corante Alexa Fluor 488 funcionalizado com alcino ou corante Alexa Fluor 488 funcionalizado com azida (Jena Bioscience) foi conjugada com RNA circular funcionalizado com azida através de reações de química de clique de Aquino-Azida catalizadas por Cobre (CuAAC) com o kit de reação de

química de clique com base nas instruções do fabricante (Jena Bioscience). O RNA circular conjugado com corante Alexa Fluor 488 foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolab).

[0524] A conjugação do corante foi monitorizada através da separação de RNA circular em 6% UREA-PAGE desnaturante. O RNA circular não conjugado e conjugado com corante Alexa Fluore foram separados no gel em paralelo para comparação. A fluorescência do RNA no gel foi monitorada pelo iBright Imaging System (Invitrogen). Após monitorar a fluorescência, o gel foi corado com SYBR seguro e o RNA no gel foi visualizado pelo iBright Imaging System (Invitrogen).

[0525] O RNA circular contendo uma molécula pequena com Alexa Fluor 488 foi mostrado demonstrar que fluoresce em que RNA circular pode conter uma molécula pequena funcional.

[0526] Conforme ilustrado na **FIG. 15**, o RNA circular conjugado com a molécula pequena talidomida produziu um produto de PCR discreto como detectado por fluorescência, o que demonstra que o RNA circular conjugado com uma molécula pequena especificamente interage com uma proteína secundária.

Exemplo 30: RNA circular que se liga a duas pequenas moléculas diferentes

[0527] Este exemplo descreve duas proteínas diferentes de escolha que são recrutadas por um RNA circular que está ligado a moléculas pequenas.

[0528] A talidomida, um fármaco clinicamente aprovado (*Thalomid*), é conhecida por associar com um membro da maquinaria de degradação das proteínas das células, a ubiquitina-ligase E3 cereblon. Ao conjugar a talidomida com

o RNA circular (por exemplo, por meio da *química do clique*), o RNA circular conjugado com a talidomida pode recrutar a maquinaria de degradação das células para uma segunda proteína causadora de doenças (por exemplo, *também direcionada pelo RNA circular*). Como mostrado no exemplo a seguir, duas pequenas moléculas (talidomida e JQ1) são conjugadas a um RNA circular para ligar (1) E3 ubiquitina ligase Cereblon para ubiquitinação e degradação subsequente de uma proteína vizinha e (2) proteínas da família BET através de JQ1, que é um inibidor de molécula pequena que se liga às proteínas da família BET.

[0529] O RNA circular é desenhado para incluir resíduos de uridina reativos (por exemplo, 5-azido-C3-UTP) para a conjugação de moléculas pequenas funcionalizadas com alcino, conhecidas por interagirem com uma proteína intracelular de interesse.

[0530] O RNA linear é sintetizado pela transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase (Lucigen). Todo o UTP é substituído por 5-azido-C3-UTP (Jena Biosciences) na reação de transcrição *in vitro* para gerar RNA funcionalizado com azida. O RNA linear sintetizado é purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolabs) e é submetido a tratamento com RNA 5' Pirofosfo-hidrolase (RppH, New England Biolabs) para remover o pirofosfato. O RNA linear tratado com RppH é purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolabs).

[0531] O RNA circular é gerado por ligação *splint*. RNA linear tratado com RppH (100 uM) e DNA *splint* (200um) é emparelhado por aquecimento a 75 °C durante 5 min e é gradualmente arrefecido à temperatura ambiente, durante 20

min. A reação de ligação é realizada com T4 RNA ligase 2 (0,2 U/uL, New England Biolabs) durante 4 horas a 37 °C. A mistura ligada é purificada por precipitação com etanol. Para isolar o RNA circular, a mistura ligada é separada em UREA-PAGE desnaturante a 4%. O RNA no gel é corado com SYBR-green (Thermo Fisher) e visualizado com transiluminador (Transiluminadores). Bandas de RNA correspondentes para RNA circular são excisadas e esmagadas por tubos de quebra de gel (Ist Engineering). Para eluição de RNA circular, géis esmagados com RNA circular são incubados com tampão de eluição (acetato de sódio 0,5 M, EDTA 1 mM, SDS a 0,1%) a 37 °C por uma hora e o sobrenadante é cuidadosamente colhido. A eluição do gel triturado restante é submetida a outra ronda de eluição e é repetida três vezes no total. O tampão de eluição com RNA circular é filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,45 µm para remover os resíduos do gel e o RNA circular é purificado/concentrado por precipitação com etanol.

[0532] Talidomida alcino-funcionalizada e JQ1 funcionalizado com alcino (Jena Bioscience) é conjugada com RNA circular funcionalizado com azida através de reações de química de clique de Aquino-Azida catalizadas por Cobre (CuAAC) com o kit de reação de química de clique com base nas instruções do fabricante (Jena Bioscience). Para comparação, são gerados três tipos diferentes de RNA circular conjugado com molécula pequena: RNA com JQ1 e talidomida, apenas talidomida e apenas JQ1. O RNA circular conjugado com moléculas pequenas é purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolab).

[0533] A ligação de RNA circular conjugado com molécula pequena a E3 ubiquitina-ligase CRBN e proteínas da família BET é analisada utilizando suspensão GST. GST-CRBN (Abcam) e uma proteína da família BET, Bromodomínio contendo proteína 4 (BRD4, BPSBiosciences) são usados para esta experiência. Para o ensaio de suspensão GST, o RNA circular conjugado com JQ1 e talidomida (2nM) é incubado com GST-CRBN e BRD4 (50nM cada) por 2 horas à temperatura ambiente na presença de Tris-Cl 25 mM (pH7,0), 100 mM NaCl, EDTA 1 mM, NP-40 a 0,5%, Glicerol a 5%. RNA circular funcionalizado com azida sem conjugação, RNA conjugado com talidomida e RNA conjugado com JQ1 são utilizados como controles negativos. A mistura de RNA-proteína é ainda incubada com grânulo de GSH-agarose para permitir a interação GST-GSH por uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem três vezes com tampão de ligação, o grânulo é separado em duas partes iguais. Para monitorar a ligação à proteína, uma parte do grânulo é fervida na presença de Amostra de Tampão Lamli (Bio-Rad) e é submetida a Western blot com anticorpo BRD4 (para detectar proteína BRD4) e anticorpo GST (para detectar GST-CRBN). Para monitorar o recrutamento de RNA, o RNA no grânulo é extraído com Trizol (Thermo Fisher) e o RNA circular extraído é transcrito reversamente e é detectado por RT-PCR quantitativo com iniciadores específicos para a forma circular de RNA (direto: TACGCCTGCAACTGTGTTGT (SEQ ID NO: 24), reverso: TCGATGATCTTGTCGTCGTC (SEQ ID NO: 25)).

[0534] Espera-se que o RNA circular contendo as moléculas pequenas de JQ1 e a talidomida seja altamente enriquecido na suspensão GST tanto para CRBN quanto para a proteína BRD4 do domínio BET, demonstrando que não apenas o RNA circular pode

conter uma molécula pequena, mas pode ligar-se a duas proteínas específicas usando este conjugado de molécula pequena para degradar a proteína de escolha.

Exemplo 31: RNA circular que se liga à carboidratos

[0535] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a carboidratos.

[0536] Sialil Lewis X é um glicoconjugado tetrassacarídeo de proteínas de membrana. Ele atua como um ligante para proteínas selectinas durante a adesão celular. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga a Sialil Lewis X para inibir a adesão celular.

[0537] Um RNA circular manipulado é desenhado para incluir uma sequência de ligação de Sialil Lewis X (por exemplo, 5'-CCGUAAUACGACUCACUAUAGGGGAGCUCGGUACCGAAUUCAAGGUACUCUGUGCUUGUCGAUGUGUAUUGAUGGCACUUUCGAGUCAACGAGUUGACAGAACAAGUAGUCAAGCUUUGCAGAGAGGAUCCUU-3' (SEQ ID NO: 26)).

[0538] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um segmento de DNA que compreende uma sequência de ligação a Sialil Lewis X. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA. O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0539] Um método para avaliar a ligação de RNA circular a Sialil Lewis X é medir a adesão celular mediada por Sialil Lewis X. A E-selectina reconhece Sialil Lewis X e a superfície da linha celular de leucemia promielocítica HL60 é rica em Sialil Lewis X, especialmente após tratamento com TNF- α . E-selectina solúvel recombinante (Calbiochem) é adicionada à placa de microtitulação (250 ng/poço) em NaHCO₃ 0,05 M a pH 9,2 (10 μ g/mL) e é incubada durante a noite a 4 °C. O RNA circular (10 μ g/mL) com ou sem o sítio de ligação Sialil Lewis X é então incubado. As células de leucemia promielocítica humana HL60 ativadas por TNF- α (10 ng/mL por 20 h) são incubadas por 30 min em temperatura ambiente na placa, são lavadas e o número de células aderidas é medido.

Exemplo 32: RNA circular que se liga ao vírus

[0540] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a vírus.

[0541] O vírus influenza tem duas componentes de glicoproteína de membrana, incluindo hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Cerca de 900 e 300 cópias de HA e NA, respectivamente, são expressas na superfície de cada partícula viral. Conforme mostrado no Exemplo a seguir, um RNA circular manipulado é desenhado para se ligar a hemaglutinina para ligação viral.

[0542] O RNA circular é desenhado para incluir um sítio de ligação de hemaglutinina (por exemplo, 5'-GGGAGAAUCCGACCAGAAGGGUUAGCAGUCGGCAUGCGGUACAGACAGACCUUCCUCUCUCCUCCUCUUCU-3' (SEQ ID NO: 27)) para se ligar à superfície do vírus.

[0543] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um

segmento de DNA que compreende uma sequência de ligação a hemaglutinina. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA. O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0544] Um método para avaliar se a ligação de RNA circular a hemaglutinina tem efeitos inibidores de aptâmeros de RNA na fusão da membrana induzida por HA. Quando a hemaglutinina é ligada ao RNA circular, a fusão da membrana ocorre com menos frequência do que a do RNA circular não ligado.

[0545] A fusão da membrana induzida por HA é examinada usando vírus marcado por fluorescência e membranas fantasmas de glóbulos vermelhos (RBC) humanos. A membrana viral de A/Panama/2007/1999 (H3N2) é marcada com uma sonda lipídica fluorescente, octadecil rodamina B (R18; Molecular Probes).

[0546] Para o ensaio de inibição de fusão, o vírus H3N2 (0,05-0,1 mg de proteína total/mL) misturado com um RNA circular (0,5 ou 5 mM) é adicionado a membranas fantasmas em lamínulas montadas em uma câmara de metal. Após a fusão viral com membranas fantasmas, a mistura de lipídeos entre as membranas viral e fantasma induz a diminuição da fluorescência de R18.

Exemplo 33: RNA circular que se liga a células

[0547] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a tipos de células alvo.

[0548] Em este exemplo, o RNA circular manipulado é desenhado através de um dos métodos descritos previamente. O RNA circular e o RNA linear são desenhados para incluir um aptâmero mango, uma haste de estabilização e uma região não codificadora: um aptâmero de transferrina (por exemplo, GGGGGAUCAAUCCAAGGGACCCGGAACGCUCCCUUACACCCC (SEQ ID NO: 28)). Esta região de aptâmero se liga ao receptor da transferrina, permitindo que o RNA se ligue às células que expressam o receptor. O receptor da transferrina é expresso em uma variedade de tipos de células, incluindo glóbulos vermelhos e algumas células cancerosas. Como um controle negativo, o RNA é desenhado para não incluir a região de aptâmero.

[0549] As células HeLa são células de câncer do colo do útero, que são conhecidas por expressarem o receptor de transferrina. As células HeLa são cultivadas sob condições padrão (em DMEM, com FBS a 10% a 37 °C sob 5% de CO₂). As células são passadas regularmente para se manter crescimento exponencial. A ligação do RNA circular à biotina TO-1 é avaliada in vitro em células HeLa, usando microscopia fluorescente. Quando a biotina TO-1 é ligada ao RNA, ela aumentou sua fluorescência em mais de 100 vezes. O RNA circular com ou sem aptâmeros (50 nM) é adicionado ao meio de culturas HeLa, bem como um controle sem RNA. Um reagente de transfecção à base de lipídeos (Thermo Fisher Scientific) é adicionado para garantir a entrega de RNA. As culturas

são tratadas com biotina TO-1 e a fluorescência é analisada após 3 e 6 horas.

Exemplo 34: RNA circular que se liga ao aptâmero

[0550] Este exemplo descreve a ligação de RNA circular a aptâmero.

[0551] Um RNA circular manipulado é desenhado para incluir uma ou mais novas sequências de ligação para aptâmeros de RNA. Os aptâmeros de RNA são direcionados para a ligação circular de RNA por meio da complementaridade. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga de forma complementar ao aptâmero de ligação de LIN28A para sequestro.

[0552] O RNA circular é desenhado para incluir a sequência complementar à sequência de aptâmero de ligação de LIN28A, 5'-GGGGUAGUGAUUUUACCCUGGAGAU-3' (SEQ ID NO: 12).

[0553] O RNA linear não modificado é sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA tendo a sequência complementar de aptâmero de ligação a LIN28A. O RNA transcrito é purificado com um sistema de purificação de RNA (QIAGEN), tratado com fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EF0652) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com o sistema de purificação de RNA.

[0554] O RNA circular com ligação de *splint* é gerado por tratamento do RNA linear transcrito e de um *splint* de DNA usando T4 DNA ligase (New England Bio, Inc., M0202M), ou T4 RNA ligase 2 (New England Bio, Inc., M0239S) e o RNA circular é isolado após enriquecimento com tratamento com RNase R. A qualidade do RNA é avaliada por gel de agarose ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0555] A ligação do RNA circular ao aptâmero de ligação LIN28A é avaliada por um ensaio de qPCR suspenso de oligonucleotídeo, no qual oligonucleotídeos modificados complementares ao RNA circular são usados para suspender o aptâmero de ligação LIN28A, que é transcrito reversamente e amplificado por qPCR.

Exemplo 35: RNA circular ligado a um fator de transcrição

[0556] Este exemplo demonstra a ligação de RNA circular à proteína para o sequestro. NF- κ B é uma família de fatores de transcrição que ativam a transcrição e induzem as vias de sobrevivência. Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga a NF- κ B para sequestro.

[0557] O RNA circular foi desenhado para incluir os motivos de aptâmero de ligação de RNA NF- κ B: 5'-aaaaaaaaGATCTTGAAACTGTTTTAAGGTTGGCCGATCTTaaaaa-3' (SEQ ID NO: 29) para ligar NF- κ B de forma competitiva e inibir suas funções de ligação/a jusante. Extensões de poli(A) foram adicionados ao motivo de ligação interna para (1) tornar o oligo de RNA passível de ligação e para manter a estrutura secundária do aptâmero. O dobramento correto foi verificado usando RNAfold WebServer. Como um controle, uma sequência de RNA embaralhado foi usada (aaaaaaaaTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAAAAaa (SEQ ID NO: 30). Esta sequência de RNA embaralhado dobra-se em uma estrutura 3D semelhante ao aptâmero, mas não se direciona a quaisquer proteínas, tal como descrito em Mi et al., Mol Ther. 2008 Jan; 16(1):66-73.

[0558] O RNA com o motivo de ligação de aptâmero a NF- κ B foi sintetizado por um vendedor comercial (IDT) com um grupo 5' monofosfato e um grupo 3' hidroxila. A RNA ligase 1 (New

England Biolabs, M0204S) foi usada para ligar o oligo de RNA. A RNase R foi usada para remover o RNA linear residual das amostras, de acordo com as instruções do fabricante (Lucigen, RNR07250). Além disso, o mRNA circular foi purificado pela extração do RNA circular de um gel Ureia PAGE a 15%. O RNA circular foi eluído do gel em um tampão contendo: Acetato de Sódio 0,5 M, SDS 0,1%, EDTA 1 mM. Resíduos de gel ou sais da extração de gel foram removidos fazendo a eluição correr através de uma coluna de rotação (New England Biolabs, T2030S). O RNA foi eluído em tampão de armazenamento de RNA (citrato de sódio 1 mM, Thermo Fisher, AM7000) e a integridade do RNA foi avaliada por Ureia-PAGE ou por eletroforese capilar em gel automatizado (Agilent).

[0559] O ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) foi realizado para avaliar a afinidade de ligação de RNA circular para NF- κ B. Um pmole de RNA linear ou circular foi incubado com a subunidade p50 NF- κ B recombinante (Caymen Chemical, 10009818) em concentrações variáveis sobre a concentração de RNA (ou seja, 0, 0,1, 1, 10 pmoles de proteína) por 20 minutos à temperatura ambiente em uma reação tamponada (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂). As amostras foram executadas em um gel TBE Ureia a 6% por 25 minutos a 200V. Os géis foram corados com SybrGold (Thermo Scientific, S11494) e fotografados com um sistema de imagem azul E-gel (Thermo Scientific, 4466612).

[0560] Conforme demonstrado em **FIG. 17**, o RNA com sequências de aptâmero de ligação embaralhadas não mostrou afinidade de ligação à subunidade p50 de NF- κ B. Ambas as versões linear e circular da sequência de ligação de aptâmero a NF- κ B ligam-se à subunidade p50 com afinidades semelhantes.

