



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

А61К 48/005 (2006.01); А61К 48/0066 (2006.01); С12N 15/88 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014129004, 14.12.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.12.2012Дата регистрации:
02.04.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.12.2011 US 61/576,705;
02.04.2012 US 61/618,957;
17.05.2012 US 61/648,244;
10.08.2012 US 61/681,712;
04.09.2012 US 61/696,381;
03.10.2012 US 61/709,303;
03.10.2012 US PCT/US2012/058519;
11.10.2012 US 61/712,490

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2016 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: 02.04.2018 Бюл. № 10

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.07.2014(86) Заявка РСТ:
US 2012/069610 (14.12.2012)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/090648 (20.06.2013)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ДЕ ФУЖЕРОЛЛЬ Антонин (BE),
ВУД Кристи М. (US),
ЭЛЬБАШИР Зайда М. (US),
АФЕЯН Ноубар Б. (US),
ВАЛЕНСИЯ Педро (US),
ШРАМ Джейсон П. (US)

(73) Патентообладатель(и):

МОДЕРНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: KARIKO K. et al. Incorporation of
pseudouridine into mRNA yields superior
nonimmunogenic vector with increased
translational capacity and biological stability,
Molecular Therapy, 2008, vol.16, No.11,
pp.1833-1840. ANDERSON BR et al.
Incorporation of pseudouridine into n mRNA
enhances translation by diminishing PKR
activation, Nucleic Acids (см. прод.)(54) СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО НУКЛЕОЗИДА, НУКЛЕОТИДА И
НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к
биотехнологии, в частности к композиции для
продукции целевого полипептида в клетке или
ткани млекопитающего и способу полученияуказанного полипептида в клетке или ткани
млекопитающего *in vitro* с применением такой
композиции. Указанная композиция содержит
состав в виде наночастиц, содержащих катионный

липид, фузогенный липид, холестерин и ПЭГ липид. Указанный состав содержит модифицированную мРНК, кодирующую целевой полипептид. Причём мРНК модифицируют таким образом, что уридин заменяют 1-

метилпсевдоуридином. Настоящее изобретение позволяет повысить эффективность доставки мРНК в целевую клетку и при этом снизить иммунный ответ. 2 н. и 12 з.п. ф-лы, 3 ил., 154 табл., 98 пр.

(56) (продолжение):

Research, 2010, vol.38, No.17, pp.5884-5892. WO 2008052770 A2, 10.10.2001. WO 2009127230 A1, 22.10.2009. EA 12833 B1, 30.12.2009.

R U 2 6 4 9 3 6 4 C 2

R U 2 6 4 9 3 6 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 48/005 (2006.01); *A61K 48/0066* (2006.01); *C12N 15/88* (2006.01)(21)(22) Application: **2014129004, 14.12.2012**(24) Effective date for property rights:
14.12.2012Registration date:
02.04.2018

Priority:

(30) Convention priority:
16.12.2011 US 61/576,705;
02.04.2012 US 61/618,957;
17.05.2012 US 61/648,244;
10.08.2012 US 61/681,712;
04.09.2012 US 61/696,381;
03.10.2012 US 61/709,303;
03.10.2012 US PCT/US2012/058519;
11.10.2012 US 61/712,490(43) Application published: **10.02.2016 Bull. № 4**(45) Date of publication: **02.04.2018 Bull. № 10**(85) Commencement of national phase: **16.07.2014**(86) PCT application:
US 2012/069610 (14.12.2012)(87) PCT publication:
WO 2013/090648 (20.06.2013)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**DE FUZHEROLL Antonin (BE),
VUD Kristi M. (US),
ELBASHIR Zajda M. (US),
AFEYAN Noubar B. (US),
VALENSIYA Pedro (US),
SHRAM Dzhejson P. (US)**

(73) Proprietor(s):

MODERNA THERAPYUTIKS, INK. (US)**(54) MODIFIED NUCLEOSIDE, NUCLEOTIDE AND NUCLEIC ACID COMPOSITIONS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention relates to a composition for the production of a target polypeptide in a mammalian cell or tissue and a method of producing said polypeptide in a mammalian cell or tissue in vitro with the use of such a composition. This composition contains a composition in the form of

nanoparticles, containing cationic lipid, fusogenic lipid, cholesterol and PEG lipid. This formulation contains a modified mRNA encoding the target polypeptide. Thus, mRNA is modified in such a way that the uridine is replaced with 1-methyl pseudouridine.

EFFECT: present invention makes it possible to increase the efficiency of delivery of mRNA to the

target cell and at the same time to reduce the immune response.

14 cl, 3 dwg, 154 tbl, 98 ex

R U 2 6 4 9 3 6 4 C 2 4 9 3 6 4

R U 2 6 4 9 3 6 4 C 2

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Настоящая заявка подана вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Файл с Перечнем последовательностей под названием M11PCTSQLST.txt, был создан 14 декабря 2012 года, и его размер составляет 25579 байт. Информация в электронном формате Перечня последовательностей включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] Настоящая заявка заявляет приоритет Предварительной заявки США №61/576705, поданной 16 декабря 2011 года, под названием «Составы на основе модифицированного нуклеозида, нуклеотида и нуклеиновой кислоты», Предварительной заявки США №61/618957, поданной 2 апреля 2012 года, под названием «Составы на основе модифицированного нуклеозида, нуклеотида и нуклеиновой кислоты», Предварительной заявки США №61/648244, поданной 17 мая 2012 года, под названием «Составы на основе модифицированного нуклеозида, нуклеотида и нуклеиновой кислоты», Предварительной заявки США №61/681712, поданной 10 августа 2012 года, под названием «Составы на основе модифицированного нуклеозида, нуклеотида и нуклеиновой кислоты», и Предварительной заявки США №61/696381, поданной 4 сентября 2012 года, под названием «Составы на основе модифицированного нуклеозида, нуклеотида и нуклеиновой кислоты», Предварительной заявки США №61/709303, поданной 3 октября 2012 года, под названием «Составы на основе модифицированного нуклеозида, нуклеотида и нуклеиновой кислоты», Предварительной заявки США №61/712490, поданной 11 октября 2012 года, под названием «Составы на основе модифицированного нуклеозида, нуклеотида и нуклеиновой кислоты», и Международной публикации PCT/US 2012/058519, поданной 3 октября 2012 года, под названием «Модифицированные нуклеозиды, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты, и их применение», содержание которых включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] В общем, экзогенные немодифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, конкретно нуклеиновые кислоты вирусов, введенные в клетку, индуцируют природный иммунный ответ, что приводит к выработке цитокинов и интерферона (EFN) и, в конечном итоге, к гибели клетки. Большой интерес в сфере терапевтического, диагностического применения, реагентов и биологических анализов представляет возможность доставлять нуклеиновую кислоту, например, рибонуклеиновую кислоту (РНК), в клетку, например, вызывать внутриклеточную трансляцию нуклеиновой кислоты и выработку кодируемого белка вместо генерации природного иммунного ответа. Таким образом, существует потребность в создании составов препаратов, содержащих агент доставки, который может эффективно облегчать доставку нуклеиновых кислот *in vivo* в целевые клетки, без генерации природного иммунного ответа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В настоящем описании раскрываются, среди прочего, составы препаратов, содержащих модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые могут кодировать белок, прекурсор белка или частично или полностью процессированную форму белка или прекурсора белка. Составы препаратов могут дополнительно содержать модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты и агент доставки. В настоящем изобретении дополнительно раскрываются нуклеиновые кислоты, пригодные для кодирования полипептидов, способных модулировать клеточную функцию и/или

активность.

[0005] В одном из аспектов раскрывается способ выработки целевого полипептида в клетке или ткани млекопитающего. Способ включает приведение клетки или ткани млекопитающего в контакт с препаратом, содержащим модифицированную мРНК, кодирующую целевой полипептид. Препарат может представлять собой, без ограничений, наночастицы, микросферы поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (ПМГК), липидоиды, липоплекс, липосому, полимеры, углеводы (в том числе, простые сахара), катионные липиды, фибриновый гель, фибриновый гидрогель, фибриновый клей, фибриновый герметик, фибриноген, тромбин, быстро элиминирующиеся липидные наночастицы (бэЛНЧ) и их комбинации. Модифицированная мРНК может содержать очищенный IVT транскрипт.

[0006] В одном варианте реализации состав, содержащий модифицированную мРНК, представляет собой наночастицу, которая может содержать по меньшей мере один липид. Липид может быть выбран из, без ограничений, ДЛин-ДМА, ДЛин-К-ДМА, 98N12-5, С12-200, ДЛин-МС3-ДМА, ДЛин-КС2-ДМА, ДОДМА, ПМГК, ПЭГ, ПЭГ-ДМГ и пегилированных липидов. В другом аспекте липид может представлять собой катионный липид, такой как, без ограничений, ДЛин-ДМА, ДЛин-D-ДМА, ДЛин-МС3-ДМА, ДЛин-КС2-ДМА и ДОДМА.