[0561] A ligação do RNA circular a NF- κ B foi avaliada *in vitro* por EMSA para NF- κ B. NF- κ B seletivamente ligou-se a RNAs circulares contendo o motivo de ligação de aptâmero a NF- κ B. Esse resultado demonstrou que biomoléculas de interesse foram seletivamente ligadas por sequências em RNA circular.

Exemplo 36: RNA circular sequestra proteína alvo e inibe função

[0562] Este exemplo demonstra que RNA circular se liga a proteína nas células e este sequestro conduz à inibição da função. Conforme mostrado no Exemplo a seguir, o RNA circular se liga a NF- κ B para sequestro levando à inibição da sobrevivência ativada por NF- κ B nas células.

[0563] RNAs embaralhado linear, circular e linear foram desenhados e sintetizados como anteriormente descrito.

[0564] A função de NF- κ B na linha de células de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), A549s, após a entrega de um RNA circular com uma sequência de ligação de aptâmero a NF- κ B foi determinada medindo a viabilidade celular por ensaio MTT (Thermo Scientific, V13154). Resumindo, as células A549 foram transfectadas com 1 pmole de RNA linear, linear embaralhado ou circular após complexação com reagente de transfecção de lipídeos (Thermo Scientific, LMRNA003). A viabilidade foi medida pelo ensaio de MTT realizada de acordo com as instruções do fabricante.

[0565] Conforme demonstrado na **FIG. 18**, as células tratadas com RNA linear não demonstraram mudança na viabilidade no dia 1 e uma ligeira diminuição na viabilidade no dia 2 (101% de viabilidade no dia 1 e 97% no dia 2). Em contraste, as células tratadas com o RNA circular demonstraram uma

diminuição mensurável na viabilidade no dia 1 e maior aumento no dia 2 (89% no dia 1 e 86% no dia 2).

[0566] Em geral, os resultados demonstraram que o RNA circular liga-se a NF- κ B em células e inibe a ativação de NF- κ B de vias de sobrevivência.

Exemplo 37: RNA circular liga-se e sequestra proteína para afetar a sensibilização quimioterapêutica

[0567] Este exemplo demonstra que RNA circular se liga a uma proteína alvo em células que leva à inibição das vias de sinalização da proteína alvo. Conforme mostrado no Exemplo a seguir, o RNA circular sequestrou NF- κ B em células quimiorresistentes e inibiu a sinalização de NF- κ B, ressensibilizando assim as células ao quimioterapêutico.

[0568] O RNA linear, linear embaralhado e circular foi desenhado e sintetizado conforme descrito anteriormente.

[0569] O efeito do sequestro de NF- κ B em linha celular de câncer do pulmão de células não pequenas resistente à quimioterapia (NSCLC), A549s, foi determinado após a entrega de um RNA circular direcionado para NF- κ B e a exposição ao agente quimioterapêutico. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT (Thermo Scientific, V13154). Em suma, as células A549 foram transfectadas com 1 pmole de um RNA de controle linear embaralhado, linear ou circular após complexação com reagente de transfecção de lipídeos (Thermo Scientific, LMRNA003). 24 horas após a transfecção, as células foram tratadas com doxorubicina 5 μ M por mais 18 horas. A viabilidade foi medida pelo ensaio de MTT realizada de acordo com as instruções do fabricante. O tratamento com doxorubicina foi repetido 48 e 72 horas após a transfecção.

[0570] Conforme demonstrado na **FIG. 19**, o tratamento com doxorubicina com RNA linear embaralhado (controle) não afetou a viabilidade celular na linha de células de câncer de pulmão A549 resistente a dox no dia 1. O co-tratamento de doxorubicina com RNA linear diminuiu a viabilidade celular no dia 2 (sobrevivência de 78%). Em contraste, o co-tratamento com o aptâmero circular resultou em mais morte celular em ambos os dias 1 e 2 (79% de sobrevivência no dia 1 e 73% de sobrevivência no dia 2).

[0571] Em geral, os resultados demonstraram que o RNA circular se liga a NF- κ B em células e inibe a sinalização de sobrevivência de NF- κ B, assim, aumenta a sensibilidade das células ao quimioterapêutico, doxorubicina.

Exemplo 38: RNA circular marcou a proteína alvo para degradação

[0572] Este exemplo demonstra que RNA circular ligado a moléculas pequenas recruta duas proteínas diferentes de escolha e, assim, com a marcação da proteína alvo para degradação.

[0573] A talidomida, um fármaco clinicamente aprovado (*Revlimid*), é conhecida por associar com um membro da maquinaria de degradação das proteínas das células, a ubiquitina-ligase E3. Ao conjugar a talidomida com o RNA circular (por exemplo, por meio da *química do clique*), o RNA circular conjugado com a talidomida pode recrutar a maquinaria de degradação das células para uma segunda proteína causadora de doenças (por exemplo, *também direcionada pelo RNA circular*). **FIG. 20** é um esquema que mostra um RNA circular exemplificativo que é entregue nas células e marca uma proteína BRD4 alvo nas células para

degradação pelo sistema de ubiquitina. Como mostrado no exemplo a seguir, duas pequenas moléculas (talidomida e JQ1) foram conjugadas a um RNA circular para ligar (1) E3 ubiquitina ligase Cereblon para ubiquitinação e degradação subsequente de uma proteína vizinha e (2) proteínas da família BET através de JQ1, que é um inibidor de molécula pequena que se liga às proteínas da família BET.

[0574] O RNA circular foi desenhado para incluir múltiplos (49 resíduos) resíduos de uridina reativos (por exemplo, 5-azido-C3-UTP) para a conjugação de moléculas pequenas funcionalizadas com alcino, conhecidas por interagirem com uma proteína intracelular de interesse.

[0575] O RNA linear foi sintetizado pela transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase (Lucigen). Todo o UTP foi substituído por 5-azido-C3-UTP (Jena Biosciences) na reação de transcrição *in vitro* para gerar RNA funcionalizado com azida. O RNA linear sintetizado foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolabs) e submetido a tratamento com RNA 5' Pirofosfo-hidrolase (RppH, New England Biolabs) para remover o pirofosfato. O RNA linear tratado com RppH foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolabs).

[0576] O RNA circular foi gerado por ligação *splint*. O RNA linear tratado com RppH (100uM) e DNA *splint* (200uM) foram emparelhados por aquecimento a 75 °C por 5 min e resfriamento gradual à temperatura ambiente por 20 min. A reação de ligação foi realizada com T4 RNA ligase 2 (0,2 U/ul, New England Biolabs) por 4 horas a 37 °C. A mistura ligada foi purificada por precipitação com etanol. Para isolar o RNA circular, a mistura ligada foi separada em UREA-PAGE

desnaturante a 4%. O RNA no gel foi corado com SYBR-green (Thermo Fisher) e visualizado com transiluminador (Transiluminadores). Bandas de RNA correspondentes para RNA circular foram excisadas e esmagadas por tubos de quebra de gel (Ist Engineering). Para eluição de RNA circular, géis esmagados com RNA circular foram incubados com tampão de eluição (acetato de sódio 0,5 M, EDTA 1 mM, SDS a 0,1%) a 37 °C por uma hora e o sobrenadante foi cuidadosamente colhido. O gel triturado restante foi submetido a outra ronda de eluição e repetida três vezes no total. O tampão de eluição com RNA circular foi filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,45 µm para remover os resíduos do gel e o RNA circular foi purificado/concentrado por precipitação com etanol.

[0577] Talidomida alcino-funcionalizada e/ou JQ1 (tienotriazolodiazepina, Jena Bioscience) foi conjugada com RNA circular funcionalizado com azida através de reações de química de clique de Aquino-Azida catalizadas por Cobre (CuAAC) com o kit de reação de química de clique com base nas instruções do fabricante (Jena Bioscience). Para efeito de comparação, três tipos diferentes de pequenas moléculas foram conjugados a RNA circular; RNA com JQ1 e talidomida, apenas talidomida ou apenas JQ1. O RNA circular conjugado com moléculas pequenas foi purificado com um kit de limpeza de RNA (New England Biolab).

[0578] Estes diferentes RNAs foram então transfectados para células HEK293T para monitorizar a degradação da proteína alvo utilizando o reagente de transfecção por lipídeos (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. 1 pmole de cada RNA foi usado para transfectar células HEK293T

e as células foram colocadas em placas de 12 poços (2 nM final). No caso de RNA circular conjugado com JQ1 e talidomida, 3 pmole de RNA foi transfectado em células HEK293T para testar o efeito de diferentes concentrações de RNA circular na degradação de BRD4 (6 nM final). Como controle positivo, foi usado PROTAC dBET1 (Tocris Biosciences) que possui JQ1 e talidomida, e é conhecido por degradar a proteína BRD4 em células através do recrutamento de CRBN (concentração de 2 uM, 10 uM). Para um controle negativo, apenas transportador e RNA circular sem conjugação foram usados. Após 24 horas de transfecção, as células foram colhidas adicionando tampão RIPA diretamente na placa.

[0579] A ligação do RNA circular conjugado com molécula pequena a E3 ubiquitina ligase CRBN e a capacidade de degradação das proteínas da família BET foi analisada usando Western blot. Resumidamente, 12 ug de proteína foram resolvidos em gel Bis-Tris de gradiente de 4% -12% (Thermo Fisher Scientific) e transferidos para membrana de nitrocelulose usando um sistema de transferência de manchas (Thermo Fisher Scientific). O anticorpo anti-BRD4 de coelho (Abcam) foi usado para detectar a proteína BRD4 e o anticorpo anti-tubulina alfa (Abcam) foi usado para detectar a tubulina alfa como um controle de carregamento. O sinal de quimiluminoscência das bandas de proteína de BRD4 e alfa tubulina foi monitorado por um sistema de imagem Fc (LI-COR).

[0580] Os níveis de proteína BRD4, bem como alfa tubulina como um controle de carregamento, também foram medidos usando densitometria usando ImageJ.

[0581] Conforme mostrado na **FIG. 21**, o RNA circular contendo a talidomida e as moléculas pequenas de JQ1 foi capaz de degradar BRD4, conforme demonstrado pelos níveis normalizados de BRD4. Este resultado demonstrou que o RNA circular com uma molécula pequena se ligou a duas proteínas específicas usando o conjugado de molécula pequena para degradar a proteína alvo.

Exemplo 39: O RNA circular ligou-se a uma molécula pequena mais longa do que sua contraparte linear

[0582] Este exemplo demonstra a ligação de RNA circular a uma molécula pequena para sequestro/bioatividade. Conforme mostrado no Exemplo a seguir, o RNA circular é mais estável do que sua contraparte linear.

[0583] Aptâmeros de RNA linear mango fluorescem quando ligados por uma molécula pequena, corante biotina TO-1. Como mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular Mango se liga ao derivado de laranja tiazol, biotina TO-1 para sequestro/bioatividade.

[0584] RNA circular foi concebido para incluir sítios de ligação à molécula pequena de RNA mango e uma haste de estabilização: 5'- AATAGCCG GUCUACGGCC AUACCACCCU GAACGCGCCC GAUCUCGUCU GAUCUCGGAAGCUAAGCAGG GUCGGGCCUG GUUAGUACUU GGAUGGGAGA CCGCCUGGGAAUACCGGGUG CUGUAGGCGU CGACUUGCCA UGUGUAUGUG GGUACGAAGGAAGGAUUGGU AUGUGGUAUA UUCGUACCCA CAUACUCUGA UGAUCCUUCG GGAUCAUUCA UGGCAA CGGCTATT-3' (SEQ ID NO: 18), bem como sequências de circularização: 5'-AATAGCCG-3' (SEQ ID NO: 19) e 5'-CGGCTATT-3' (SEQ ID NO: 20).

[0585] O RNA linear não modificado foi sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um segmento de DNA compreendendo o motivo de RNA Mango, hastes

e sequências de circularização. O RNA transcrito foi purificado com um estojo de limpeza de RNA (New England Biolabs, T2050), tratado com RNA 5'-fosfo-hidrolase (RppH) (New England Biolabs, M0356) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com a coluna de purificação de RNA. O RNA tratado com RppH foi circularizado usando um DNA *splint* complementar a sequências de circularização e T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs, M0239). O RNA circular foi purificado por Ureia-PAGE, eluído em um tampão contendo (Acetato de Sódio a 0,5 M, SDS a 0,1%, EDTA a 1 mM, precipitado com etanol e ressuspenso em água isenta de RNase. A qualidade do RNA foi avaliada por Ureia-PAGE ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0586] A ligação do RNA circular à biotina TO-1 foi avaliada *in vitro* em células HeLa, usando microscopia fluorescente. Quando a biotina TO-1 foi ligada ao RNA, ela aumentou sua fluorescência em mais de 100 vezes. Aptâmeros lineares ou circulares (50nM) foram adicionados ao meio de culturas de fibroblastos BJ, bem como um controle sem RNA. Um reagente de transfecção, lipofectamina, foi adicionado para garantir a entrega de RNA. As culturas foram tratadas com biotina TO-1 e a fluorescência foi analisada em 6 h e dias 1-12. Como mostrado na **FIG. 22**, aumento da fluorescência/estabilidade foi detectado a partir do aptâmero circular, com fluorescência detectada em pelo menos 10 dias em cultura.

Exemplo 40: RNA circular liga-se a proteína e RNA

[0587] Este exemplo demonstra a ligação de RNA circular à proteína e RNA para o sequestro.

[0588] O receptor de antígeno humano (HuR) pode ser uma proteína patogênica, por exemplo, é conhecido por se ligar

e estabilizar os transcritos de mRNA relacionados com o câncer, tal como mRNA de proto-oncogenes, citocinas, fatores de crescimento e fatores de invasão. HuR tem uma atividade tumorigênica central, permitindo vários fenótipos de câncer. O sequestro de HuR com RNA circular pode atenuar o crescimento tumorigênico em vários tipos de câncer.

[0589] O RNA desempenha um papel central no metabolismo celular e as moléculas de RNA passam por vários processos pós-transcricionais, como *splicing*, edição, modificação, tradução e degradação.

[0590] Conforme mostrado no exemplo a seguir, o RNA circular se liga a HuR e RNA para sequestro.

[0591] O RNA circular foi desenhado para incluir o motivo de ligação a RNA HuR: 5'-UCAUAAUCAA UUUUUUUUUUCUUUUUUUUUUUUUUUUCACAUAAUUUUUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 31) para ligar HuR de forma competitiva e inibir suas funções de ligação/a jusante e o motivo de ligação a RNA. 5'-CGA GAC GCT ACG GAC TTA AAA TCC GTT GAC-3' (SEQ ID NO: 32).

[0592] O RNA linear não modificado foi sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA compreendendo o motivo RNA HuR e a sequência de ligação à proteína.

[0593] O RNA circular foi desenhado para incluir o motivo de aptâmero de ligação de RNA HuR: 5'-UCAUAAUCAA UUUUUUUUUUCUUUUUUUUUUUUUUUUCACAUAAUUUUUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 31) para ligar HuR de forma competitiva e inibir suas funções de ligação/a jusante e o motivo de aptâmero de ligação a RNA: 5'-CGA GAC GCT ACG GAC TTA AAA TCC GTT GAC-3' (SEQ ID NO: 32).

[0594] O RNA linear não modificado foi sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA compreendendo o motivo RNA HuR e a sequência de ligação à proteína.

[0595] O RNA transcrito foi purificado com um estojo de limpeza de RNA (New England Biolabs, T2050), tratado com RNA 5'-fosfo-hidrolase (RppH) (New England Biolabs, M0356) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com a coluna de purificação de RNA. O RNA tratado com RppH foi circularizado usando um DNA *splint* complementar a sequências de circularização e T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs, M0239). O RNA circular foi purificado por Ureia-PAGE, eluído em um tampão contendo (Acetato de Sódio a 0,5 M, SDS a 0,1%, EDTA a 1 mM, precipitado com etanol e ressuspenso em água isenta de RNase. A qualidade do RNA foi avaliada por Ureia-PAGE ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0596] A ligação do RNA circular a HuR e RNA foi avaliada *in vitro* por uma combinação de imunoprecipitação HuR (IP) e ensaio de suspensão de RNA de biotina, seguido por qPCR. A proteína HuR acoplada à Proteína G-anticorpo anti HuR foi incubada com RNA circular, lavada e eluída a baixo pH. O material ligado foi incubado com RNA biotinilado, lavado e suspenso com dinagrânulos de estreptavidina.

[0597] RNA circulares ligados a HuR com o motivo de ligação de aptâmero a RNA Hur e a estreptavidina suspensa produziram RNAs com motivos de ligação de aptâmero a RNA como se mostra na **FIG. 23**. Assim, a ligação foi observada quando os dois, HuR e RNA, motivos de ligação estavam presentes. Este

resultado demonstrou que as biomoléculas de interesse foram seletivamente ligadas.

Exemplo 41: RNA circular liga-se a proteína e DNA

[0598] Este exemplo demonstra a ligação de RNA circular à proteína e DNA para o sequestro.