[0007] Соотношение липида к модифицированной мРНК в составе может составлять от 10:1 до 30:10. Средний размер наночастицы препарата, которая может содержать модифицированную мРНК, составляет от 60 до 225 нм. ИПД наночастиц препарата, содержащего модифицированную мРНК, составляет от 0,03 до 0,15. Зета потенциал липида при pH 7,4 может составлять от -10 до +10.

[0008] Препараты модифицированной мРНК могут содержать фузогенный липид, холестерин и ПЭГ липид. Препарат может содержать молярное соотношение 50:10:38,5:1,5-3,0 (катионный липид:фузогенный липид:холестерин:ПЭГ липид). ПЭГ липид может быть выбран из, без ограничений ПЭГ-к-ДМПО, ПЭГ-ДМГ. Фузогенный липид может представлять собой ДСФХ.

[0009] Приведение в контакт клетки или ткани млекопитающего может быть осуществлено с использованием устройства, например, без ограничений, шприцевого насоса, внутреннего осмотического насоса и внешнего осмотического насоса.

[0010] Препарат модифицированной мРНК может представлять собой микросферы ПМГК, размер которых может составлять от 4 до 20 мкм. Модифицированная мРНК высвобождаться из состава со скоростью менее 50% за период 48 часов. Препарат микросфер ПМГК может быть стабильным в сыворотке. Стабильность можно определить как 90% относительно свободной модифицированной мРНК.

[0011] Массовый процент нагрузки микросфер ПМГК модифицированной мРНК может составлять по меньшей мере 0,05%, по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 0,2%, по меньшей мере 0,3%, по меньшей мере 0,4% или по меньшей мере 0,5%. Эффективность инкапсуляции модифицированной мРНК в микросферы ПМГК может составлять по меньшей мере 50%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 97%.

[0012] Липидная наночастица по настоящему изобретению может быть введена в герметик, например, без ограничений, фибриновый герметик.

[0013] Клетки или ткани млекопитающих могут быть приведены в контакт с помощью способа введения, такого как, без ограничений, внутривенный, внутримышечный, в стекловидное тело, интратекальный, в опухоль, легочный и подкожный. Клетки или ткани млекопитающих могут быть приведены в контакт с использованием схемы

разделенных доз. Клетка или ткань млекопитающего может быть приведена в контакт посредством инъекции. Инъекция может быть осуществлена в ткань, выбранную из группы, состоящей из: внутрикожного пространства, эпидермиса, подкожной ткани и мышцы. Целевой полипептид может вырабатываться в клетке или ткани, в системной
5 локализации от места контакта.

[0014] Целевой полипептид может обнаруживаться в сыворотке через 72 часа после контакта. Уровень целевого полипептида может быть выше, чем уровни до введения дозы. Уровень целевого полипептида может быть выше в сыворотке субъектов женского пола, чем в сыворотке субъектов мужского пола.

10 [0015] Препарат модифицированной мРНК может содержать более одной модифицированной мРНК. Препарат может содержать две или три модифицированных мРНК.

[0016] Препарат, содержащий модифицированную мРНК, может содержать быстро элиминирующуюся липидную наночастицу (бэЛНЧ), которая может содержать бэЛНЧ
15 липид, фузогенный липид, холестерин и ПЭГ липид в молярном соотношения 50:10:38,5:1,5 (бэЛНЧ липид:фузогенный липид:холестерин:ПЭГ липид). Фузогенный липид может представлять собой ДСФХ, и ПЭГ липид может представлять собой ПЭГ-к-ДМПО. бэЛНЧ липид может представлять собой ДЛин-ДМА с внутренней или концевой эфирной группой или ДЛин-МС3-ДМА с внутренней или концевой эфирной группой.
20 Массовое соотношение общего липида к модифицированной мРНК может составлять от 10:1 до 30:1.

[0017] Препарат, содержащий модифицированную мРНК, может содержать фибриновый герметик.

[0018] Препарат, содержащий модифицированную мРНК, может содержать липидоид,
25 в котором липид выбран из группы, состоящей из: С12-200 и 98N12-5.

[0019] Препарат, содержащий модифицированную мРНК, может содержать полимер. Полимер может быть покрыт, окружен, охвачен, вложен или содержать слой гидрогеля или хирургического герметика. Полимер может быть выбран из группы, состоящей из: ПМГК, этиленвинилацетата, полоксамера и GELSITE®.

30 [0020] Целевой полипептид может вырабатываться в клетке или ткани млекопитающего посредством приведения в контакт клетки или ткани млекопитающего с буферным препаратом, содержащим модифицированную мРНК, кодирующую целевой полипептид. Буферный препарат может быть выбран из, без ограничений, раствора соли, буферизованного фосфатом солевого раствора и раствора Рингера с лактатом.
35 Буферный препарат может содержать кальций в концентрации от 1 до 10 мМ. Модифицированная мРНК в буферном препарате может содержать очищенный IVT транскрипт.

[0021] Фармакологический эффект у приматов может быть достигнут посредством приведения примата в контакт с составом, содержащим модифицированную мРНК,
40 кодирующую целевой полипептид. Модифицированная мРНК может содержать очищенный IVT транскрипт и/или может быть введена в наночастицы, микросферы поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (ПМГК), липидоиды, липоплекс, липосому, полимеры, углеводы (в том числе, простые сахара), катионные липиды, фибриновый гель, фибриновый гидрогель, фибриновый клей, фибриновый герметик, фибриноген,
45 тромбин, быстро элиминирующиеся липидные наночастицы (бэЛНЧ) и их комбинации. Фармакологический эффект может быть более фармакологическим эффектом, связанным с терапевтическим агентом и/или составом, который доказанно вызывает указанный фармакологический эффект. Состав может содержать модифицированную

мРНК, в лекарственной форме или свободную. Результатом фармакологического эффекта может быть терапевтически эффективный исход заболевания, расстройства, состояния или инфекции. Такой терапевтически эффективный исход может включать, без ограничений, лечение, улучшение одного или более симптомов, диагностику, предупреждение и задержку развития. Фармакологический эффект может включать, без ограничений, изменение количества клеток, изменение химических показателей сыворотки, изменение активности фермента, повышение уровня гемоглобина и гематокрита.

[0022] В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагается состав препарата, который содержит модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты и агент доставки. Модифицированная молекула нуклеиновой кислоты может быть выбрана из группы, состоящей из: ДНК, комплементарной ДНК (кДНК), РНК, матричной РНК (мРНК), индуцирующих иРНК агентов, иРНК агентов, миРНК, РНК-шпильки, миРНК, антисмысловой РНК, рибозимов, каталитической ДНК, РНК, которая индуцирует образование тройной спирали, аптамеров, векторов и их комбинаций. Если модифицированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК, то мРНК может быть получена из кДНК.

[0023] В одном варианте реализации модифицированная молекула нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере одну модификацию и транскрибируемый участок. В некоторых случаях, модифицированная нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере две модификации и транскрибируемый участок. Модификация может быть расположена на скелете и/или нуклеозиде молекулы нуклеиновой кислоты. Модификация может быть расположена на связи нуклеозида и скелета.

[0024] В одном варианте реализации модификация может находиться на скелетной связи в модифицированной молекуле нуклеиновой кислоты. Скелетная связь может быть модифицирована заменой одного или более атомов кислорода. Модификация скелетной связи может включать замену по меньшей мере одной фосфодиэфирной связи фосфоротиоатной связью.

[0025] В одном варианте реализации модификация может находиться в нуклеозиде модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты. Модификация в нуклеозиде может находиться в сахарном фрагменте указанного нуклеозида. Модификация нуклеозида может находиться в положении 2' нуклеозида.