[0599] A ligação de DNA por proteínas e RNA desempenha um papel crucial em diversos processos celulares, ou seja, a transcrição.

[0600] O receptor de antígeno humano (HuR) desempenha um papel central em mRNA alvo e desempenha um papel fundamental na regulação pós-transcricional de mRNA alvo com funções celulares centrais, tornando-se uma proteína importante na patogênese. É conhecido por ligar e estabilizar os transcritos de mRNA relacionados ao câncer, portanto, HuR tem uma atividade tumorigênica central, permitindo vários fenótipos de câncer.

[0601] Direcionar e competir esses contatos com RNA circular pode ser usado para modular essas interações e controlar os resultados em processos de doença e não-doença.

[0602] O RNA circular foi desenhado para incluir o motivo de aptâmero de ligação a DNA: 5'-CGA GAC GCT ACG GAC TTA AAA TCC GTT GAC-3' (SEQ ID NO: 32) RNA.

[0603] O RNA linear não modificado foi sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase a partir de um segmento de DNA. O RNA transcrito foi purificado com um estojo de limpeza de RNA (New England Biolabs, T2050), tratado com RNA 5'-fosfo-hidrolase (RppH) (New England Biolabs, M0356) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com a coluna de purificação de RNA. O RNA tratado com RppH foi circularizado usando um DNA *splint*

complementar a sequências de circularização e T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs, M0239). O RNA circular foi purificado por Ureia-PAGE, eluído em um tampão contendo (Acetato de Sódio a 0,5 M, SDS a 0,1%, EDTA a 1 mM, precipitado com etanol e ressuspenso em água isenta de RNase. A qualidade do RNA foi avaliada por Ureia-PAGE.

[0604] A ligação do RNA circular a DNA e HuR foi avaliada in vitro por uma combinação de imunoprecipitação HuR (IP) e ensaio de suspensão de DNA biotilado, seguido por RT-qPCR. O RNA circular sem o motivo de ligação ao DNA ou motivo HuR foi usado como um controle de especificidade. O DNA biotilado se ligou a RNAs circulares com o motivo de aptâmero de ligação ao DNA.

[0605] A proteína HuR acoplada a grânulos de Proteína G-anti-HuR foi incubada com RNA circular, lavada e eluída a baixo pH. O material ligado foi incubado com DNA biotilado, lavado e suspenso com Dinagrânulos de estreptavidina. DNA circulares ligados a HuR com o motivo de ligação de aptâmero a DNA Hur e a estreptavidina suspensa produziram RNAs com motivos de ligação de aptâmero a RNA como se mostra na **FIG. 24**. Assim, a ligação foi observada quando os dois, HuR e DNA, motivos de ligação de aptâmero estavam presentes. Este resultado demonstrou que as moléculas de proteína e DNA de interesse foram seletivamente ligadas ao mesmo construto circular.

Exemplo 42: O RNA circular traduziu uma proteína e se ligou a uma proteína diferente que afetou sua tradução

[0606] Este exemplo demonstra que RNA circular que codifica uma proteína e ligação a uma proteína diferente que tem um efeito na tradução de RNA circular.

[0607] O receptor de antígeno humano (HuR) desempenha um papel central em mRNA alvo e desempenha um papel fundamental na regulação pós-transcricional de mRNA alvo com funções celulares centrais. Assim, o uso de HuR para controlar a expressão de RNA pode fornecer controle sobre a dosagem de proteína traduzida.

[0608] Tal como mostrado no Exemplo seguinte, um RNA circular que não ocorre naturalmente foi manipulado para codificar *Gaussia luciferase* (GLUC), uma proteína segregada e biologicamente ativa e liga-se a Hur para regular a tradução GLuc. Este RNA circular incluiu um IRES, uma ORF que codifica a *Gaussia Luciferase*, dois elementos espaçadores flanqueando a IRES-ORF e motivos de aptâmero de ligação 1X, 2X ou 3X HuR: 5'-UCA UAA UCA AUU UAU UAU UUU CUU UUA UUU UAU UCA CAU AAU UUU GUU UUU-3' (SEQ ID NO: 33), 5'-AUU UUG UUU UUA ACA UUUC-3' (SEQ ID NO: 34), 5'-UCA UAA UCA AUU UAU UAU UUU CUU UUA UUU UAU UCA CAU AAU UUU GUU UUU AUU UUG UUU UUA ACA UUU C-3' (SEQ ID NO: 35) para ligar HuR.

[0609] O RNA linear não modificado foi sintetizado por transcrição *in vitro* usando T7 RNA polimerase de um segmento de DNA compreendendo o motivo RNA HuR e a sequência de ligação à proteína.

[0610] O RNA transcrito foi purificado com um estojo de limpeza de RNA (New England Biolabs, T2050), tratado com RNA 5'-fosfo-hidrolase (RppH) (New England Biolabs, M0356) seguindo as instruções do fabricante e purificado novamente com a coluna de purificação de RNA. O RNA tratado com RppH foi circularizado usando um DNA *splint* complementar a sequências de circularização e T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs, M0239). O RNA circular foi purificado por Ureia-

PAGE, eluído em um tampão contendo (Acetato de Sódio a 0,5 M, SDS a 0,1%, EDTA a 1 mM, precipitado com etanol e ressuspenso em água isenta de RNase. A qualidade do RNA foi avaliada por Ureia-PAGE ou através de eletroforese automatizada (Agilent).

[0611] A ligação do RNA circular a HuR foi determinada por ensaio de suspensão de RNA in vitro, conforme descrito anteriormente.

[0612] Para avaliar o efeito de ligação Hur e o seu efeito sobre a expressão da proteína de RNA circular em células, 5×10^3 células HeLa foram reversamente transfectadas com sucesso com um reagente de transfecção à base de lipídeos (Invitrogen) e 2 nM de RNA circular. A atividade da Gaussia Luciferase foi monitorada diariamente por até 96 h em sobrenadantes de cultura de células, como medida de expressão, usando um kit de ensaio da Gaussia Luciferase e seguindo as instruções do fabricante.

[0613] FIG. 25 mostra a expressão de proteína secretada inferior a partir de RNA circular com sítios de ligação de aptâmero a HuR. Ainda mais, os níveis de expressão de GLuc mudaram com o número de motivos de ligação de aptâmero a HuR no RNA circular. Este exemplo demonstra que o nível de tradução do RNA circular desenhado foi afetado por aptâmeros de ligação de proteína adicionais.

[0614] Embora as modalidades preferidas da presente divulgação tenham sido mostradas e descritas aqui, será óbvio para aqueles peritos na técnica que tais modalidades são fornecidas apenas a título de exemplo. Numerosas variações, mudanças e substituições ocorrerão agora para aqueles peritos na técnica sem se afastar da divulgação. Deve ser

entendido que várias alternativas às modalidades aqui descritas podem ser empregadas na prática da divulgação. Pretende-se que as seguintes reivindicações definam o escopo da divulgação e que métodos e estruturas dentro do escopo dessas reivindicações e seus equivalentes sejam cobertos por elas.

Reivindicações:

1. Método de ligação de um alvo a uma célula, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao alvo; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o alvo detectável pelo menos 5 dias após a entrega.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alvo é selecionado do grupo que consiste em uma molécula de ácido nucleico, uma pequena molécula, uma proteína, um carboidrato e um lipídeo.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alvo é uma proteína de regulação gênica.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a proteína de regulação gênica é um fator de transcrição.

5. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico é uma molécula de DNA ou uma molécula de RNA.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo modula a expressão gênica.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo modula a transcrição direcionada de uma molécula de DNA, a remodelação epigenética de uma molécula de DNA ou a degradação de uma molécula de DNA.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo modula a degradação do alvo, a translocação do alvo ou a transdução do sinal alvo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a expressão gênica está associada à patogênese de uma doença ou afeção.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo é detectável pelo menos 7, 8, 9 ou 10 dias após a entrega.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução está presente pelo menos cinco dias após a entrega.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução está presente pelo menos 6, 7, 8, 9 ou 10 dias após a entrega.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução é um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução não modificado.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução tem uma estrutura secundária quase de dupla cadeia.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aptâmero tem ainda uma estrutura terciária que se liga ao alvo.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula eucariótica.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a célula eucariótica é uma célula humana.

18. Método de ligação a um fator de transcrição em uma célula, o método caracterizado pelo fato de que compreende: fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o fator de transcrição e modula a expressão gênica.

19. Método para sequestrar um fator de transcrição em uma célula, o método caracterizado pelo fato de que compreende: fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição; e

entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução sequestra o fator de transcrição ligando-se ao fator de transcrição para formar um complexo na célula.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a viabilidade celular diminui após a formação do complexo.

21. Método de sensibilização de uma célula a um agente citotóxico, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga ao fator de transcrição; e

entregar o agente citotóxico e o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com o fator de transcrição na célula; sensibilizando assim a célula para o agente citotóxico em comparação com uma célula sem o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a sensibilização da célula ao agente citotóxico resulta em viabilidade celular diminuída após a distribuição do agente citotóxico e do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a viabilidade celular diminuída é diminuída em 40% ou mais pelo menos dois dias após a entrega do agente citotóxico e do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução.

24. Método de ligação de uma proteína patogênica em uma célula, o método caracterizado pelo fato de que compreende: fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga à proteína patogênica; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a proteína patogênica para degradar a proteína patogênica.

25. Método de ligação de uma molécula de ácido ribonucleico em uma célula, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência complementar a uma sequência da molécula de ácido ribonucleico; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula de ácido ribonucleico.

26. Método de ligação da molécula de ácido desoxirribonucleico genômico em uma célula, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga à molécula de ácido desoxirribonucleico genômico; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula de ácido desoxirribonucleico genômico e modula a expressão gênica.

27. Método de ligação de uma pequena molécula em uma célula, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero que se liga à molécula pequena; e entregar o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução à célula, em que o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução forma um complexo com a molécula pequena e modula um processo celular.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena é um composto orgânico

com um peso molecular de não mais do que 900 daltons e modula um processo celular.

29. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena é um fármaco.

30. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena é um fluoróforo.

31. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a molécula pequena é um metabólito.

32. Composição caracterizada pelo fato de que compreende um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução compreendendo uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga a um alvo.

33. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende um polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução que compreende uma sequência de aptâmero, em que a sequência de aptâmero tem uma estrutura secundária que se liga ao alvo; e um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

34. Célula caracterizada pelo fato de que compreende o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução, conforme definida na reivindicação 32.

35. Método de tratamento de um sujeito em necessidade caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição, conforme definida na reivindicação 32, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 33.

36. Polinucleotídeo caracterizado pelo fato de que codifica o polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução, conforme definida na reivindicação 32.

37. Método caracterizado pelo fato de que é para a produção do polirribonucleotídeo circular incompetente para tradução, conforme definida na reivindicação 32.