[0026] Модификация нуклеозида может включать соединение, выбранное из группы, состоящей из: пиридин-4-он рибонуклеозида, 5-аза-уридина, 2-тио-5-аза-уридина, 2-тиоуридина, 4-тио-псевдоуридина, 2-тио-псевдоуридина, 5-гидроксиуридина, 3-метилуридина, 5-карбоксиметил-уридина, 1-карбоксиметил-псевдоуридина, 5-пропинил-уридина, 1-пропинил-псевдоуридина, 5-тауринометилуридина, 1-тауринометил-псевдоуридина, 5-тауринометил-2-тио-уридина, 1-тауринометил-4-тио-уридина, 5-метил-уридина, 1-метил-псевдоуридина, 4-тио-1-метил-псевдоуридина, 2-тио-1-метил-псевдоуридина, 1-метил-1-дезаза-псевдоуридина, 2-тио-1-метил-1-дезаза-псевдоуридина, дигидроуридина, дигидропсевдоуридина, 2-тио-дигидроуридина, 2-тио-дигидропсевдоуридина, 2-метоксиуридина, 2-метокси-4-тио-уридина, 4-метокси-псевдоуридина, 4-метокси-2-тио-псевдоуридина, 5-аза-цитидина, псевдоизоцитидина, 3-метил-цитидина, N4-ацетилцитидина, 5-формилцитидина, N4-метилцитидина, 5-гидроксиметилцитидина, 1-метил-псевдоизоцитидина, пирроло-цитидина, пирроло-псевдоизоцитидина, 2-тио-цитидина, 2-тио-5-метил-цитидина, 4-тио-псевдоизоцитидина, 4-тио-1-метил-псевдоизоцитидина, 4-тио-1-метил-1-дезаза-псевдоизоцитидина, 1-метил-1-дезаза-псевдоизоцитидина, зебуларина, 5-аза-зебуларина, 5-метил-зебуларина, 5-аза-

2-тио-зебуларина, 2-тио-зебуларина, 2-метокси-цитидина, 2-метокси-5-метил-цитидина, 4-метокси-псевдоизоцитидина, 4-метокси-1-метил-псевдоизоцитидина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина, 7-дезаза-аденина, 7-дезаза-8-аза-аденина, 7-дезаза-2-аминопурина, 7-дезаза-8-аза-2-аминопурина, 7-дезаза-2,6-диаминопурина, 7-дезаза-8-аза-2,6-диаминопурина, 1-метиладенозина, N6-метиладенозина, N6-изопентениладенозина, N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозина, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозина, N6-глицинилкарбамоиладенозина, N6-треонилкарбамоиладенозина, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозина, N6,N6-диметиладенозина. 7-метиладенина, 2-метилтио-аденина, 2-метокси-аденинаинозина, 1-метил-инозина, виозина, вибутозина, 7-дезаза-гуанозина, 7-дезаза-8-аза-гуанозина, 6-тио-гуанозина, 6-тио-7-дезаза-гуанозина, 6-тио-7-дезаза-8-аза-гуанозина, 7-метил-гуанозина, 6-тио-7-метил-гуанозина, 7-метилюинозина, 6-метокси-гуанозина, 1-метилгуанозина, N2-метилгуанозина, N2,N2-диметилгуанозина, 8-оксо-гуанозина, 7-метил-8-оксо-гуанозина, 1-метил-6-тио-гуанозина, N2-метил-6-тио-гуанозина и N2,N2-диметил-6-тио-гуанозина. В другом варианте реализации модификации независимо выбраны из группы, состоящей из: 5-метилцитозина, псевдоуридина и 1-метилпсевдоуридина

[0027] В одном варианте реализации модификация может находиться в нуклеиновом основании модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты. Модификация нуклеинового основания может быть выбрана из группы, состоящей из: цитозина, гуанина, аденина, тимина и урацила. Модификация нуклеинового основания может быть выбрана из группы, состоящей из дезаза-аденозина и дезаза-гуанозина, и линкер может быть присоединен в положении С-7 или С-8 указанного дезаза-аденозина или дезаза-гуанозина. Модифицированное нуклеиновое основание может быть выбрано из группы, состоящей из: цитозина и урацила, и линкер может быть присоединен к модифицированному нуклеиновому основанию в положении N-3 или С-5. Линкер, присоединенный к нуклеиновому основанию, может быть выбран из группы, состоящей из: диэтиленгликоля, дипропиленгликоля, триэтиленгликоля, трипропиленгликоля, тетраэтиленгликоля, тетраэтиленгликоля, двухвалентного алкила, алкенила, алкинильного фрагмента, сложного эфира, амида и эфирного фрагмента.

[0028] В одном варианте реализации две модификации молекулы нуклеиновой кислоты могут быть расположены на нуклеозидах модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты. Модифицированные нуклеозиды могут быть выбраны из 5-метилцитозина и псевдоуридина.

[0029] В одном варианте реализации две модификации модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты могут быть расположены на нуклеотиде или нуклеозиде. В одном варианте реализации настоящего изобретения раскрывается препарат, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, например, без ограничений, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, и фрагмент агента. Молекула нуклеиновой кислоты может содержать поли-А хвост длиной приблизительно 160 нуклеотидов. Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере один 5' концевой кэп, например, без ограничений, Кэп 0, Кэп 1, ARCA, инозин, N1-метил-гуанозин, 2'-фтор-гуанозин, 7- дезаза-гуанозин, 8-оксо-гуанозин, 2-амино-гуанозин, ЦНК-гуанозина и 2-азидо-гуанозина.

[0030] В одном варианте реализации настоящего изобретения раскрывается нуклеиновая кислота SEQ ID NO: 6, 5' концевой кэп в которой представляет собой Кэп 1, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов и агент доставки.

[0031] В одном варианте реализации настоящего изобретения раскрывается нуклеиновая кислота SEQ ID NO: 7, 5' концевой кэп в которой представляет собой Кэп

1, поли-А хвост длиной приблизительно 160 нуклеотидов и агент доставки.

[0032] В одном варианте реализации настоящего изобретения раскрывается нуклеиновая кислота SEQ ID NO: 9, 5' концевой кэп в которой представляет собой Кэп 1, поли-А хвост длиной приблизительно 160 нуклеотидов и агент доставки.

5 [0033] В одном варианте реализации настоящего изобретения раскрывается нуклеиновая кислота SEQ ID NO: 10, 5' концевой кэп в которой представляет собой Кэп 1, поли-А хвост длиной приблизительно 160 нуклеотидов и агент доставки.

[0034] В одном варианте реализации агент доставки включает по меньшей мере один способ повышения эффективности доставки, выбранный из группы, состоящей из:
10 липидоидов, липосом, липидных наночастиц, быстро элиминирующихся липидных наночастиц (бЭЛНЧ), полимеров, липоплексов, пептидов, белков, гидрогелей, герметиков, химических модификаций, конъюгации, клеток и усилителей. Липидоид, липидная наночастица и быстро элиминирующиеся липидные наночастицы, которые могут быть использованы в качестве агентов доставки, могут содержать липид, который
15 может быть выбран из группы, состоящей из: C12-200, MD1, 98N12-5, ДЛин-ДМА, ДЛин-К-ДМА, ДЛИН-КС2-ДМА, ДЛин-МС3-ДМА, ПМГК, ПЭГ, ПЭГ-ДМГ, пегилированных липидов и их аналогов. Быстро элиминирующаяся липидная наночастица может содержать сложноэфирную связь на конце липидной цепи, или сложноэфирная связь может представлять собой внутреннюю связь, расположенную
20 справа или слева от насыщенного атома углерода в липидной цепи. Быстро элиминирующаяся липидная наночастица, которая может быть использована в качестве агента доставки, может представлять собой, без ограничений, ДЛин-МС3-ДМА и ДЛин-ДМА.

[0035] В одном варианте реализации липидная наночастица может содержать ПЭГ
25 и по меньшей мере один компонент, такой как, без ограничений, холестерин, катионный липид и фузогенный липид.

[0036] В одном варианте реализации липидная наночастица может содержать по меньшей мере один из ПЭГ, холестерина, катионного липида и фузогенного липида.

[0037] В одном варианте реализации фузогенный липид представляет собой
30 дистероилфосфатидилхолин (ДСФХ). В другом варианте реализации ПЭГ липид представляет собой ПЭГ-ДМГ. В еще одном варианте реализации катионный липид может представлять собой, без ограничений, ДЛин-ДМА, ДЛин-МС3-ДМА, C12-200, 98N12-5 и ДЛин-КС2-ДМА.

[0038] В одном варианте реализации состав липидной наночастицы может включать
35 50 моль % катионного липида, 10 моль % ДСФХ, 1,5-3,0 моль % ПЭГ и 37-38,5 моль % холестерина.

[0039] В одном варианте реализации модифицированная нуклеиновая кислота может быть введена в состав вместе с ПМГК с получением препарата с замедленным высвобождением. В другом варианте реализации модифицированная нуклеиновая
40 кислота может быть введена в состав вместе с ПМГК и другими активными и/или неактивными компонентами с получением препарата с замедленным высвобождением. В одном варианте реализации модифицированная молекула нуклеиновой кислоты может включать, без ограничений, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

[0040] В одном варианте реализации препарат с замедленным высвобождением может
45 включать микросферу с замедленным высвобождением. Диаметр микросферы с замедленным высвобождением может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 50 мкм. В другом варианте реализации микросфера с замедленным высвобождением может содержать от приблизительно 0,001 до приблизительно 1,0%

масс по меньшей мере одной модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты.