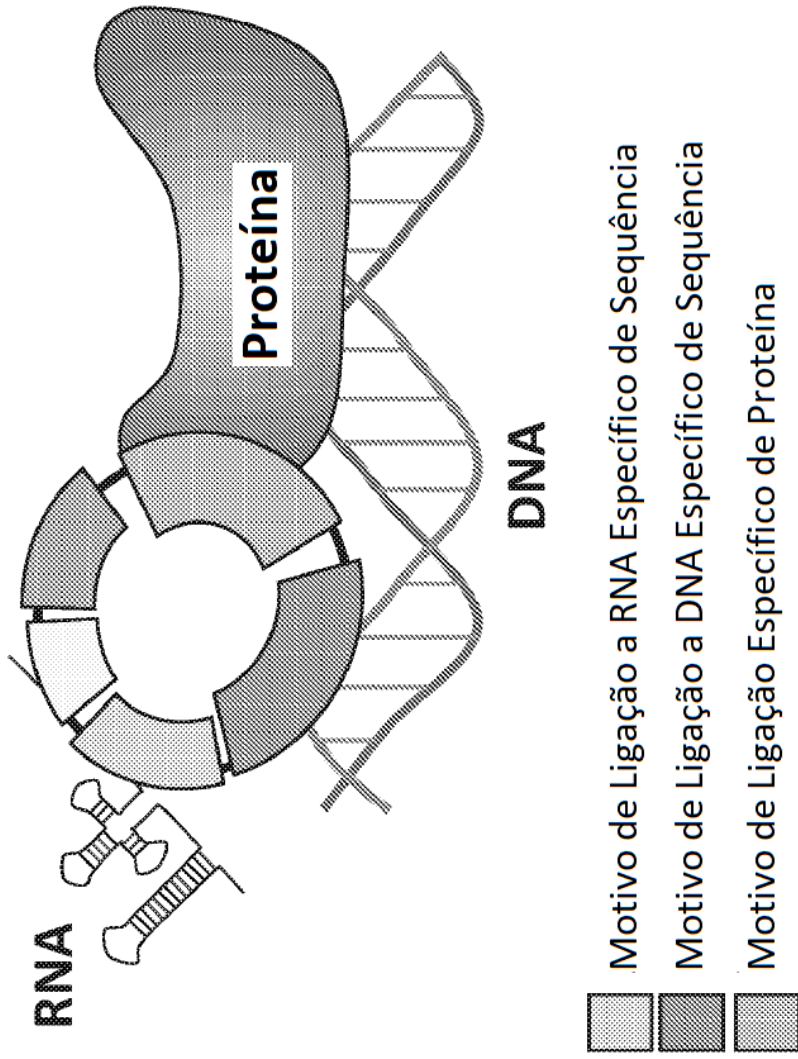


FIG. 1

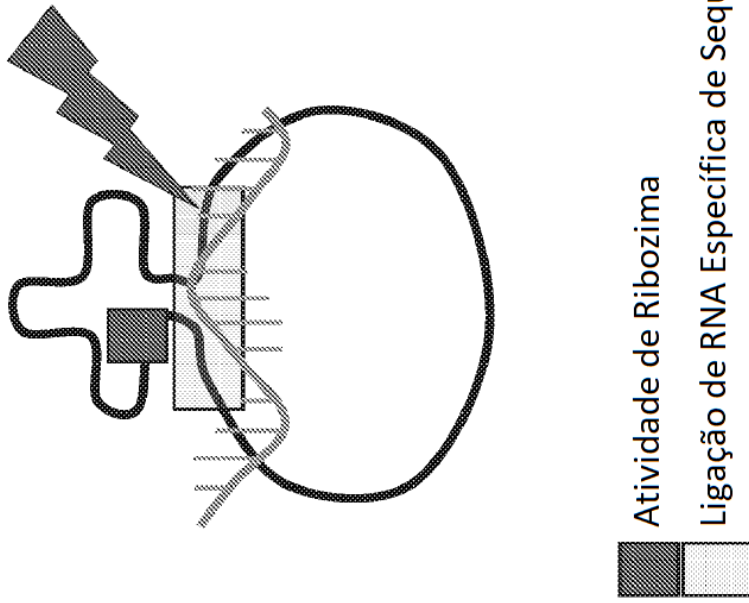


FIG. 2

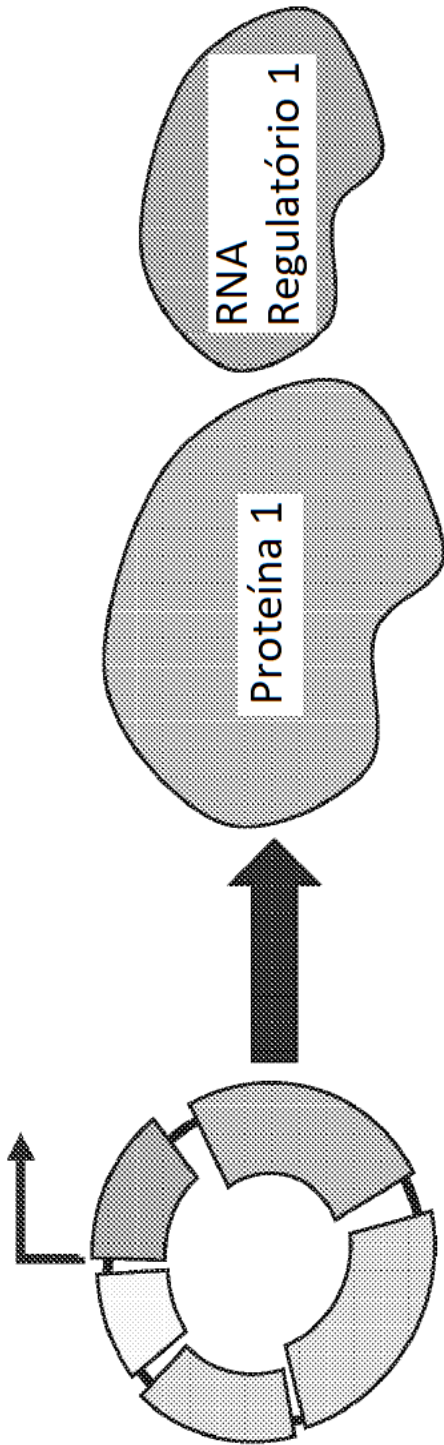
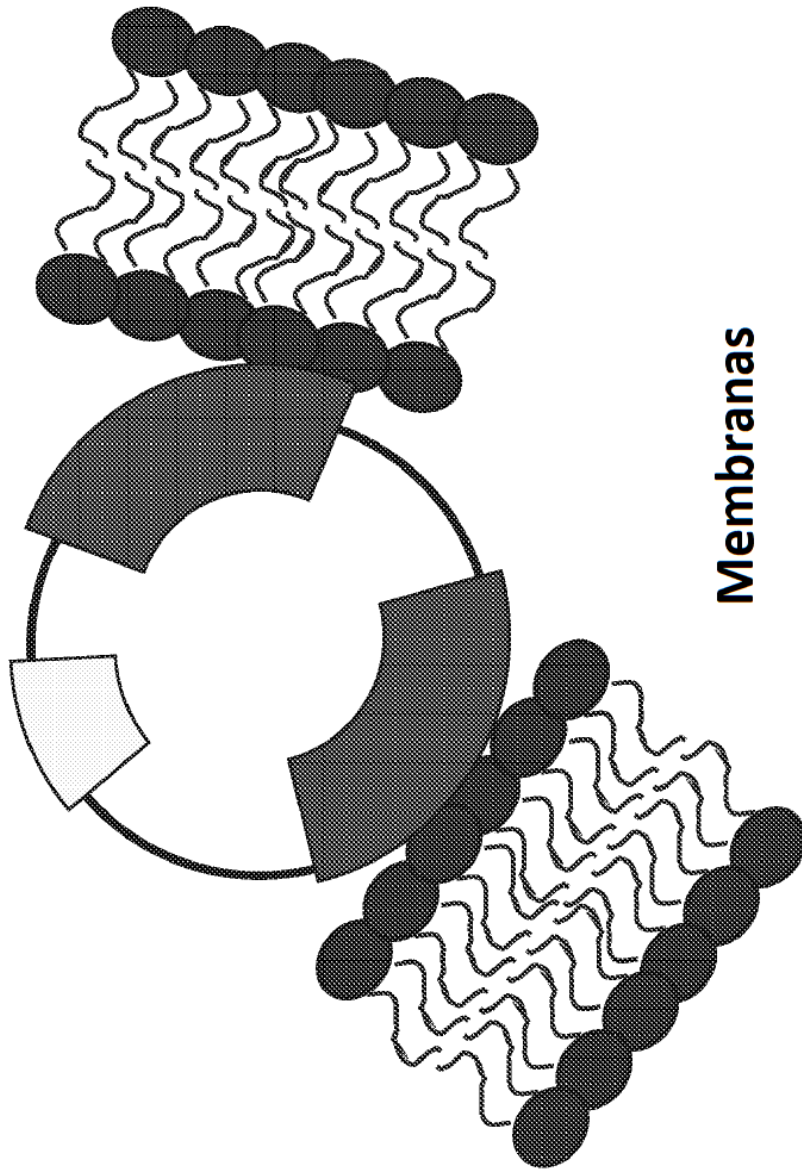


FIG. 3



Membranas

FIG. 4

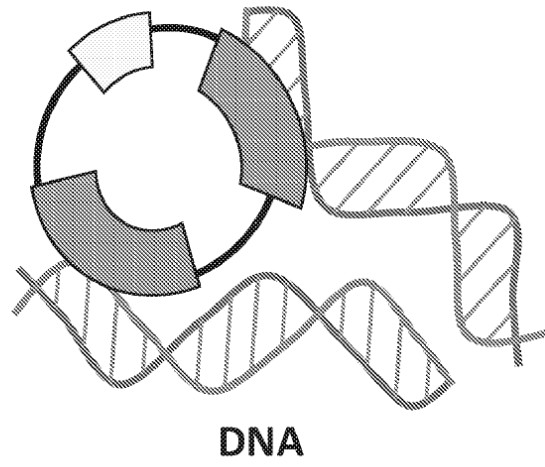


FIG. 5A

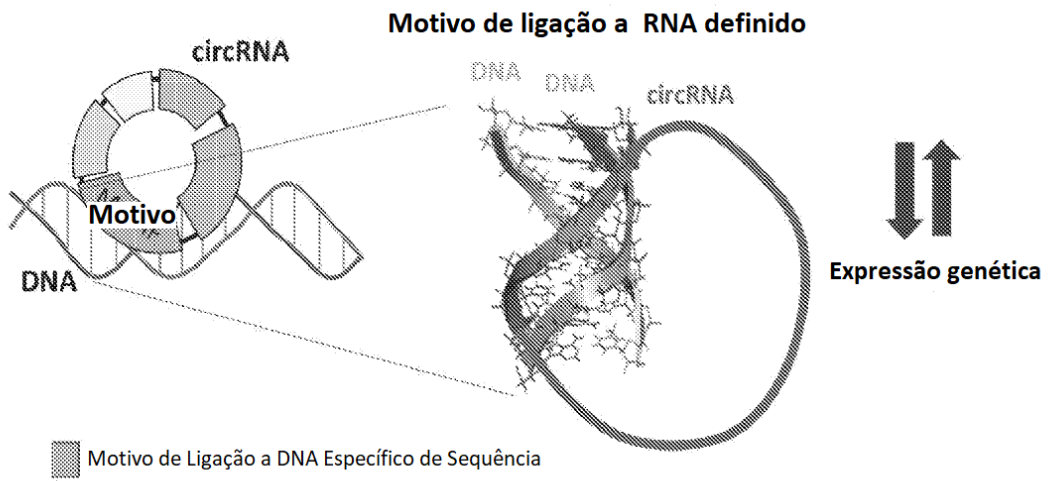


FIG. 5B

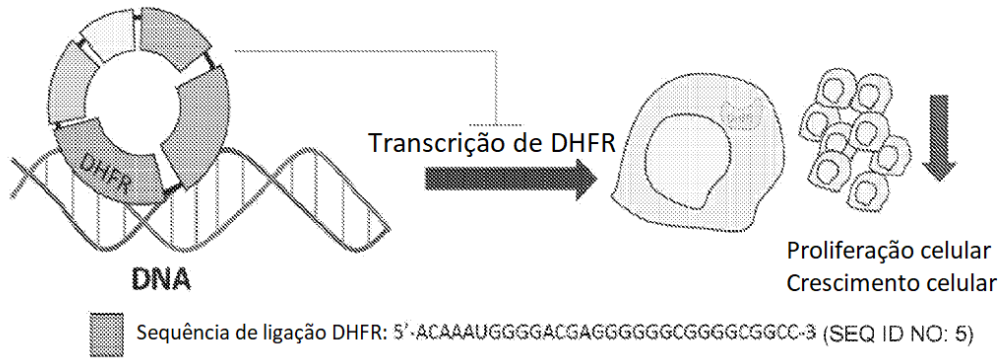


FIG. 5C

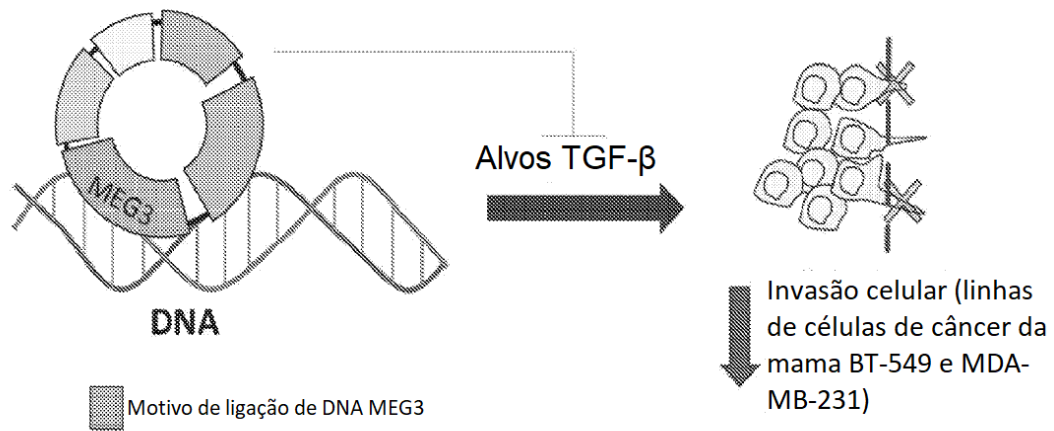


FIG. 5D

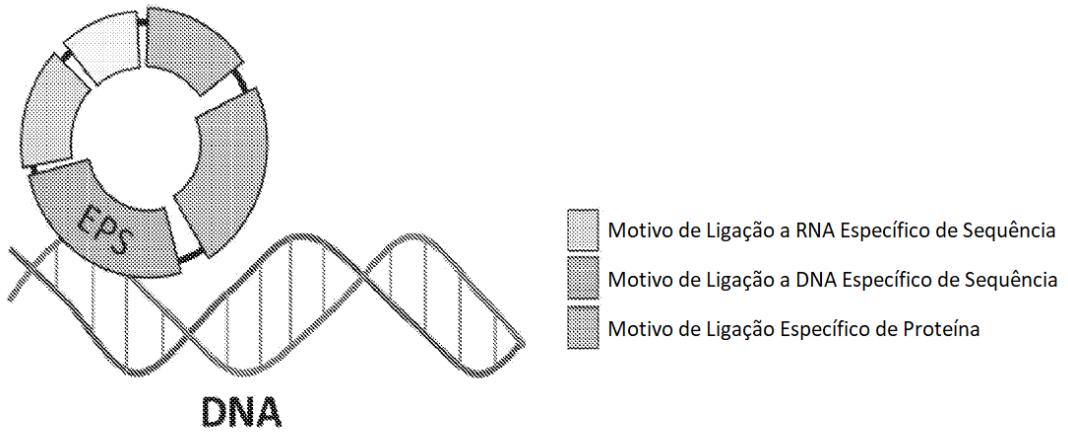


FIG. 5E

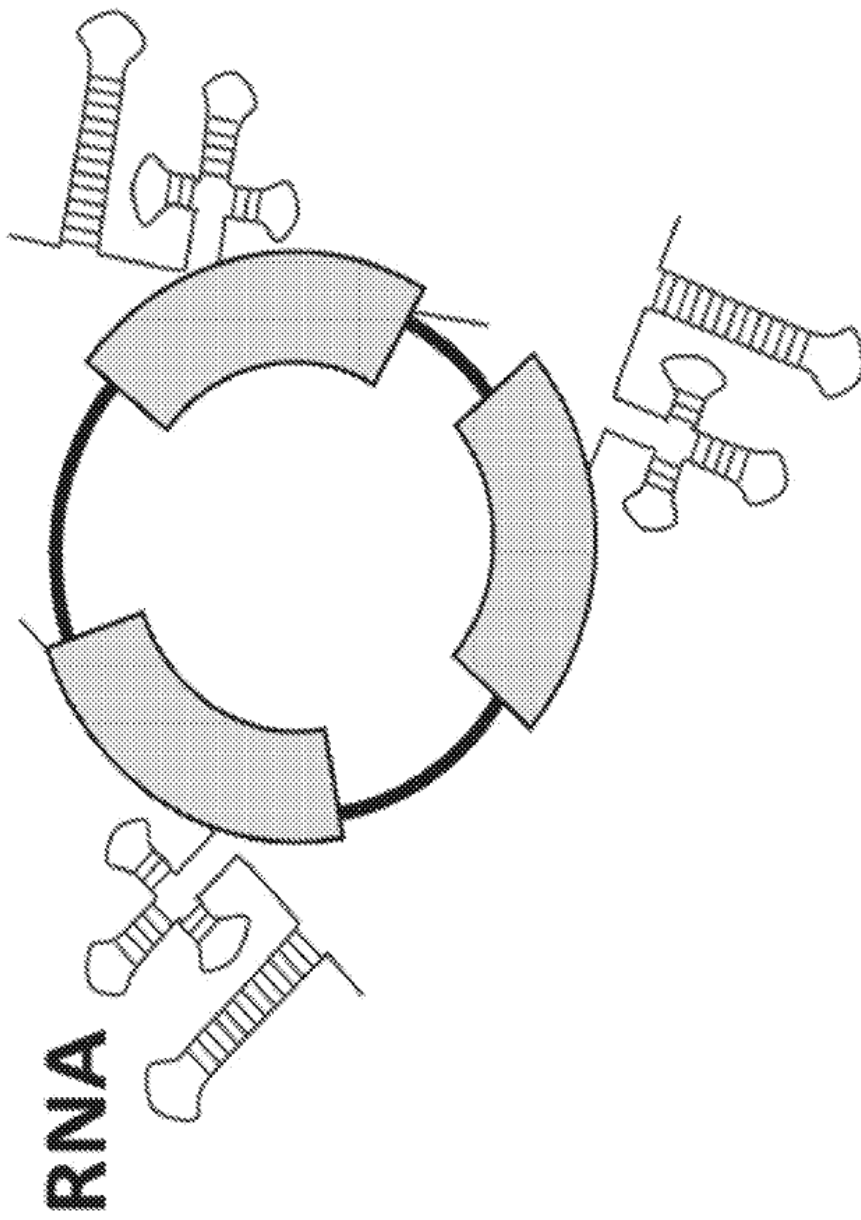


FIG. 6

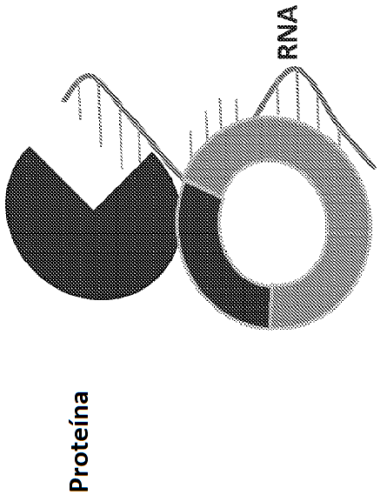


FIG. 7B

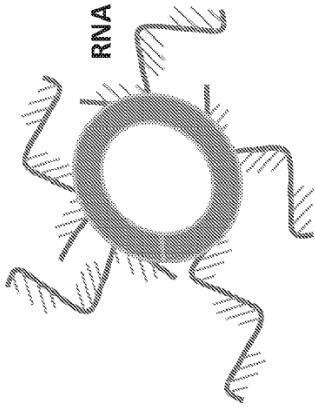


FIG. 7A

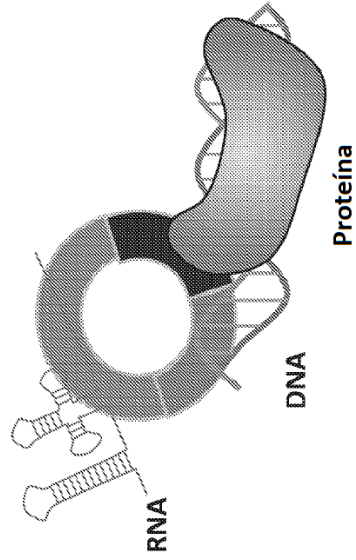


FIG. 7C

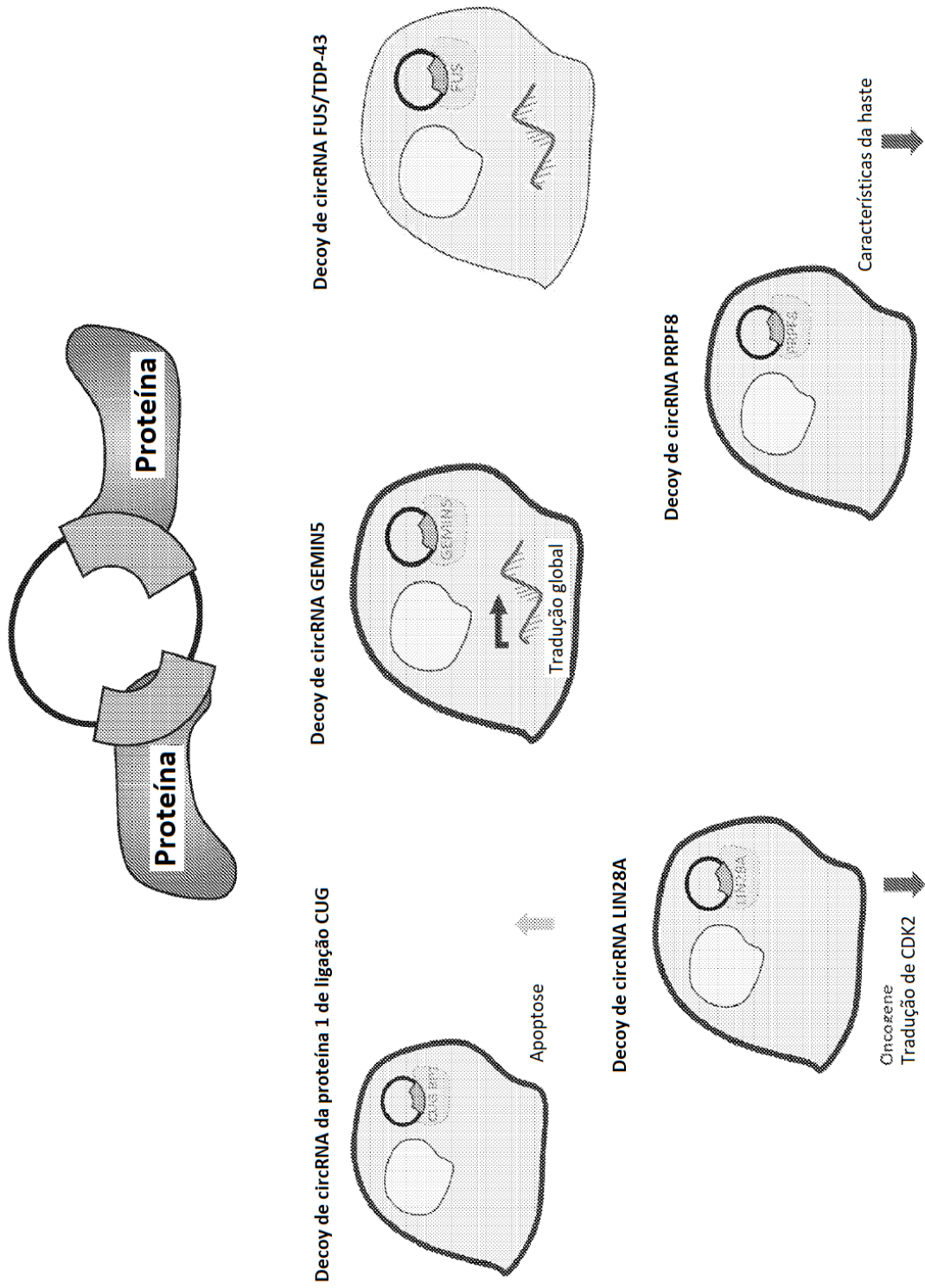


FIG. 8

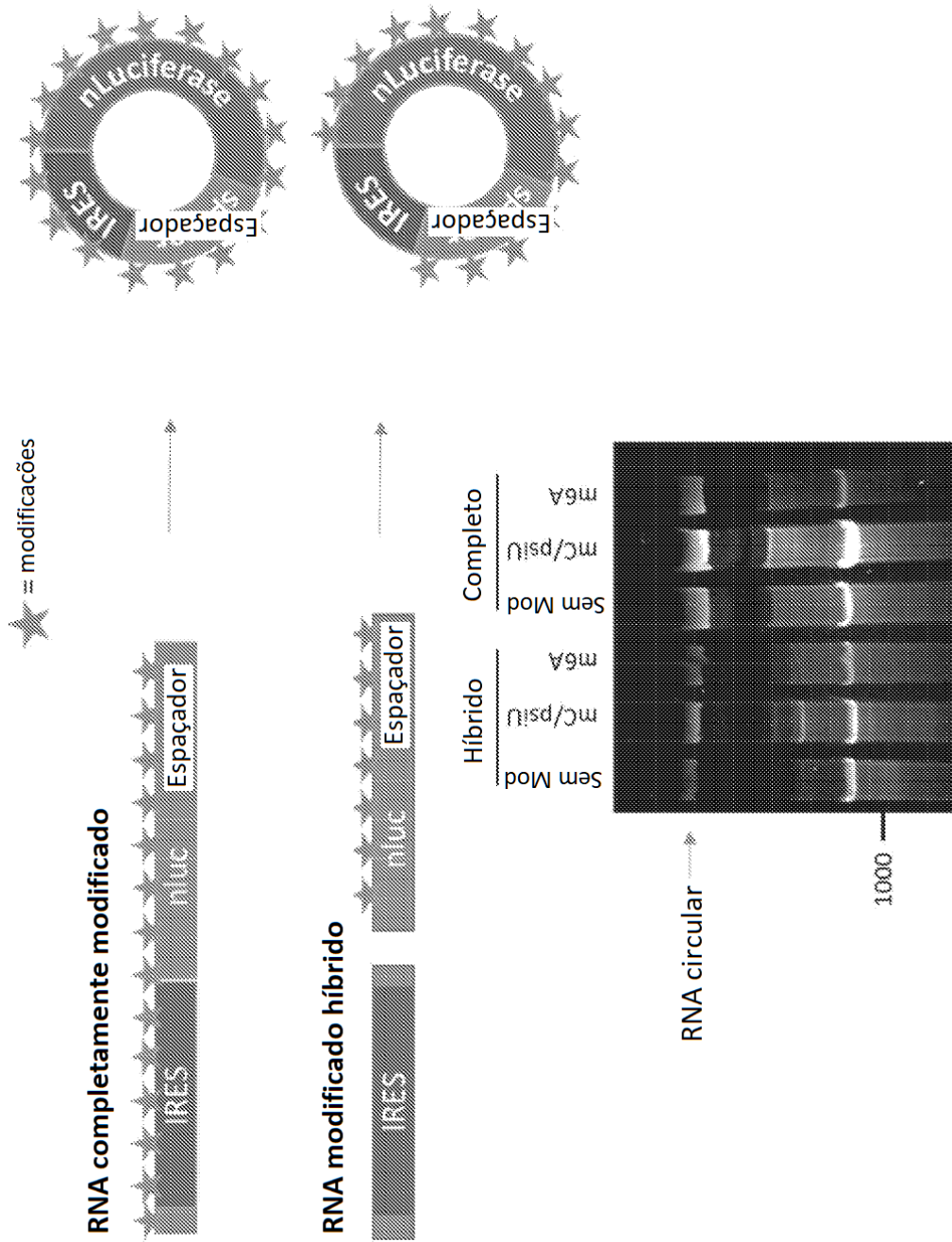


FIG. 9 A

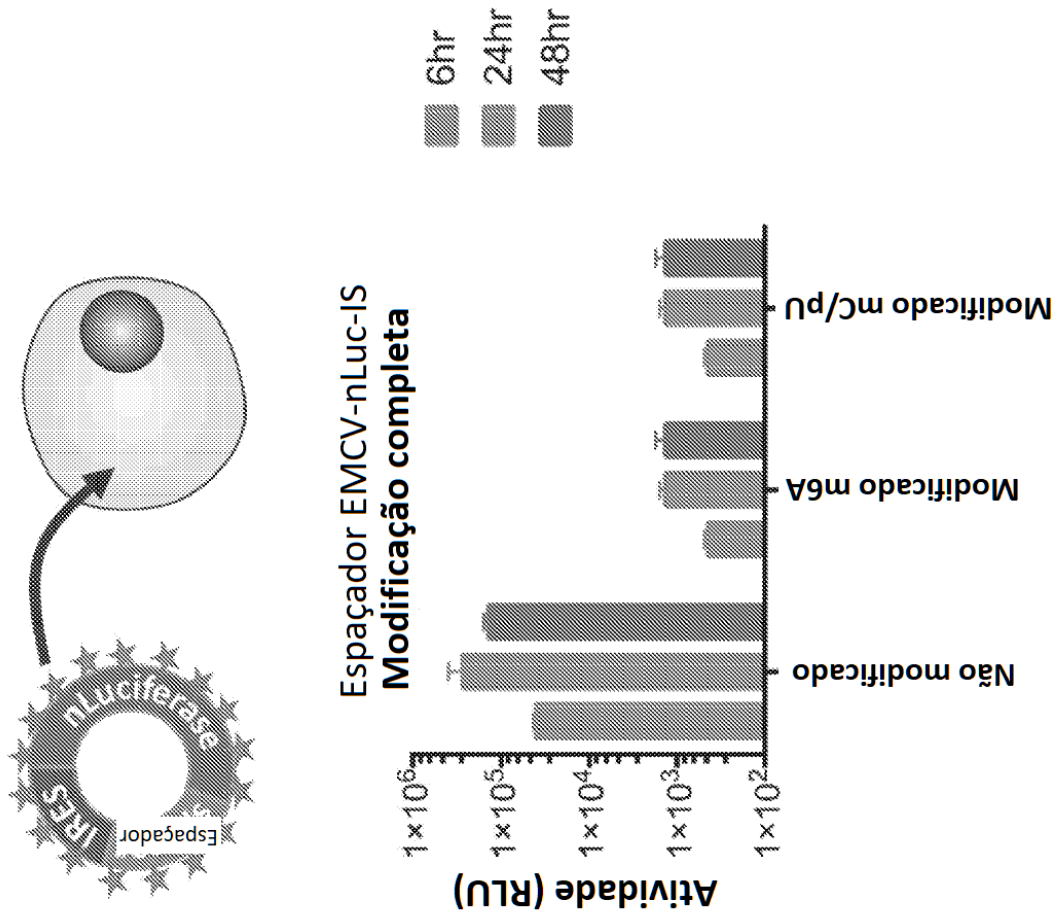


FIG. 9 B

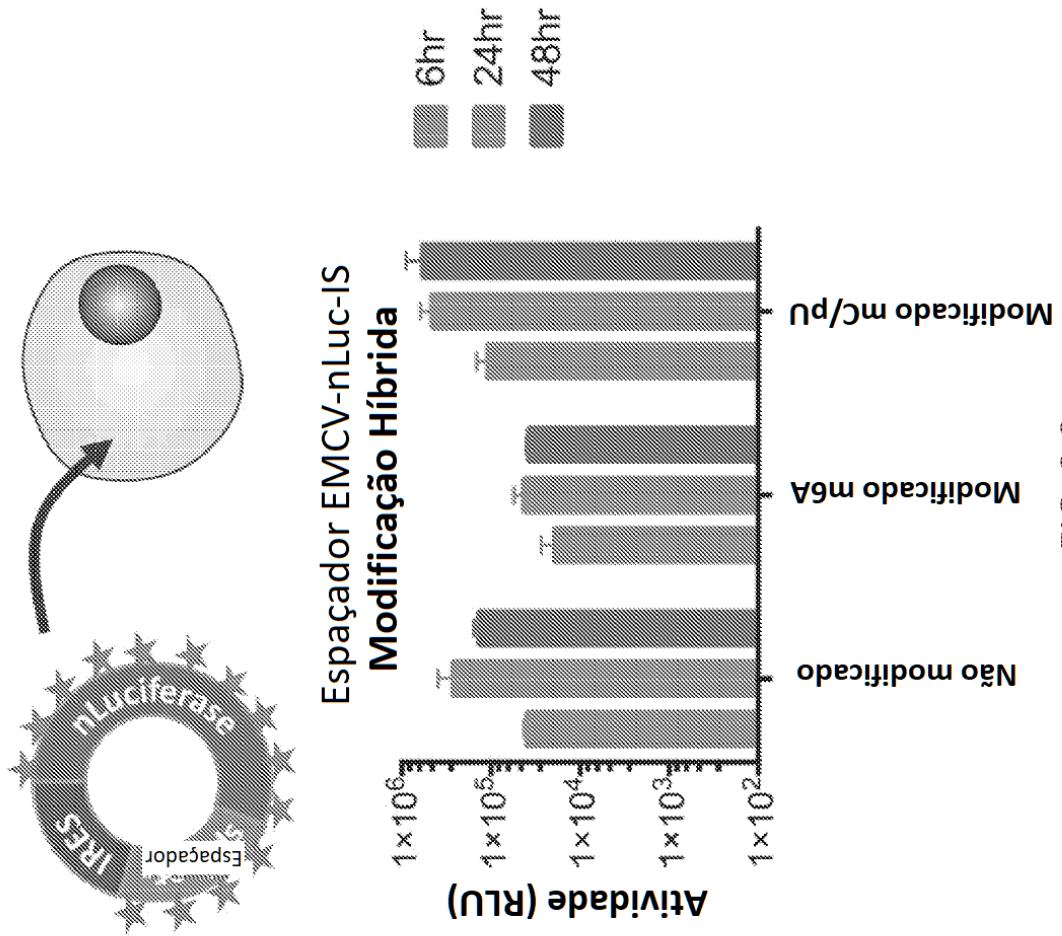


FIG. 9 C

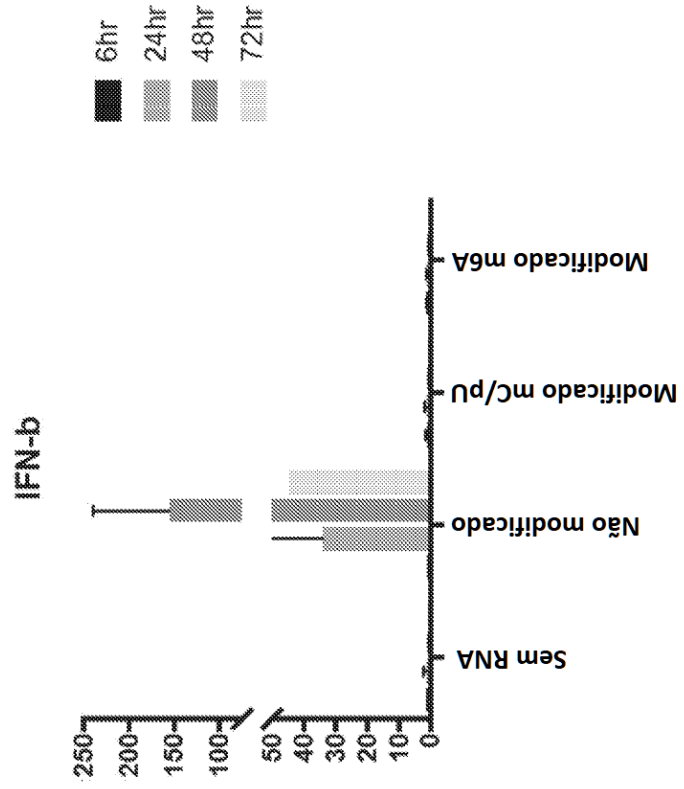
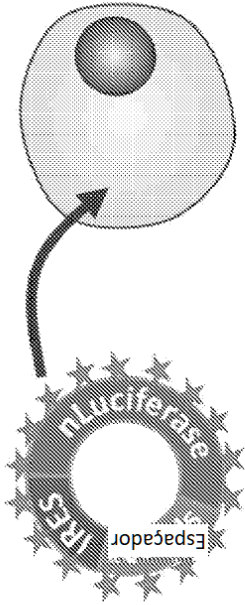