[0041] В одном варианте реализации модифицированные нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере один стоп-кодон перед 3' нетранслируемым участком (НТУ). Стоп-кодон может быть выбран из TGA, TAA и TAG. В одном варианте реализации модифицированные нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению содержат стоп-кодон TGA и один дополнительный стоп-кодон. В другом варианте реализации дополнительный стоп-кодон может представлять собой TAA. В другом варианте реализации модифицированная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению содержит три стоп-кодона.

[0042] В одном варианте реализации настоящего изобретения раскрывается препарат с контролируемым высвобождением, содержащий модифицированную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать целевой полипептид. Модифицированная нуклеиновая кислота может быть инкапсулирована или в значительной степени инкапсулирована в агент доставки. Агент доставки может быть покрыт, охвачен, окружен, включен или содержать слой полимера, гидрогеля и/или хирургического герметика. В дополнительном варианте реализации препарат с контролируемым высвобождением может содержать второй слой полимера, гидрогеля и/или хирургического герметика.

[0043] В одном варианте реализации агент доставки в препарате с контролируемым высвобождением может содержать, без ограничений, липидоиды, липосомы, липидные наночастицы, быстро элиминирующиеся липидные наночастицы, липоплексы и самособирающиеся липидные наночастицы.

[0044]

[0045] Полимер, который может быть использован в препарате с контролируемым высвобождением, может включать, без ограничений, ПМГК, этиленвинилацетат, полоксамер и GELSITE®. Хирургический герметик, который может быть использован в препарате с контролируемым высвобождением, может включать, без ограничений, полимеры фибриногена, TISSEEL®, герметики на основе ПЭГ и COSEAL®.

[0046] В одном варианте реализации агент доставки в препарате с контролируемым высвобождением включает агент доставки в форме липидной наночастицы или быстро элиминирующейся липидной наночастицы. В одном из аспектов, липидная наночастица или быстро элиминирующиеся липидная наночастица может быть покрыта, в значительной степени покрыта, охвачена, в значительной степени охвачена, окружена, в значительной степени окружена, включена, в значительной степени включена или может содержать слой полимера, гидрогеля и/или хирургического герметика. В другом аспекте агент доставки может представлять собой липидную наночастицу, которая может быть покрыта, охвачена, в значительной степени охвачена, окружена, в значительной степени окружена, включена, в значительной степени включена или может содержать слой ПМГК.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0047] Раскрытые выше и другие объекты, признаки и преимущества будут очевидными из нижеследующего описания конкретных вариантов изобретения, как проиллюстрировано на сопроводительных фигурах, где подобные обозначения указывают на одни и те же части в различных проекциях. Фигуры не нуждаются с масштабировании, скорее акцент поставлен на иллюстрации принципов различных вариантов реализации изобретения.

[0048] Фиг. 1 иллюстрирует липидные структуры из уровня техники, пригодные для данного изобретения. Проиллюстрированы структуры 98N12-5 (TETA5-LAP), ДЛин-

ДМА, ДЛин-К-ДМА (2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан), ДЛин-КС2-ДМА, ДЛин-МС3-ДМА и С12-200.

[0049] Фиг. 2 иллюстрирует характерную плазмиду, пригодную для реакций IVT, раскрытых в настоящем документе. Плазида содержит вставку 64818, сконструированную изобретателями настоящего изобретения.

[0050] Фиг. 3 иллюстрирует профиль в геле модифицированной мРНК, инкапсулированной в микросферы ПМГК.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0051] Доставка нуклеиновых кислот в клетки сопровождается множеством нежелательных осложнений, в том числе, интеграцией нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени, что может приводить к неопределенным уровням экспрессии, вредоносной передаче нуклеиновой кислоты потомству и соседним клеткам и значительному риску мутаций. Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим документом способны снижать природную иммунную активность популяции клеток, в которые они введены, таким образом, повышая эффективность выработки белка в указанной популяции клеток. Кроме того, в настоящем документе раскрыты один или более дополнительных предпочтительных видов активности и/или свойств нуклеиновых кислот и белков в соответствии с настоящим документом.

[0052] Дополнительно, в настоящем документе раскрыты способы лечения субъекта с диагностированным или предполагаемым заболеванием, расстройством и/или состоянием, причем способы включают введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, состава, раскрытого в настоящем документе, в количестве, достаточном для лечения заболевания, расстройства и/или состояния.

[0053] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, как обычно понимается средним специалистом в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя материалы и методы, подобные или эквивалентные раскрытым в настоящем документе, могут применяться в практике или тестировании способов, раскрытых в изобретении, пригодные материалы и методы раскрыты ниже.

Модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты

[0054] В настоящем изобретении раскрываются нуклеиновые кислоты, в том числе, РНК, например, мРНК, которые содержат один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов (называются «модифицированными молекулами нуклеиновой кислоты» «модифицированными мРНК» или «модифицированными молекулами мРНК»), как раскрыто в настоящем документе. Модификация молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может придавать полезные свойства, в том числе, без ограничений, значительное снижение или отсутствие значимого природного иммунного ответа клетки, в которую введена модифицированная мРНК.

Модифицированные молекулы нуклеиновых кислот также могут демонстрировать повышенную эффективность выработки белка, внутриклеточного удерживания нуклеиновых кислот и жизнеспособность приведенных в контакт клеток, а также сниженную иммуногенность по сравнению с немодифицированными молекулами нуклеиновой кислоты.

[0055] Раскрыты модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие транскрибируемый участок и одну, две или более двух различных модификаций нуклеозидов. В качестве примера, нуклеиновые кислоты для использования в практике настоящего изобретения включают рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые

кислоты (ДНК), треозонуклеиновые кислоты (ТНК), гликольнуклеиновые кислоты (ГНК), циклические нуклеиновые кислоты (ДНК) или их гибриды. В предпочтительных вариантах реализации, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты включают матричную РНК (мРНК). Как раскрыто в настоящем документе, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим документом могут в значительной степени не индуцировать природный иммунный ответ клетки, в которую введена модифицированная мРНК. В другом варианте реализации модифицированная молекула нуклеиновой кислоты может демонстрировать уменьшенное разложение, по сравнению с немодифицированной нуклеиновой кислотой, в клетке, куда введена модифицированная молекула нуклеиновой кислоты.

[0056] Термин «нуклеиновая кислота» включает любое соединение и/или вещество, которое инкорпорировано или может быть инкорпорировано в олигонуклеотидную цепь. В качестве примера, нуклеиновые кислоты для применения в соответствии с настоящим документом включают, без ограничений, одну или более ДНК, кДНК, РНК, в том числе, матричную РНК (мРНК), их гибриды, индуцирующие иРНК агенты, иРНК агенты, миРНК, РНК-шпильку, миРНК, антисмысловые РНК, рибозимы, каталитическую ДНК, РНК, которая индуцирует образование тройной спирали, аптамеры, векторы и т.п.

[0057] В некоторых вариантах реализации желательным является внутриклеточное разложение модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, введенной в клетку. Например, было бы желательным разложение модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, если желательной является выработка белка в пределах точного интервала времени. Таким образом, в настоящем изобретении предлагается модифицированная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая домен разложения, способный действовать направленным образом в пределах клетки.

[0058] В некоторых вариантах реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты могут быть химически модифицированы в остатке сахара, нуклеинового основания {например, в положении 5' нуклеинового основания) или фосфатном скелете (например, замена фосфата другим фрагментом, таким как тиофосфат). В некоторых вариантах реализации модификация может приводить к нарушению взаимодействия с основным партнером бороздки по связыванию, что может способствовать природному иммунному ответу. В некоторых вариантах реализации состав препарата при введении субъекту может приводить к улучшению биодоступности, терапевтического окна или объема распределения модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, по сравнению с введением модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты без инкорпорации агента доставки. В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды модифицированных молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть синтезированы с использованием О-защищенных соединений, раскрытых в Международной публикации WO 2012138530, содержание которой включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[0059] В некоторых вариантах реализации модифицированная молекула нуклеиновой кислоты может содержать мРНК. В конкретных вариантах реализации модифицированная мРНК (ммРНК) может происходить от кДНК. В некоторых вариантах реализации ммРНК может содержать по меньшей мере две модификации нуклеозидов. В одном варианте реализации модификации нуклеозидов могут быть выбраны из 5-метилцитозина и псевдоуридина. В другом варианте реализации по меньшей мере одна из модификаций нуклеозидов не является 5-метилцитозином и/или псевдоуридином. В некоторых вариантах реализации агент доставки может включать

препараты, позволяющие локальную и системную доставку мРНК. Препараты модифицированных молекул нуклеиновых кислот и/или мРНК могут быть выбраны из, без ограничений, липидоидов, липосом и липидных наночастиц, быстро элиминирующихся липидных наночастиц, полимеров, липоплексов, пептидов и белков, по меньшей мере одной химической модификации и конъюгации, усилителей и/или клеток.

[0060] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере два стоп-кодона перед 3' нетранслируемым участком (НТУ). Стоп-кодон может быть выбран из TGA, TAA и TAG. В одном варианте реализации нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению содержат стоп-кодон TGA и один дополнительный стоп-кодон. В другом варианте реализации дополнительный стоп-кодон может представлять собой TAA. В другом варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты могут содержать три стоп-кодона.

[0061] Другие компоненты нуклеиновой кислоты являются необязательными в модифицированной молекуле нуклеиновой кислоты, но данные компоненты могут быть предпочтительными в некоторых вариантах.

Нетранслируемые участки (НТУ)

[0062] Нетранслируемые участки (НТУ) гена транскрибируются, но не транслируются. 5' НТУ начинается на сайте инициации транскрипции и продолжается до старт-кодона, но не включает старт-кодон; тогда как 3' НТУ начинается непосредственно после стоп-кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. В настоящее время появляется все больше доказательств регуляторных ролей НТУ в том, что касается стабильности молекулы нуклеиновой кислоты и трансляции. Регуляторные признаки НТУ могут быть введены в модифицированные молекулы мРНК по настоящему изобретению для повышения стабильности молекулы. Конкретные признаки также могут быть введены для обеспечения контролируемой регуляции вниз транскрипта в случае, если он ошибочно направлен на нежелательные органы-мишени.

5' НТУ и инициация трансляции

[0063] Природные 5' НТУ несут признаки, которые играют роль в инициации трансляции. Они содержат сигнатуры по типу последовательности Козака, которые, как широко известно, принимают участие в процессе инициации рибосомой трансляции многих генов. Последовательности Козака содержат консенсус CCR(A/G)CCAUGG (SEQ ID NO: 1), в котором R представляет собой пурин (аденин или гуанин), на три остатка основания отстоящий в направлении 5' от старт-кодона (AUG), за которым следует другой остаток «G». Кроме того, известно, что 5' НТУ образует вторичные структуры, которые принимают участие в связывании с фактором удлинения.

[0064] Путем конструирования признаков, обычно находимых в обильно экспрессирующихся генах конкретных органов-мишеней, можно повысить стабильность и выработку белка модифицированными молекулами мРНК по изобретению. Например, введение 5' НТУ экспрессируемой в печени мРНК, например, альбумина, сывороточного амилоида А, Аполипопротеина А/В/Е, трансферрина, альфа-фетопропротеина, эритропоэтина или Фактора VIII, может применяться для повышения экспрессии модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, такой как мРНК, в линиях гепатоцитов или печени. Подобным образом, применение 5' НТУ, происходящего от любой тканеспецифичной мРНК, с целью повышения экспрессии в указанной ткани, возможно для мышцы (MyoD, миозин, миоглобин, миогенин, геркулин), для эндотелиальных клеток (Tie-1, CD36), для миелоидных клеток (C/EBP, AML1, G-CSF,

GM-CSF, CD11b, MCR, Fr-1, i-NOS), для лейкоцитов (CD45, CD18), для жировой ткани (CD36, GLUT4, ACRP30, адипонектин) и для эпителиальных клеток легких (SP-A/B/C/D).

[0065] Другие не-НТУ последовательности могут быть введены в 5' НТУ (или 3' НТУ) модифицированных молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Например, последовательности интронов или частей интронов могут быть введены во фланкирующие участки модифицированной мРНК по изобретению. Введение интронных последовательностей может увеличивать выработку белка, а также уровни мРНК.

3' НТУ и богатые AU элементы

[0066] Известно, что 3' НТУ содержат в своем составе участки, состоящие из Аденозина (A) и Уридина (U). Указанные сигнатуры, богатые AU, особенно преобладают в генах с высокой скоростью функционального цикла. На основании признаков и функциональных свойств их последовательности, богатые AU элементы (APЭ) могут быть разделены на три класса (Chen et al, 1995): APЭ Класса I содержат несколько разбросанных копий мотива AUUUA в пределах богатых U участков. С-Мус и MyoD составляют Класс I APЭ. APЭ Класса II содержат два или более перекрывающихся нонам ера UUAUUUA(U/A)(U/A) (SEQ ID NO: 2). Молекулы, относящиеся к данному типу APЭ, включают GM-CSF и TNF-а. APЭ Класса III не так хорошо определены. Указанные богатые U участки не содержат мотива AUUUA. с-Jun и миогенин представляют собой два хорошо изученных примера из данного класса. Известно, что большинство белков, связывающихся с APЭ, дестабилизируют мРНК, тогда как члены семейства ELAV, в основном, HuR, доказанно повышают стабильность мРНК. HuR связывается с APЭ всех трех классов. Конструирование сайтов специфичного связывания с HuR в 3' НТУ молекул нуклеиновой кислоты будет приводить к связыванию с HuR и, таким образом, стабилизации информации *in vivo*.

[0067] Введение, удаление или модификация богатых AU элементов 3' НТУ (APЭ) могут применяться с целью модуляции стабильности модифицированной мРНК по изобретению. При конструировании конкретной модифицированной мРНК, одна или более копий APЭ могут быть введены для получения менее стабильной модифицированной мРНК по изобретению, и, таким образом, ограничивать трансляцию и снижать выработку результирующего белка.

[0068] Подобным образом, APЭ могут быть идентифицированы и удалены или подвергнуты мутации с целью повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, увеличения трансляции и выработки результирующего белка. Эксперименты по трансфекции могут быть проведены в соответствующих клеточных линиях с использованием модифицированной мРНК по изобретению, и выработка белка может быть количественно оценена в различных точках времени после трансфекции. Например, клетки могут быть трансфицированы различными APЭ-сконструированными молекулами и посредством использования набора ТИФА для соответствующего белка, с количественным определением образовавшегося белка через 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов и 7 дней после трансфекции.

Введение сайтов связывания с микроРНК

[0069] МикроРНК (или миРНК) представляют собой некодирующие РНК длиной 19-25 нуклеотидов, которые связываются с 3' НТУ молекул нуклеиновой кислоты и регулируют вниз экспрессию гена посредством уменьшения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты или ингибирования трансляции. Модифицированная мРНК по изобретению может содержать одну или более целевых последовательностей микроРНК, последовательностей микроРНК или зародышей микроРНК. Такие последовательности

могут соответствовать любой известной микроРНК, такой как раскрытые в Публикациях США US 2005/0261218 и US 2005/0059005, содержание которых включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[0070] Последовательность микроРНК содержит «зародышевый» участок, т.е., последовательность участка в положениях 2-8 зрелой микроРНК, которая обладает идеальной уотсон-криковской комплементарностью к последовательности РНК-мишени. Зародыш микроРНК может содержать положения 2-8 или 2-7 зрелой микроРНК. В некоторых вариантах реализации зародыш микроРНК может содержать 7 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-8 зрелой микроРНК), причем зародыш-комплементарный сайт в соответствующей микроРНК-мишени фланкирован аденином (А), противостоящим положению 1 микроРНК. В некоторых вариантах реализации зародыш микроРНК может содержать 6 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-7 зрелой микроРНК), где зародыш-комплементарный сайт в соответствующей микроРНК-мишени фланкирован баянным аденином (А), противостоящим положению 1 микроРНК, см., например, Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP; Mol Cell. 2007 Jul 6; 27(1):91-105; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Основания зародыша микроРНК полностью комплементарны последовательности-мишени. Путем введения целевых последовательностей микроРНК в 3' НТУ модифицированной мРНК по изобретению можно обеспечить нацеливание молекулы в сторону разложения или уменьшения трансляции, при условии, что доступна необходимая микроРНК. Такой способ будет уменьшать опасность нецелевого воздействия при доставке молекулы нуклеиновой кислоты. Сообщалось об идентификации микроРНК, целевых участков микроРНК и характера их экспрессии, а также биологической роли (Bonauer et al., Curr Drug Targets 2010 11:943-949; Anand and Cheresch Curr Opin Hematol 2011 18:171-176; Contreras and Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011 Dec 20. doi: 10.1038/leu.2011.356); Bartel Cell 2009 136:215-233; Landgraf et al, Cell, 2007 129:1401-1414; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[0071] Например, если модифицированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой модифицированную мРНК и не предназначена для доставки в печень, но, в конце концов туда поступает, то микроРНК miR-122, в больших количествах встречающаяся в печени, может ингибировать экспрессию целевого гена в одном или нескольких целевых сайтах miR-122, введенных в 3' НТУ модифицированной мРНК. Введение одного или нескольких сайтов связывания с различными микроРНК может быть предусмотрено с целью дополнительного увеличения продолжительности жизни, стабильности и трансляции в белок модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты и/или модифицированной мРНК.