FIG. 10 A



MDA5

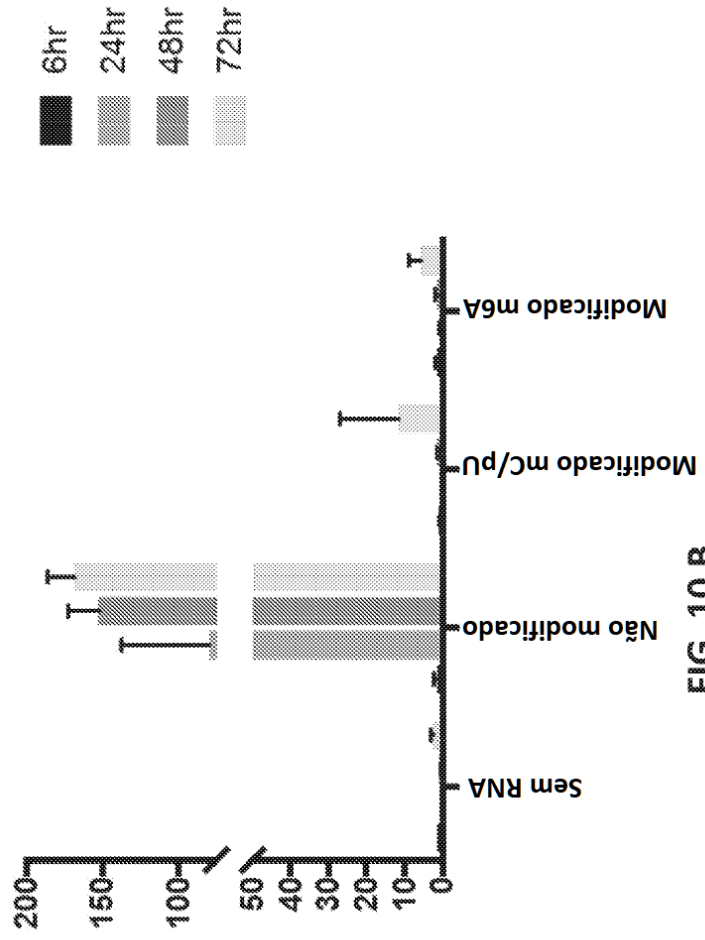


FIG. 10 B

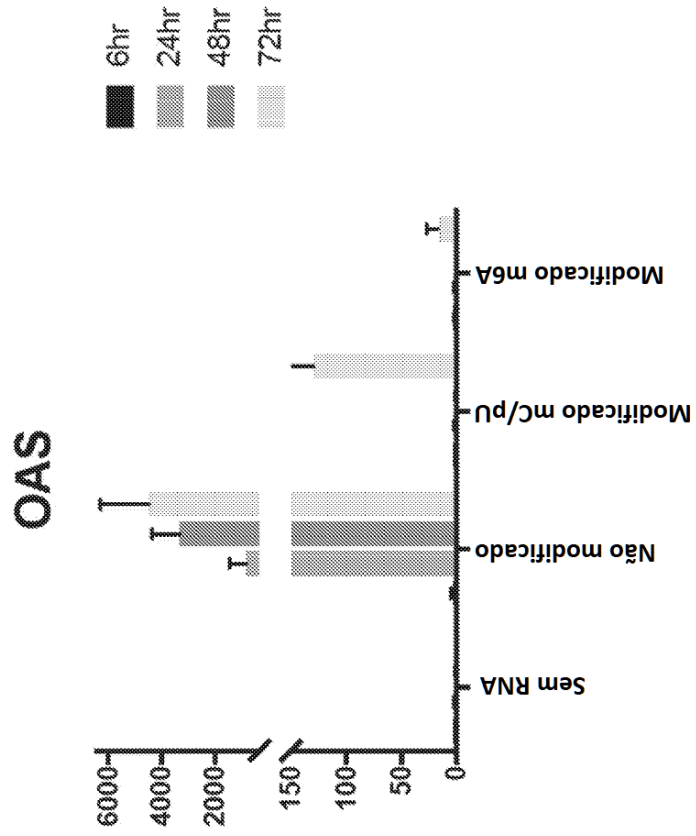


FIG. 10 C

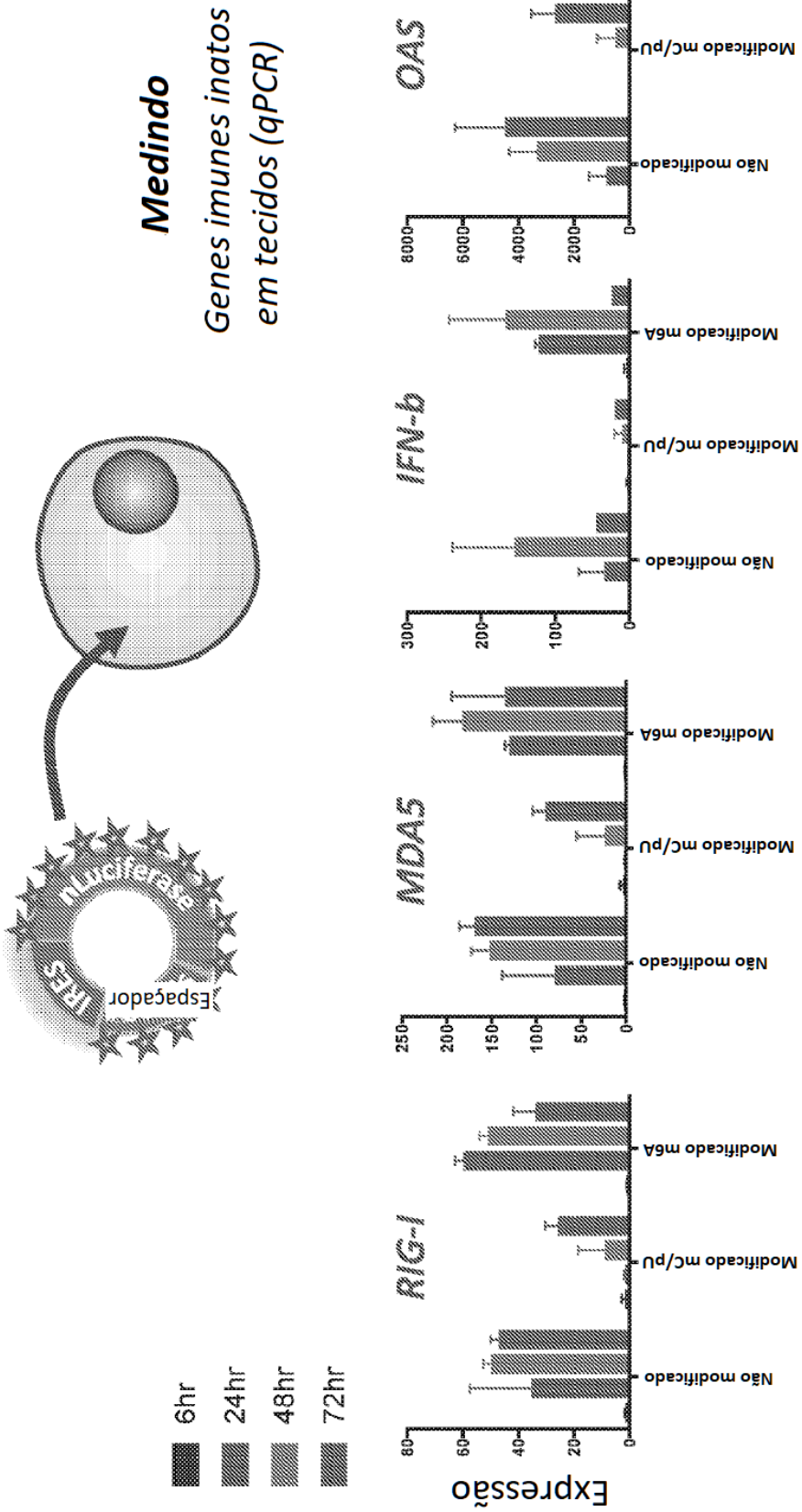


FIG. 11

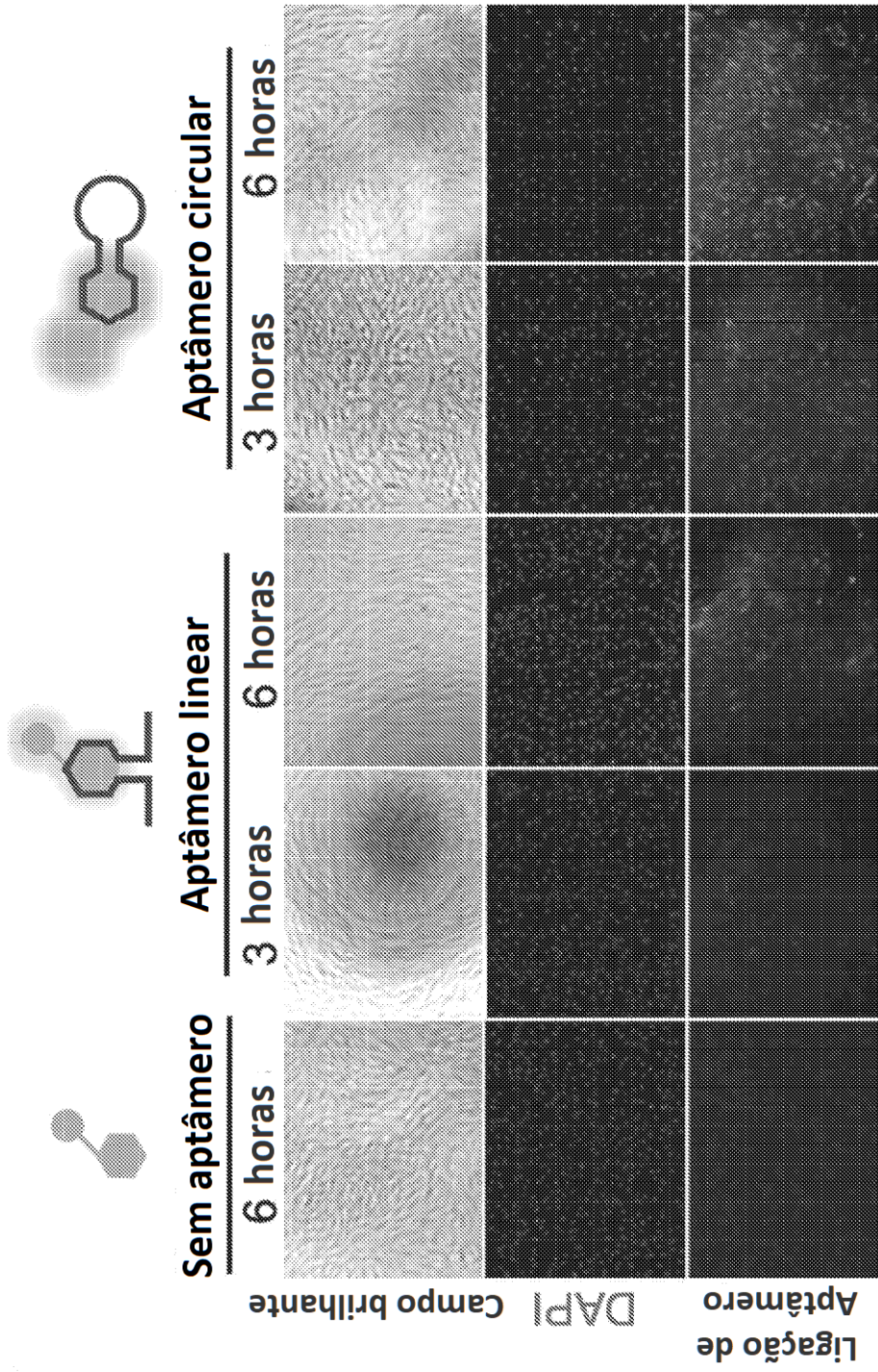


FIG. 12

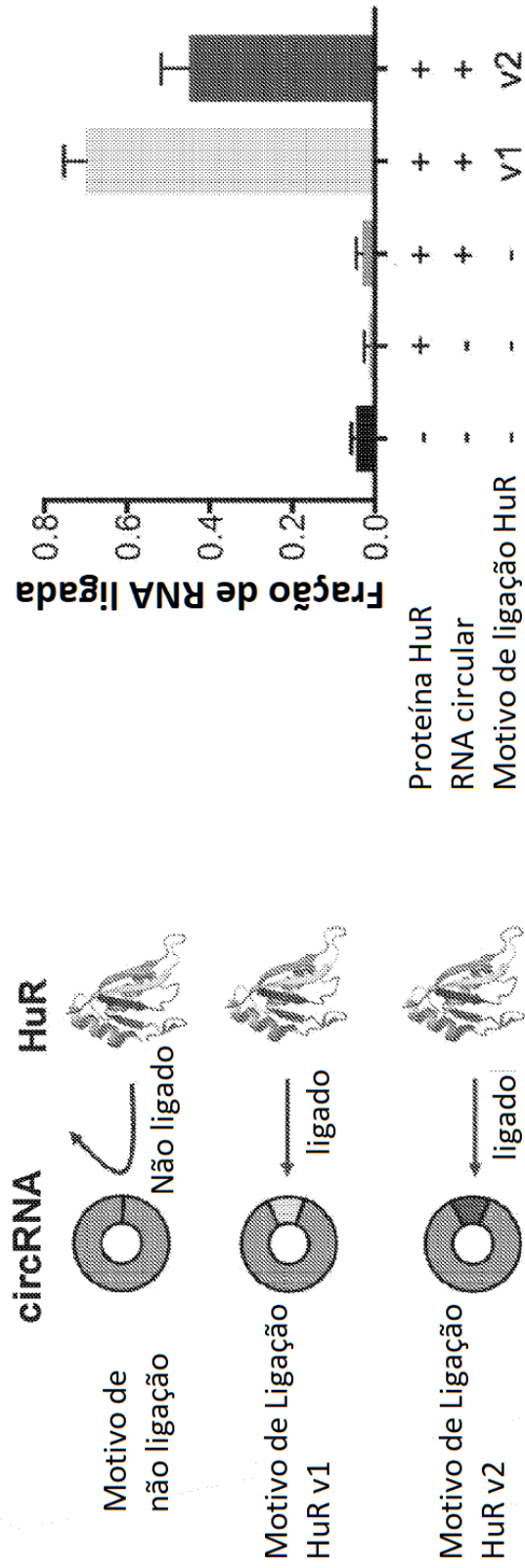


FIG. 13

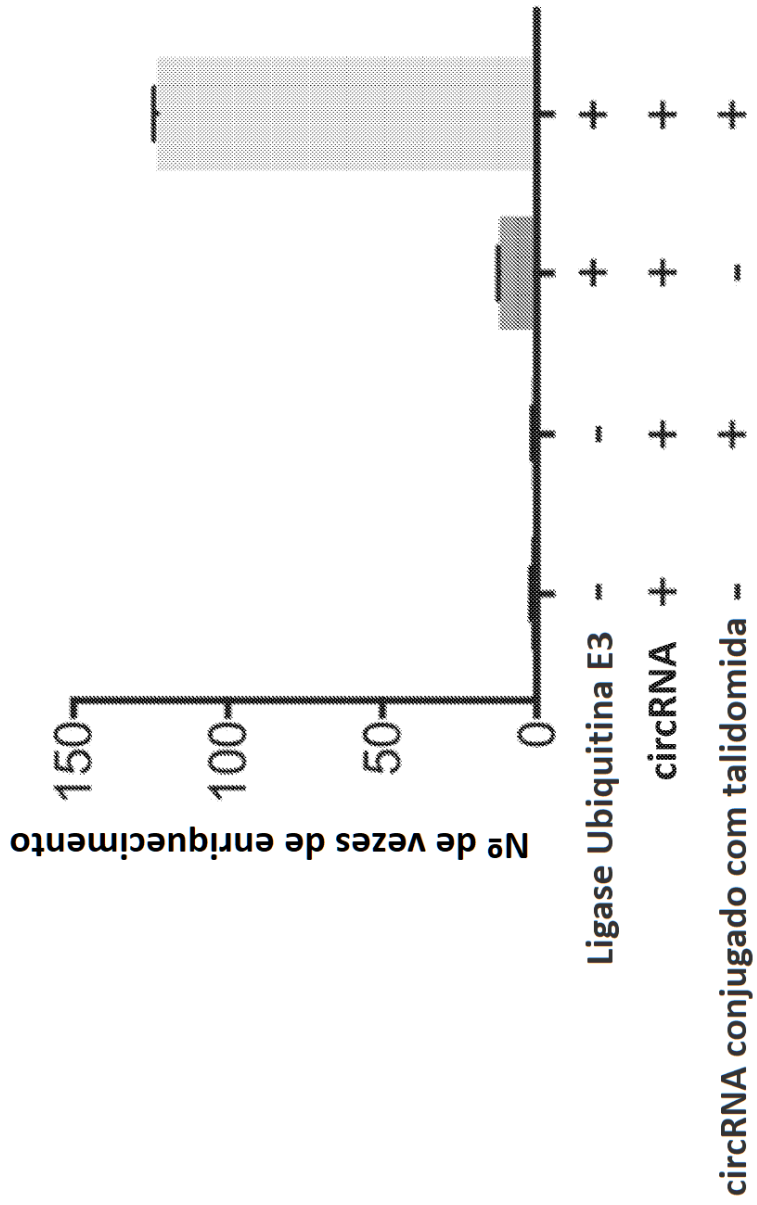


FIG. 14

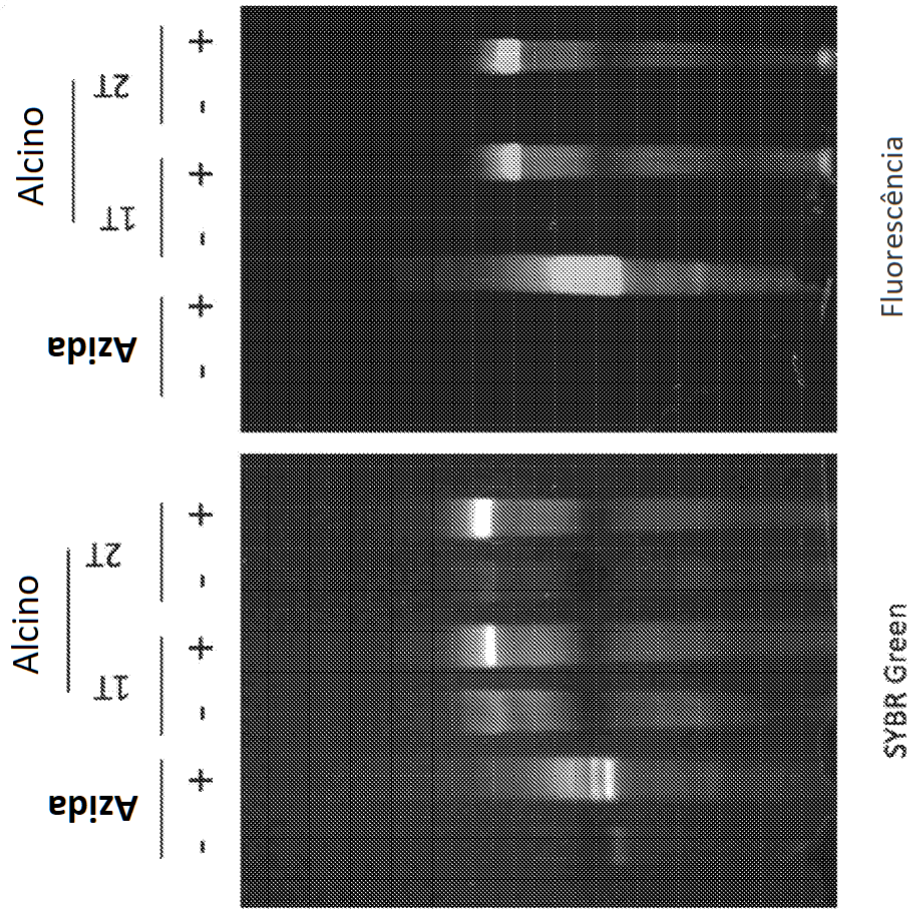