[0072] В настоящем документе термин «сайт микроРНК» обозначает сайт-мишень микроРНК или сайт распознавания микроРНК или любую нуклеотидную последовательность, с которой микроРНК связывается или образует ассоциацию. Следует понимать, что «связывание» может соответствовать правилам традиционной уотсон-криковской гибридизации или может отображать любую стабильную ассоциацию микроРНК с целевой последовательностью на сайте микроРНК или смежно с ним.

[0073] И наоборот, для целей создания модифицированной мРНК по настоящему изобретению, сайты связывания с микроРНК могут быть сконструированы за пределами (т.е., удалены из) последовательности, где они встречаются в природе, с целью повышения экспрессии белка в конкретных тканях. Например, сайты связывания с miR-122 могут быть удалены для повышения экспрессии белка в печени. Регуляция экспрессии

в нескольких тканях может быть достигнута посредством введения или удаления одного или нескольких сайтов связывания с микроРНК.

[0074] Примеры ткани, в которых микроРНК известны как регуляторы мРНК и, следовательно, экспрессии белка, включают, без ограничений, печень (miR-122), мышцу (miR-133, miR-206, miR-208), эндотелиальные клетки (miR-17-92, miR-126), миелоидные клетки (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), жировую ткань (let-7, miR-30c), сердце (miR-1d, miR-149), почку (miR-192, miR-194, miR-204) и эпителиальные клетки легкого (let-7, miR-133, miR-126). Кроме того, микроРНК регулирует комплекс биологических процессов, таких как ангиогенез (miR-132) (Anand and Cheresch Curr Opin Hematol 2011 18:171-176; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В модифицированной мРНК по настоящему изобретению, сайты связывания с микроРНК, которые принимают участие в таких процессах, могут быть удалены или введены, с целью регуляции экспрессии модифицированной мРНК в биологически релевантных типах клеток или контексте релевантных биологических процессов.

[0075] И, наконец, посредством понимания характера экспрессии микроРНК в различных типах клеток, может быть сконструирована модифицированная мРНК для более направленной экспрессии в конкретных типах клеток или только в конкретных биологических условиях. Посредством введения сайтов связывания с тканеспецифичной микроРНК, может быть сконструирована модифицированная мРНК, которая будет оптимальной для экспрессии белка в ткани или в контексте биологического условия.

[0076] Эксперименты по трансфекции могут быть проведены в релевантных линиях клеток, с использованием сконструированной модифицированной мРНК, и выработка белка может быть количественно оценена в различных точках времени после трансфекции. Например, клетки могут быть трансфицированы сконструированной модифицированной мРНК, содержащей различные сайты связывания с микроРНК, и путем использования набора ТИФА для соответствующего белка, с количественным анализом образовавшегося белка через 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 7 дней после трансфекции. Кроме того, могут быть проведены эксперименты *in vivo* с использованием молекул со сконструированным сайтом связывания с микроРНК для исследования изменений тканеспецифичной экспрессии введенной в препараты модифицированной мРНК.

5' Кэппинг

[0077] Структура 5' кэпа в мРНК принимает участие в экспорте из ядра, повышает стабильность мРНК и связывается с белком связывания кэпа (БСК) мРНК, который ответственен за стабильность мРНК в клетке и компетентность трансляции в процессе ассоциации БСК с поли(А) связывающимся белком, с образованием зрелой формы циклической мРНК. Кроме того, кэп способствует удалению 5' проксимальных интронов в ходе сплайсинга мРНК.

[0078] Может быть осуществлен кэппинг 5'-конца эндогенных молекул мРНК с образованием 5'-ppp-5'-трифосфатной связи между концевым остатком гуанозина кэпа и 5'-концевым транскрибированным смысловым нуклеотидом молекулы мРНК. Указанный 5'-гуанилированный кэп в дальнейшем может быть метилирован с образованием остатка N7-метил-гуанилата. Кроме того, рибозные сахара концевых и/или неконцевых транскрибированных нуклеотидов на 5' конце мРНК необязательно могут быть 2'-О-метилованы. Удаление 5'-кэпа посредством гидролиза и расщепления гуанилатной структуры кэпа может нацеливать молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула мРНК, в сторону разложения.

[0079] Модификации в модифицированной мРНК по настоящему изобретению могут давать негидролизующую структуру кэпа, предупреждающую удаление кэпа и, таким образом, увеличивающую период полувыведения мРНК. Вследствие того, что структура кэпа требует расщепления 5'-ppp-5'-фосфородиэфирных связей, модифицированные нуклеотиды могут использоваться в ходе реакции кэппинга. Например, кэппинг-фермент коровьей оспы производства New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс) может использоваться с α -тио-гуанозиновыми нуклеотидами, в соответствии с инструкциями производителя, для образования фосфоротиоатной связи в кэпе 5'-ppp-5'. Могут использоваться дополнительные модифицированные гуанозиновые нуклеотиды, такие как α -метил-фосфонатные и селено-фосфатные нуклеотиды.

[0080] Дополнительные модификации включают, без ограничений, 2'-О-метилирование рибозных сахаров 5'-концевых и/или 5'-неконцевых нуклеотидов мРНК (как упоминалось выше) на 2'-гидроксильной группе сахарного кольца. Множество разнообразных структур 5'-кэпа может применяться для образования 5'-кэпа в молекуле нуклеиновой кислоты, такой как молекула мРНК.

[0081] Аналоги кэпа, которые в настоящем документе также называются синтетическими аналогами кэпа, химическими кэпами, химическими аналогами кэпа или структурными или функциональными аналогами кэпа, являются отличными от природных (т.е., эндогенных, дикого типа или физиологических) 5'-кэпов по своей химической структуре, при сохранении функции кэпа. Аналоги кэпа могут быть химически (т.е., неферментно) или ферментно синтезированы и/или соединены с молекулой нуклеиновой кислоты.

[0082] Например, анти-инвертный аналог кэпа (ARCA) содержит два остатка гуанина, соединенные 5'-5'-трифосфатной группой, где один остаток гуанина содержит N7-метильную группу, а также 3'-О-метильную группу (т.е., N7,3'-О-диметил-гуанозин-5'-трифосфат-5'-гуанозин ($m^7G-3'mppp-G$; который также может обозначаться как 3' O-Me- $m^7G(5')ppp(5')G$). Атом 3'-О другого, немодифицированного гуанинового остатка соединяется с 5'-концевым нуклеотидом кэпированной молекулы нуклеиновой кислоты (например, мРНК или ммРНК). N7- и 3'-О-метилированные гуаниновые остатки обеспечивают концевой фрагмент кэпированной молекулы нуклеиновой кислоты (например, мРНК или ммРНК).

[0083] Другой пример кэпа представляет собой mCAP, сходный с ARCA, но содержащий 2'-О-метильную группу на гуанозине (т.е., N7,2'-О-диметил-гуанозин-5'-трифосфат-5'-гуанозин, $m^7Gm-ppp-G$).

[0084] Хотя аналоги кэпа обеспечивают сопутствующий кэппинг молекулы нуклеиновой кислоты в реакции транскрипции *in vitro*, до 20% транскриптов могут оставаться без кэпа. Это, а также структурные отличия аналога кэпа от эндогенных структур 5'-кэпа нуклеиновых кислот, образованных эндогенным способом, с помощью клеточного аппарата транскрипции, могут приводить к снижению трансляционной компетентности и клеточной стабильности.

[0085] Модифицированные мРНК по настоящему изобретению также могут быть кэпированы посттранскрипционно, с использованием ферментов, с целью генерации более аутентичных структур 5'-кэпа. В настоящем документе выражение «более аутентичный» обозначает признак, который точно отображает или имитирует, структурно или функционально, признак эндогенного происхождения или дикого типа. Таким образом, признак «более аутентичный» является более характерным для эндогенной, дикого типа, природной или физиологической клеточной функции и/или структуры, по сравнению с синтетическими признаками или аналогами, и т.д., из уровня

техники или такими, которые превосходят соответствующий эндогенный, дикого типа, природный или физиологический признак в одном или более отношениях.

Неограничивающими примерами более аутентичных структур 5'-кэпа по настоящему изобретению являются обладающие, среди прочего, повышенной способностью связывания с белками, которые связываются с кэпом, увеличенным периодом полувыведения, сниженной чувствительностью к 5' эндонуклеазам и/или сниженным уровнем удаления 5'-кэпа, по сравнению с синтетическими структурами 5'-кэпа, известными из уровня техники (или дикого типа, природной или физиологической структурой 5'-кэпа). Например, рекомбинантный кэппинг-фермент вируса коровьей оспы и рекомбинантный фермент 2'-О-метилтрансфераза могут образовывать канонические 5'-5'-трифосфатные связи между 5'-концевым нуклеотидом мРНК и гуаниновым нуклеотидом кэпа, где гуаниновый кэп содержит N7 метилирование, и 5'-концевой нуклеотид мРНК содержит 2'-О-метил. Такая структура заканчивается структурой Кэпа 1. Такой кэп приводит к повышению трансляционной компетентности и клеточной стабильности, а также снижению активации клеточных провоспалительных цитокинов, по сравнению, например, с другими структурами аналогов 5'-кэпа, известными из уровня техники. Структуры кэпа включают, без ограничений, 7mG(5')ppp(5')N₁pN₂p (кэп 0), 7mG(5')ppp(5')NlmpNp (кэп 1) и 7mG(5')-ppp(5')NlmpN₂mp (кэп 2).

[0086] Поскольку модифицированная мРНК может быть кэпирована посттранскрипционально, и поскольку данный процесс является более эффективным, практически 100% модифицированной мРНК может быть кэпировано. В противоположность этому, эффективность составляет ~80%, если аналог кэпа присоединяется к мРНК в ходе реакции транскрипции *in vitro*.

[0087] В соответствии с настоящим изобретением, 5' концевые кэпы могут включать эндогенные кэпы или аналоги кэпа. В соответствии с настоящим изобретением, 5' концевой кэп может включать гуаниновый аналог. Пригодные гуаниновые аналоги включают, без ограничений, инозин, N1-метил-гуанозин, 2'фтор-гуанозин, 7-дезаза-гуанозин, 8-оксо-гуанозин, 2-амино-гуанозин, ЦНК-гуанозин и 2-азидо-гуанозин.

Вирусные последовательности

[0088] Дополнительные вирусные последовательности, например, без ограничений, последовательность усилителя трансляции вируса желтой карликовости ячменя (BYDV-PAV) могут быть сконструированы и вставлены в 3' НТУ модифицированной мРНК по изобретению, и могут стимулировать трансляцию мРНК *in vitro* и *in vivo*.

Эксперименты по трансфекции могут быть проведены на релевантных линиях клеток, и выработка белка может быть количественно определена методом ТИФА через 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 7 дней после трансфекции.

Последовательности ВСВР

[0089] Дополнительно раскрыты модифицированные мРНК, которые могут содержать внутренний сайт вхождения в рибосому (ВСВР). Впервые идентифицированный как признак вируса РНК Рісогна, ВСВР играет важную роль в инициации синтеза белка в отсутствие структуры 5'-кэпа. ВСВР может действовать как единственный сайт связывания с рибосомой или может служить одним из нескольких сайтов связывания мРНК с рибосомой. Модифицированная мРНК, содержащая более одного функционального сайта связывания с рибосомой, может кодировать несколько пептидов или полипептидов, которые транслируются независимо рибосомами («полицистронные молекулы нуклеиновой кислоты»). Если модифицированная мРНК снабжена ВСВР, она дополнительно может необязательно содержать второй транслируемый участок. Примеры последовательностей ВСВР, которые могут применяться в соответствии с

изобретением, включают, без ограничений, последовательности пикорнавирусов (например, вируса ящура), вирусов домашних животных (СФФV), вирусов полиомиелита (ВП), вирусов энцефаломиокардита (ВЭЦМ), вирусов ящура (ВЯ), вирусов гепатита С (НСV), вирусов классической чумы свиней (ВКЧС), вируса лейкоза мышей (ВЛМ),
 5 вирусов иммунодефицита обезьян (ВИО) или вирусы паралича сверчков (ВПСв).

Поли-А хвосты

[0090] В ходе процессинга РНК, длинная цепь адениновых нуклеотидов (поли-А хвост) может быть добавлена к модифицированной молекуле нуклеиновой кислоты, такой как модифицированная молекула мРНК, с целью повышения стабильности.
 10 Немедленно после транскрипции, 3' конец транскрипта может быть расщеплен до свободной 3' гидроксильной группы. Поли-А полимеразы присоединяет цепь адениновых нуклеотидов к РНК. В ходе процесса под названием полиаденилирование, присоединяется поли-А хвост, длина которого может составлять, например, приблизительно от 100 до 250 остатков.

15 [0091] Было обнаружено, что определенная уникальная длина поли-А хвоста обеспечивает некоторые преимущества модифицированной мРНК по настоящему изобретению.

[0092] В общем, длина поли-А хвоста по настоящему изобретению составляет более 30 нуклеотидов. В другом варианте реализации длина поли-А хвоста составляет более
 20 35 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более чем приблизительно 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500 и 3000 нуклеотидов). В некоторых вариантах реализации модифицированная мРНК содержит от приблизительно 30 до приблизительно 3000 нуклеотидов (например, от 30 до 50, от
 25 30 до 100, от 30 до 250, от 30 до 500, от 30 до 750, от 30 до 1000, от 30 до 1500, от 30 до 2000, от 30 до 2500, от 50 до 100, от 50 до 250, от 50 до 500, от 50 до 750, от 50 до 1 000, от 50 до 1500, от 50 до 2 000, от 50 до 2500, от 50 до 3 000, от 100 до 500, от 100 до 750, от 100 до 1 000, от 100 до 1500, от 100 до 2 000, от 100 до 2500, от 100 до 3000, от 500 до
 30 750, от 500 до 1000, от 500 до 1500, от 500 до 2000, от 500 до 2500, от 500 до 3000, от 1000 до 1500, от 1000 до 2000, от 1000 до 2500, от 1000 до 3000, от 1500 до 2000, от 1500 до 2500, от 1500 до 3000, от 2000 до 3000, от 2000 до 2500 и от 2500 до 3000).

[0093] В одном варианте реализации поли-А хвост конструируется относительно общей длины модифицированной мРНК. Такой дизайн может быть основан на длине кодирующего участка, длине конкретного признака или участка (например,
 35 фланкирующих участков) или на длине конечного продукта, экспрессирующегося из модифицированной мРНК.

[0094] В данном контексте длина поли-А хвоста может быть на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% больше длины модифицированной мРНК, ее участка или признака. Кроме того, поли-А хвост может быть сконструирован как отрезок модифицированной
 40 мРНК, к которой он принадлежит. В данном контексте, поли-А хвост может составлять 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% или более от общей длины молекулы или общей длины молекулы минус поли-А хвост. Дополнительно, сконструированные сайты связывания и конъюгации модифицированной мРНК с белком, связывающимся с поли-А, могут повышать экспрессию.

45 [0095] Дополнительно, несколько различных модифицированных мРНК могут быть одновременно соединены с БСПА (белок, связывающийся с поли-А) посредством 3'-конца, с использованием модифицированных нуклеотидов на 3'-конце поли-А хвоста. Эксперименты по трансфекции могут быть проведены на релевантных линиях клеток,

и выработка белка может быть количественно оценена методом ТИФА через 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 7 дней после трансфекции.

[0096] В одном варианте реализации модифицированная мРНК по настоящему изобретению сконструирована таким образом, чтобы содержать полиА-Г квартет. Г-Квартет представляет собой циклический, соединенный водородными связями массив из 4-х гуаниновых нуклеотидов, который может образовываться богатыми Г последовательностями в ДНК и РНК. В данном варианте реализации, квартет Г введен на конце поли-А хвоста. Полученную молекулу ммРНК анализируют на предмет стабильности, выработки белка и других параметров, в том числе, периода полувыведения в различных временных точках. Было обнаружено, что результат введения полиА-Г квартета с точки зрения выработки белка эквивалентен по меньшей мере 75% результата, полученного с применением только поли-А хвоста длиной 120 нуклеотидов.

Модификации

[0097] Модифицированные нуклеиновые кислоты и модифицированная мРНК (ммРНК) по изобретению могут содержать одну, две или более различных модификаций. В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты и ммРНК могут содержать одну, две или более различных модификаций нуклеозидов или нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или ммРНК (например, содержащие одну или более молекул ммРНК), введенная в клетку, может демонстрировать уменьшение разложения в клетке, по сравнению с немодифицированной нуклеиновой кислотой или ммРНК.