FIG. 15

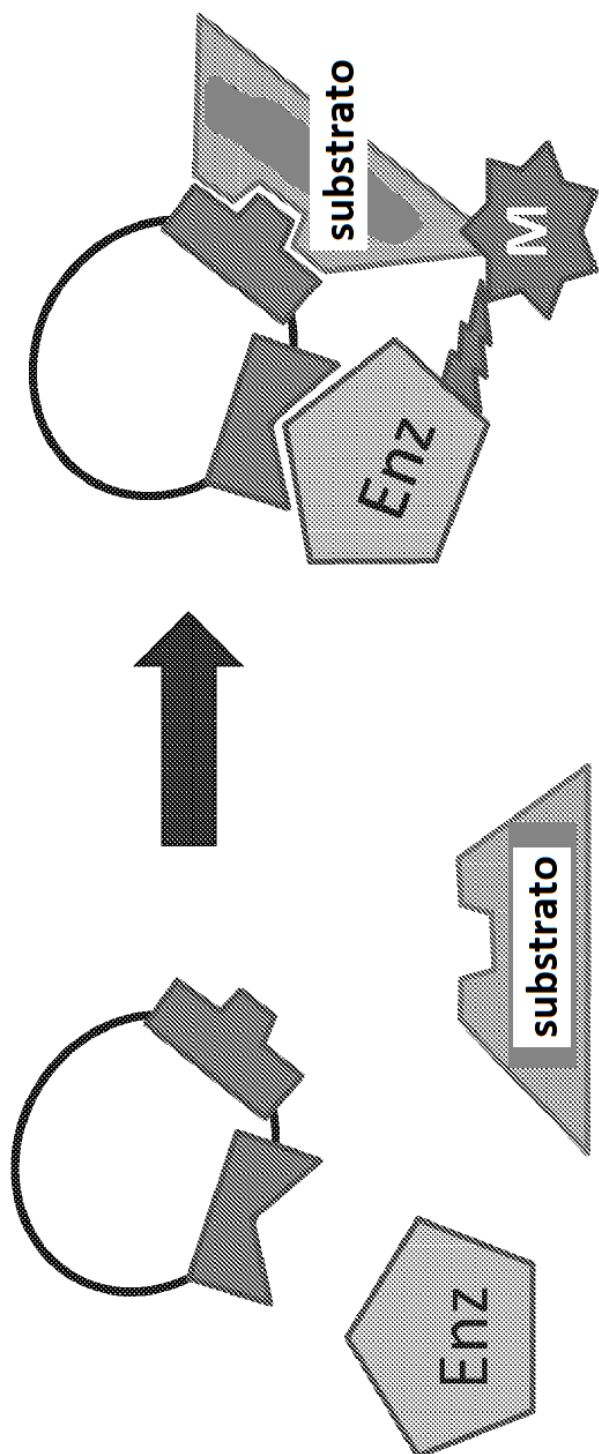


FIG. 16

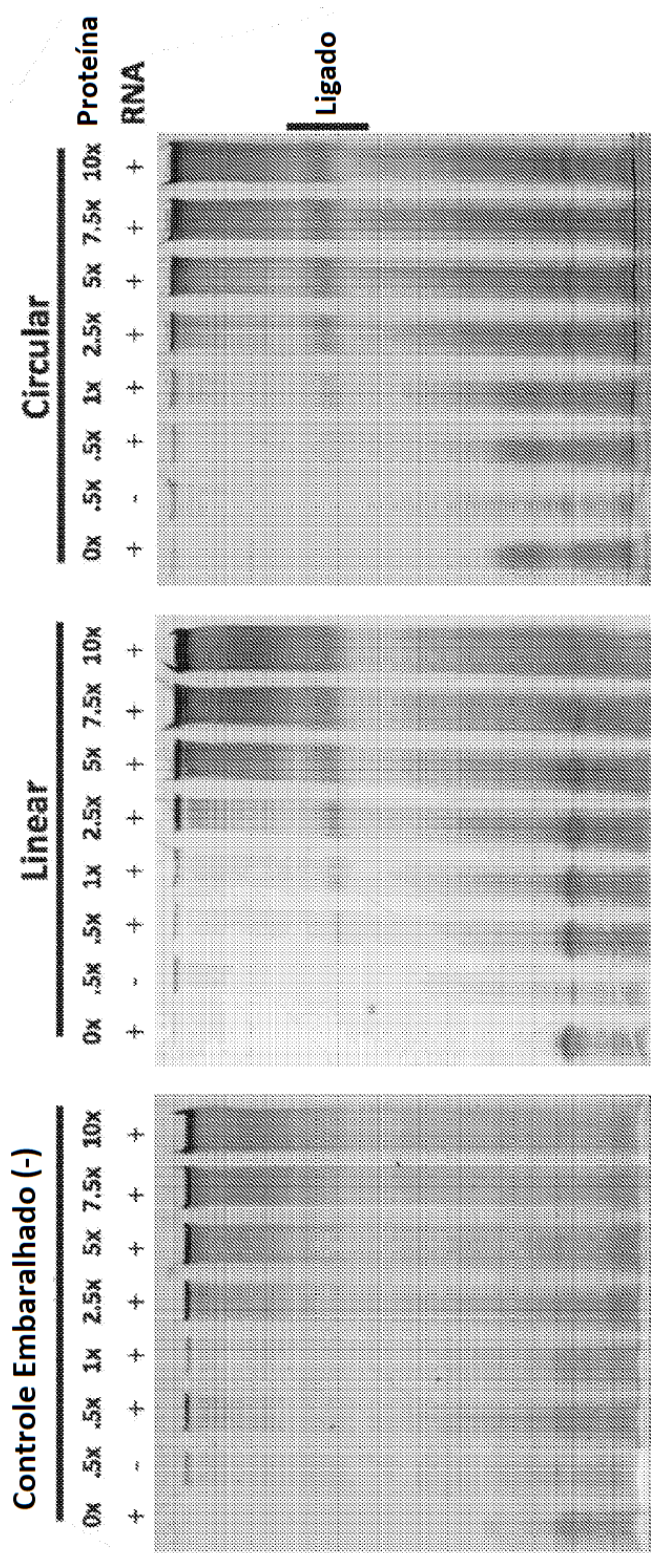


FIG. 17

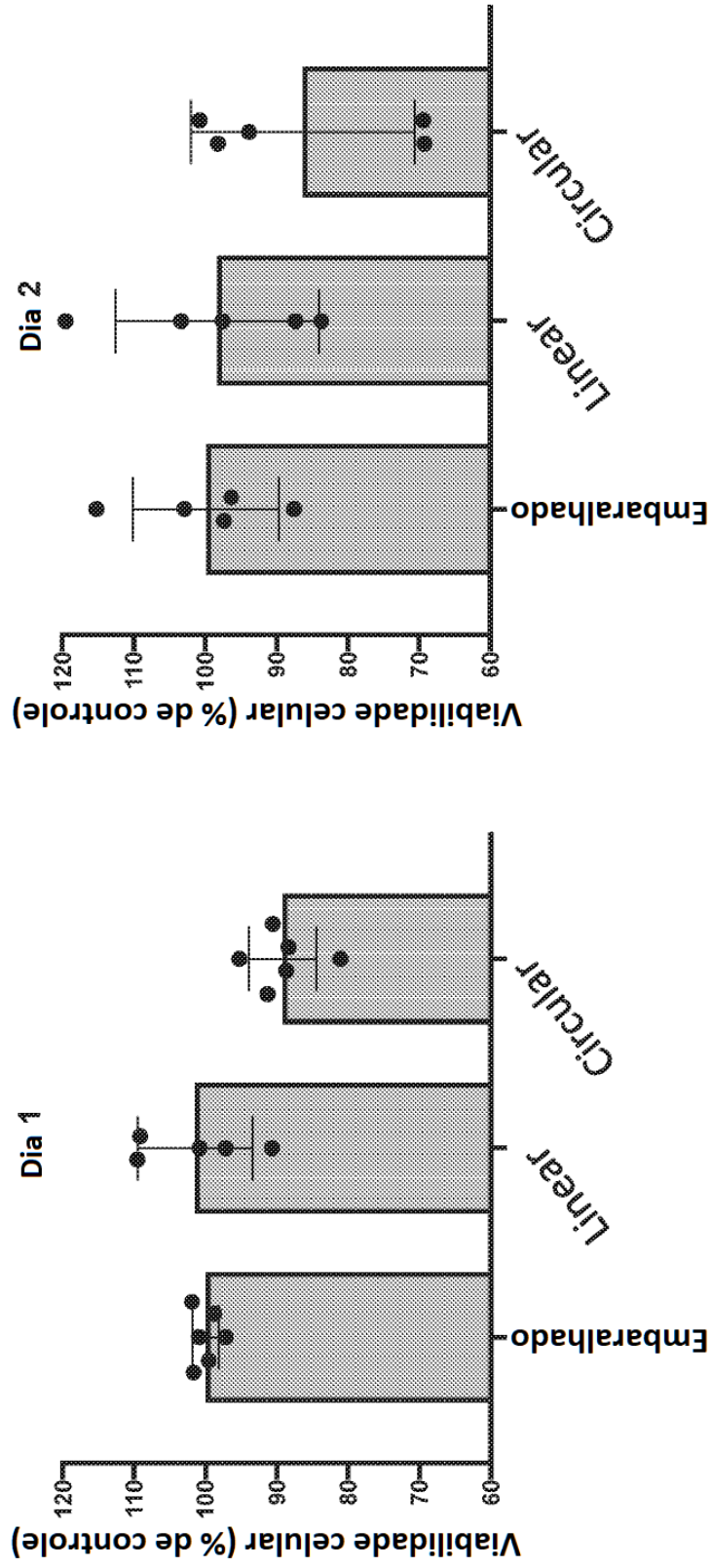


FIG. 18

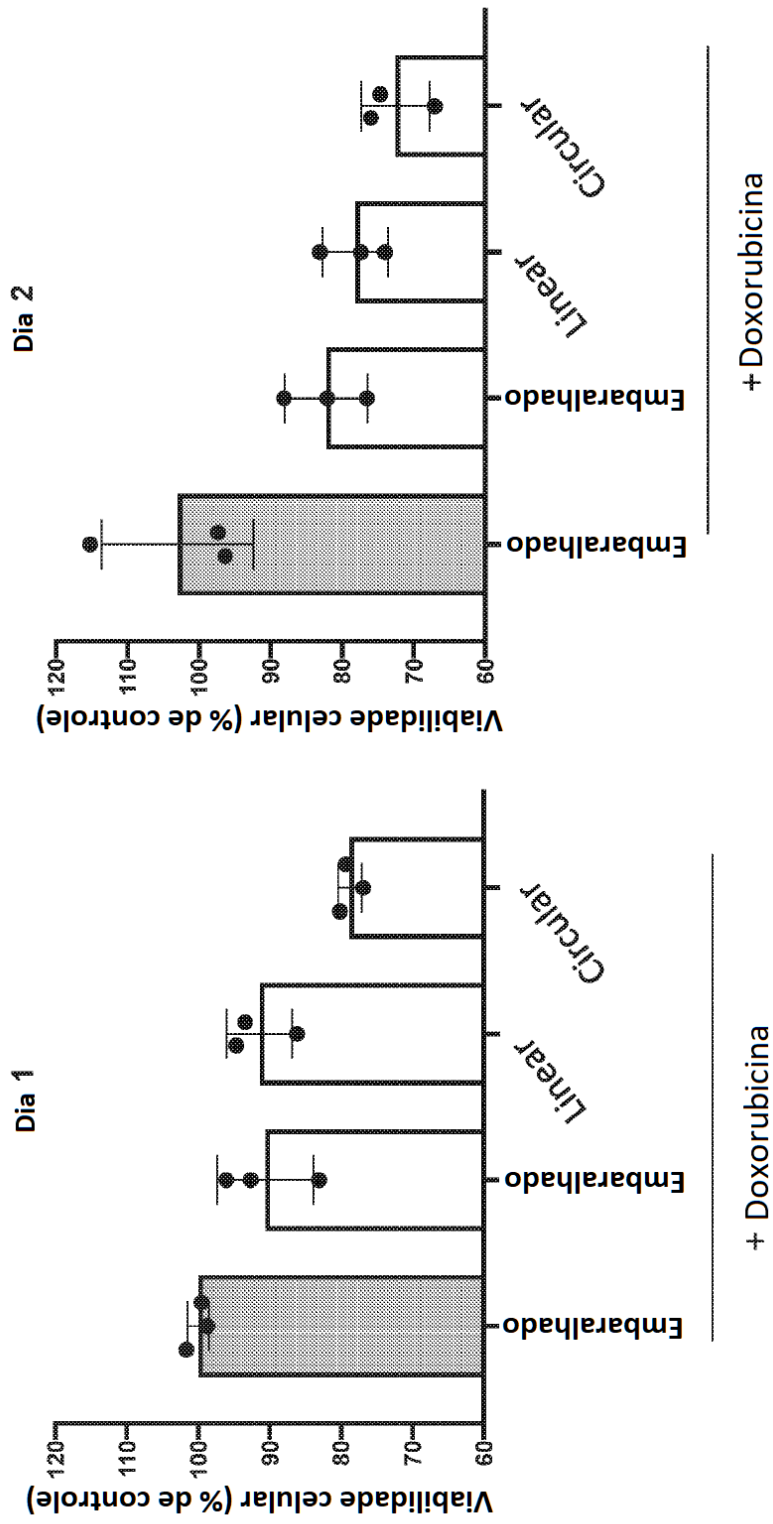


FIG. 19

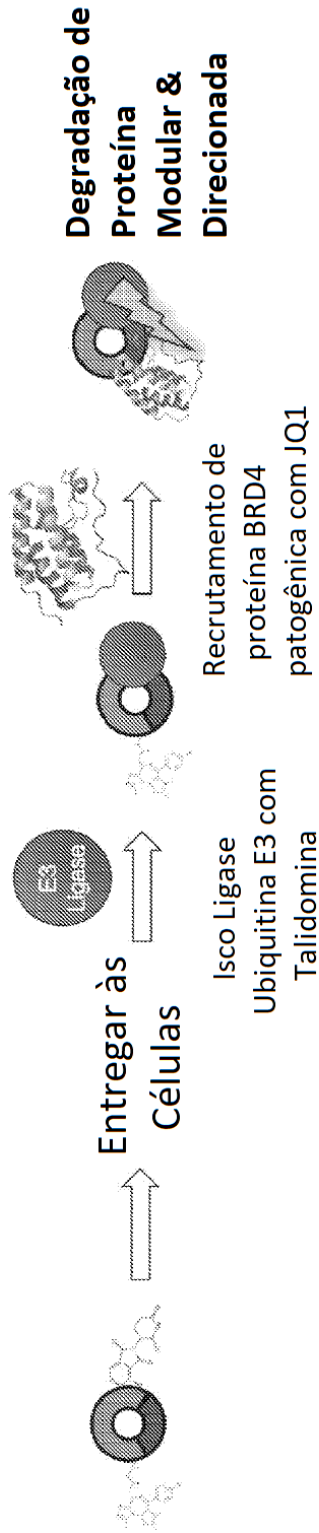


FIG. 20

Western Blot

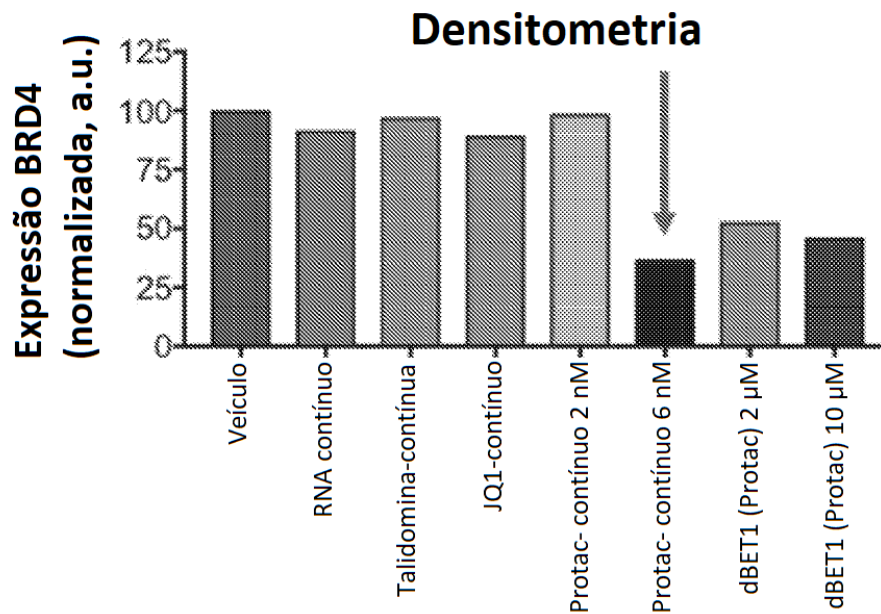
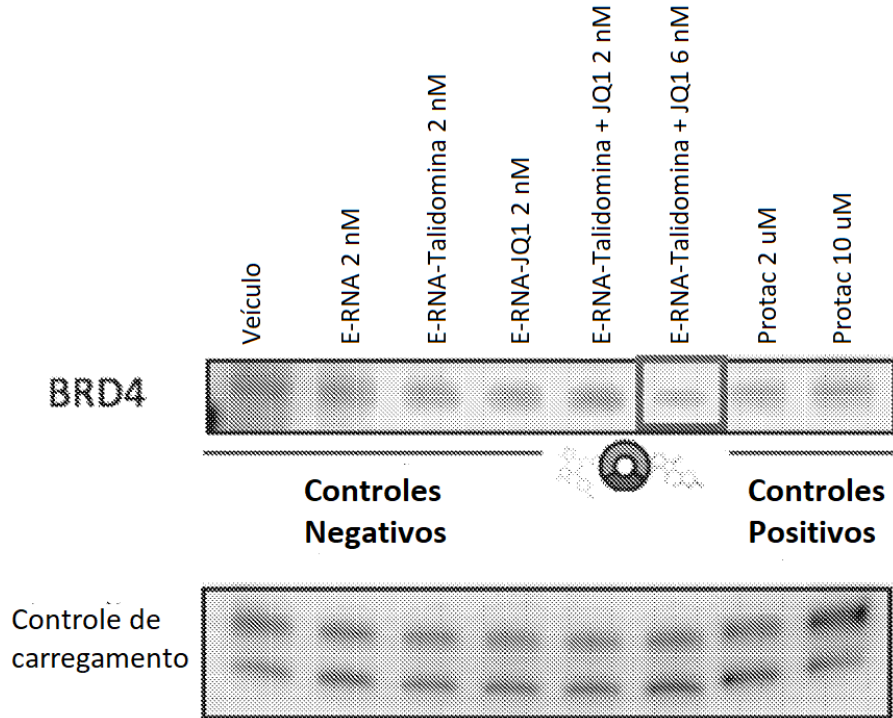


FIG. 21

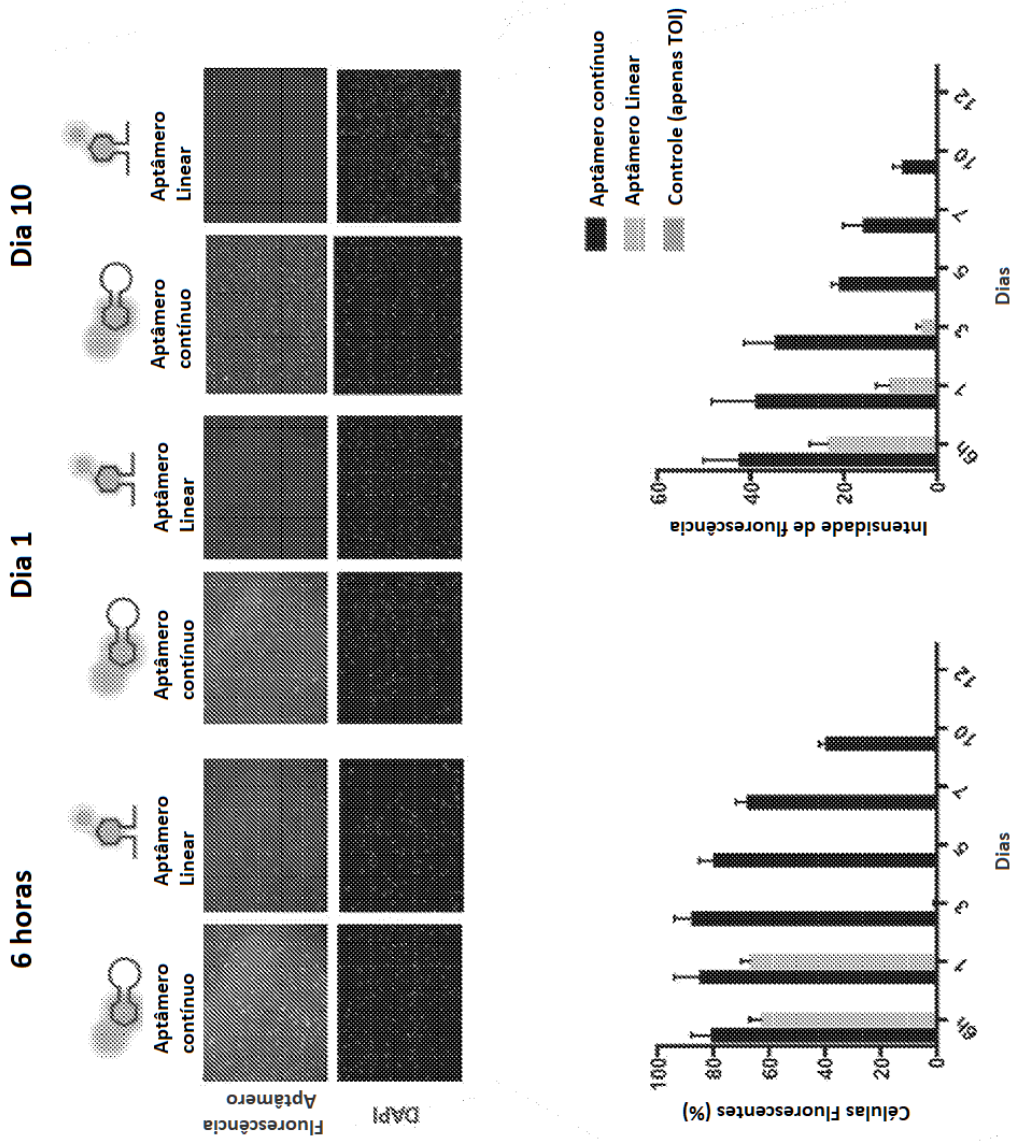


FIG. 22

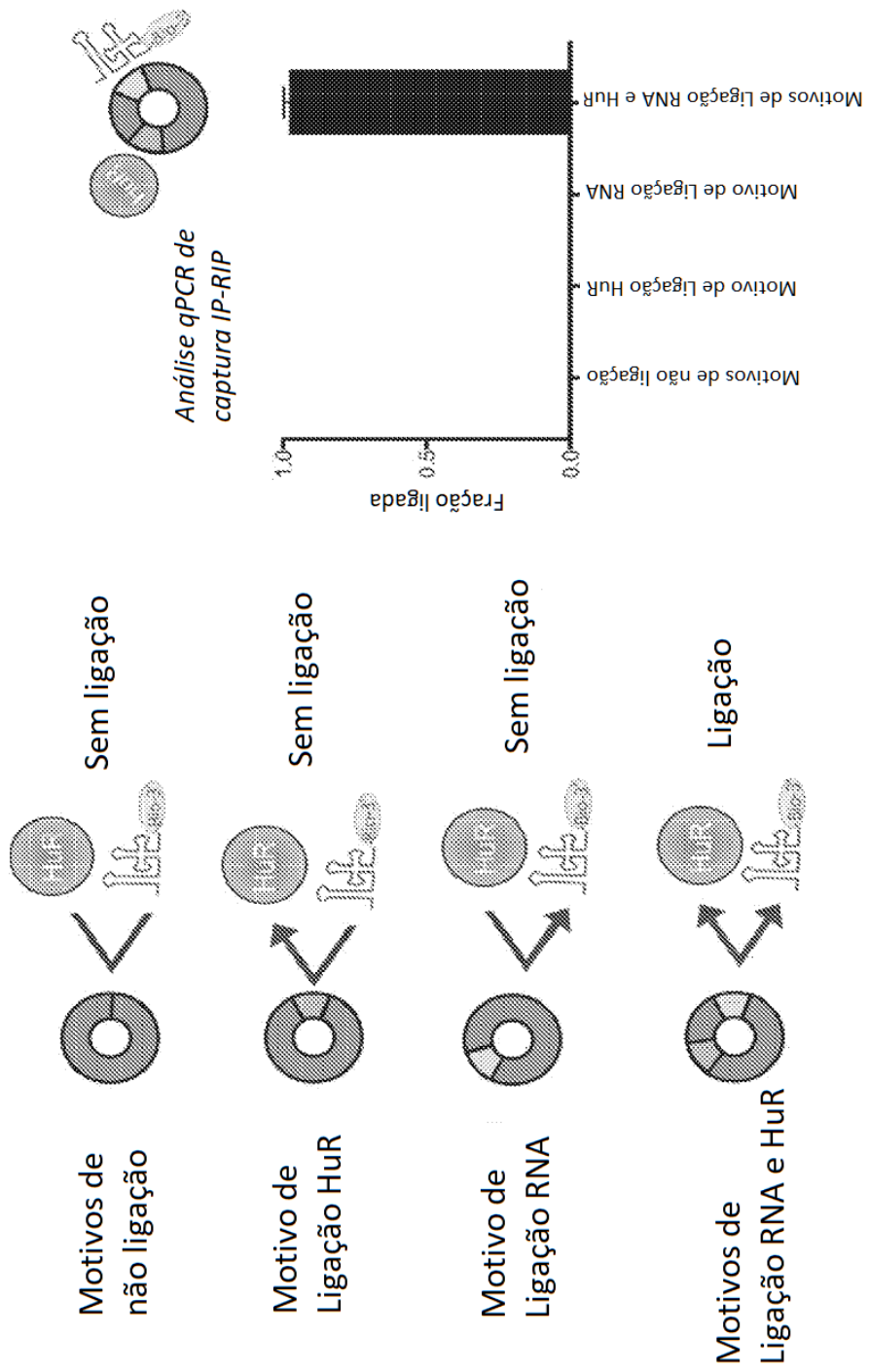


FIG. 23

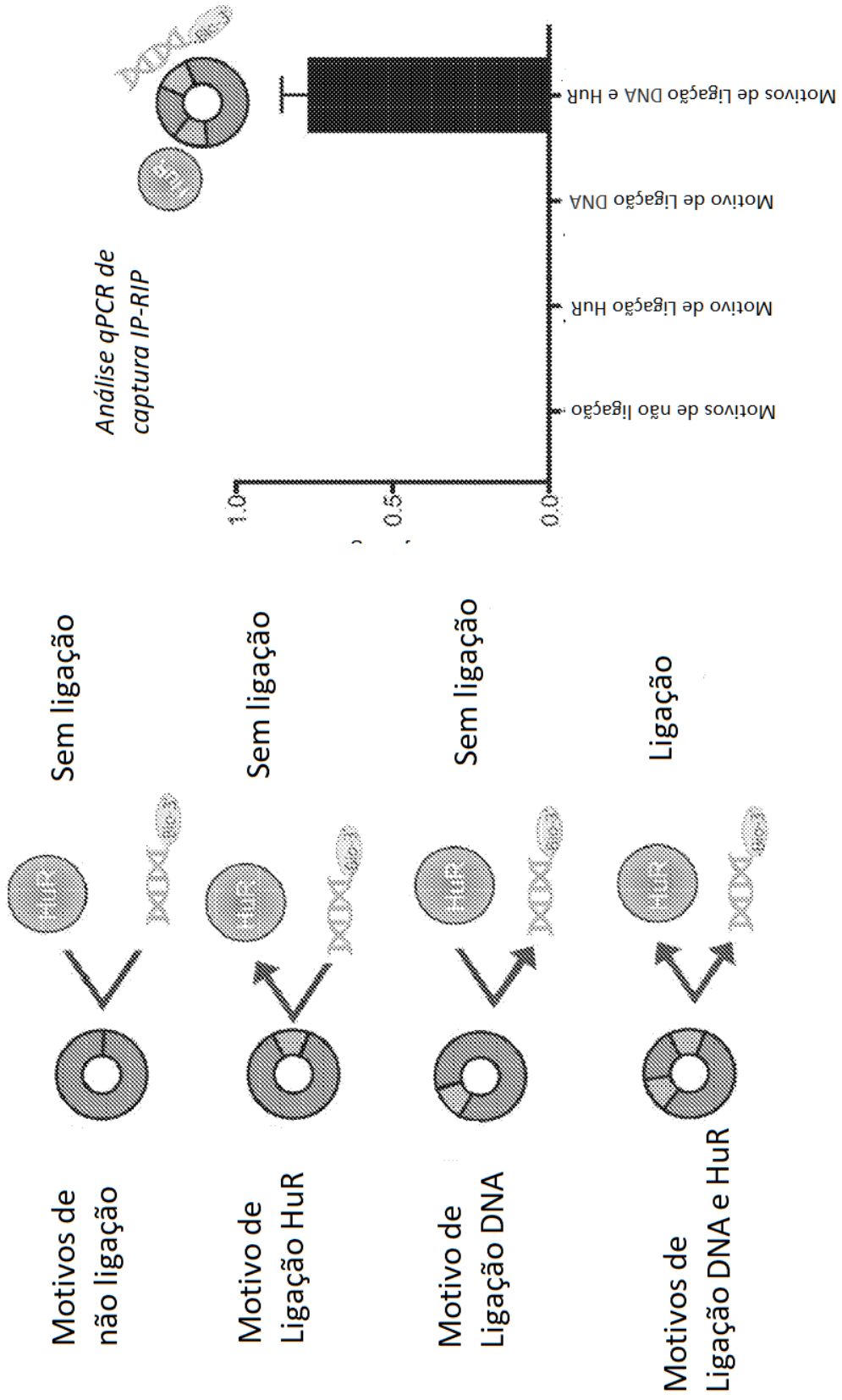


FIG. 24

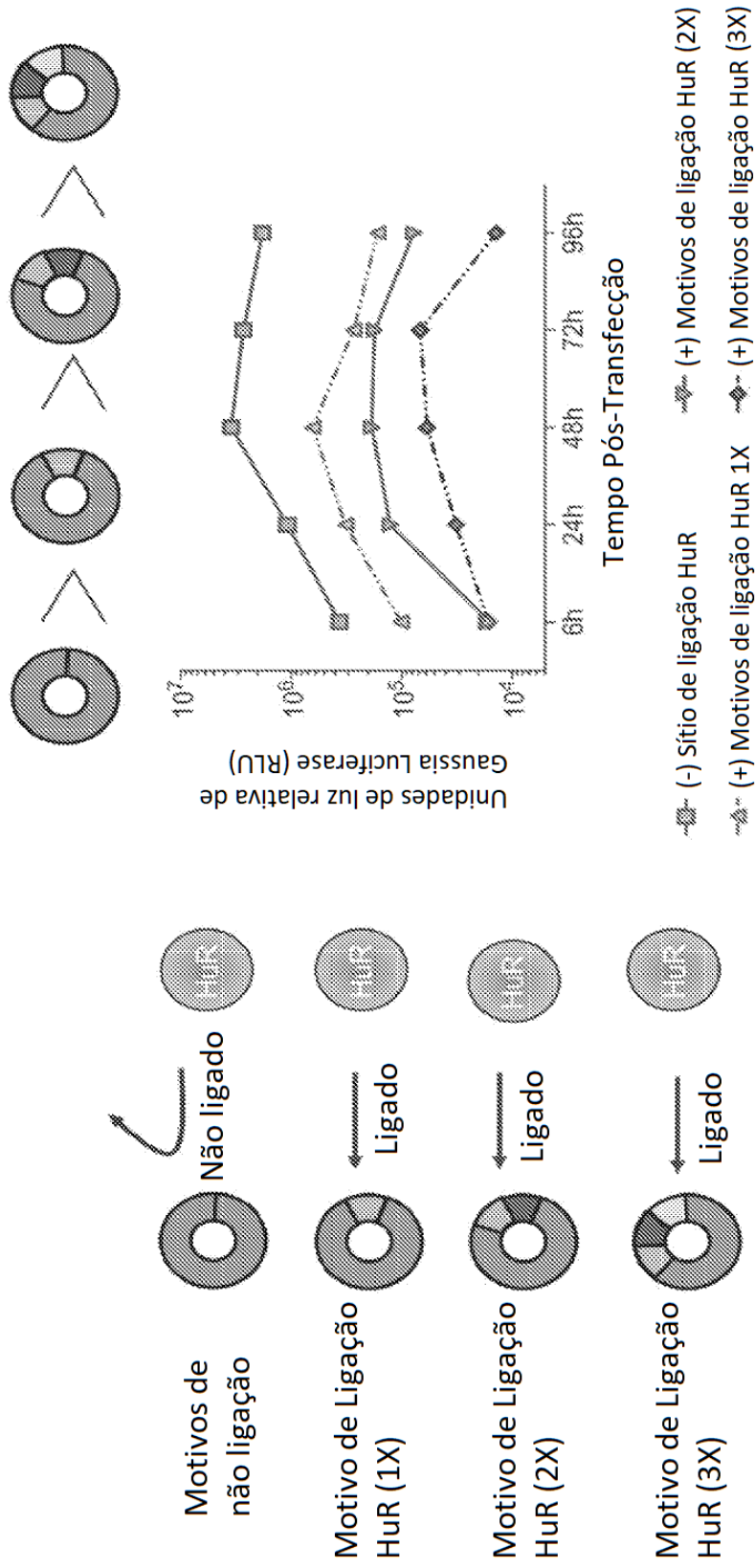


FIG. 25

Resumo

**COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO POLIRIBONUCLEOTÍDEOS CIRCULARES E
SEUS USOS**

Esta invenção se relaciona geralmente com composições farmacêuticas e preparações de polirribonucleotídeos circulares e seus usos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 1581395ENBR_Sequences.txt
- Data de Geração do Código: 02/03/2021
- Hora de Geração do Código: 15:15:54
- Código de Controle:
 - Campo 1: 31E1289ACF319807
 - Campo 2: C2B45FCC0E6BA0E9