[0098] Модифицированные нуклеиновые кислоты и ммРНК могут содержать любую пригодную модификацию, например, сахара, нуклеинового основания (например, одну или более модификаций нуклеинового основания, такую как замена или замещение пиримидинового атома нуклеинового основания необязательно замещенной аминогруппой, необязательно замещенным тиолом, необязательно замещенным алкилом (например, метилом или этилом) или галогеном (например, хлором или фтором), или межнуклеозидной связи (например, одна или более модификаций в фосфодиэфирном скелете). В некоторых вариантах реализации модификации присутствуют в сахарном фрагменте и межнуклеозидной связи (например, одна или более модификаций, таких как присутствуют в рибонуклеиновых кислотах (РНК), дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК), треозонуклеиновых кислотах (ТНК), гликольнуклеиновых кислотах (ГНК), пептиднуклеиновых кислотах (ПНК), циклических нуклеиновых кислотах (ЦНК) или их гибридах). Дополнительные модификации раскрыты в настоящем документе.

[0099] Как раскрыто в настоящем документе, модифицированные нуклеиновые кислоты и ммРНК по изобретению в значительной степени не индуцируют природного иммунного ответа клетки, в которую введена мРНК. В некоторых вариантах реализации может быть желательным внутриклеточное разложение модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, введенной в клетку. Например, разложение модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или модифицированной мРНК может быть предпочтительным, если желательна выработка белка в пределах точного интервала времени. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения предлагается модифицированная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая домен разложения, способный действовать непосредственно в пределах клетки. В другом аспекте настоящего документа раскрываются нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеозид или нуклеотид, который может нарушать связывание нуклеиновой кислоты с основным партнером по

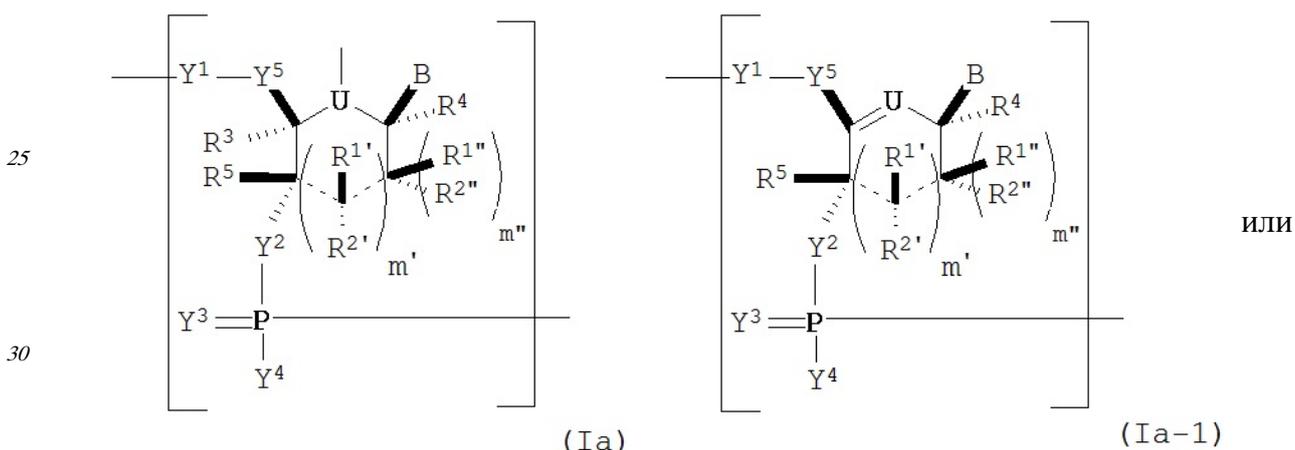
взаимодействию для бороздки (например, если модифицированный нуклеотид обладает сниженной аффинностью связывания с основным партнером по взаимодействию для бороздки, по сравнению с немодифицированным нуклеотидом).

[00100] Модифицированная нуклеиновая кислота и ммРНК необязательно могут включать другие агенты (например, индуцирующие иРНК агенты, иРНК агенты, миРНК, РНК-шпильку, миРНК, антисмысловую РНК, рибозимы, каталитическую ДНК, тРНК, РНК, которая индуцирует образование тройной спирали, аптамеры, векторы и т.д.). В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК могут включать одну или более матричных РНК (мРНК) и один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов (например, молекулы ммРНК). Подробное описание указанных модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК приведено ниже.

Модифицированные нуклеиновые кислоты

[00101] Модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК по изобретению могут содержать первый участок соединенных нуклеозидов, кодирующий целевой полипептид, первый фланкирующий участок, расположенный на 5' конце первого участка, и второй фланкирующий участок, расположенный на 3' конце первого участка.

[00102] В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты --- или ммРНК содержат n соединенных нуклеозидов Формулы (Ia) или Формулы (Ia-1):



фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанного соединения, где

[00103] U представляет собой O, S, N(R^U)_{nu} или C(R^U)_{nu}, где nu равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил;

[00104] --- представляет собой одинарную связь или отсутствует;

[00105] каждый из R^{1'}, R^{2'}, R^{1''}, R^{2''}, R¹, R², R³, R⁴ и R⁵, если он присутствует, независимо представляет собой H, галоген, гидроксильную группу, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный гидроксиалкокси, необязательно замещенный аминный, азидный, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный аминоалкил, необязательно замещенный аминоалкенил, необязательно замещенный аминоалкинил или отсутствует; где комбинация R³ с одним или более из R^{1'}, R^{1''}, R^{2'}, R^{2''} или R⁵ (например, комбинация R^{1'}

и R^3 , комбинация $R^{1'}$ и R^3 , комбинация $R^{2'}$ и R^3 , комбинация $R^{2''}$ и R^3 или комбинация R^5 и R^3) могут быть объединены с образованием необязательно замещенного алкилена или необязательно замещенного гетероалкилена, и, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный гетероциклил (например, бициклический, трициклический или тетрациклический гетероциклил); где комбинация R^5 с одним или более из $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$ или $R^{2''}$ (например, комбинация $R^{1'}$ и R^5 , комбинация $R^{1''}$ и R^5 , комбинация $R^{2'}$ и R^5 или комбинация $R^{2''}$ и R^5) могут быть объединены с образованием необязательно замещенного алкилена или необязательно замещенного гетероалкилена и, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный гетероциклил (например, бициклический, трициклический или тетрациклический гетероциклил); и где комбинация R^4 и одного или более из $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, R^3 или R^5 может быть объединена с образованием необязательно замещенного алкилена или необязательно замещенного гетероалкилена и, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образовывать необязательно замещенный гетероциклил (например, бициклический, трициклический или тетрациклический гетероциклил);

[00106] каждое из m' и m'' независимо равно целому числу от 0 до 3 (например, от 0 до 2, от 0 до 1, от 1 до 3 или от 1 до 2);

[00107] каждый из Y^1 , Y^2 и Y^3 , независимо представляет собой O, S, Se, $-NR^{N1}$ -, необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный арил или отсутствует;

[00108] каждый Y^4 независимо представляет собой H, гидрокси, тиол, боранил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный тиоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси или необязательно замещенный амино;

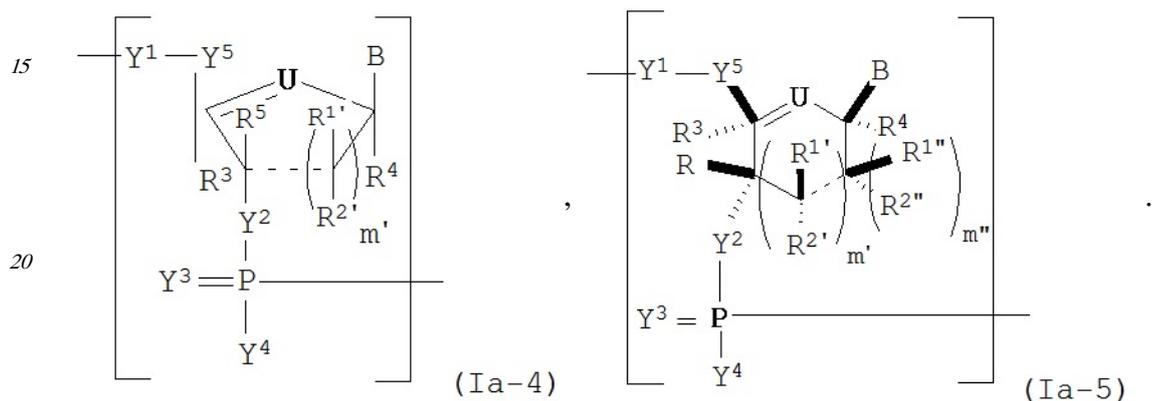
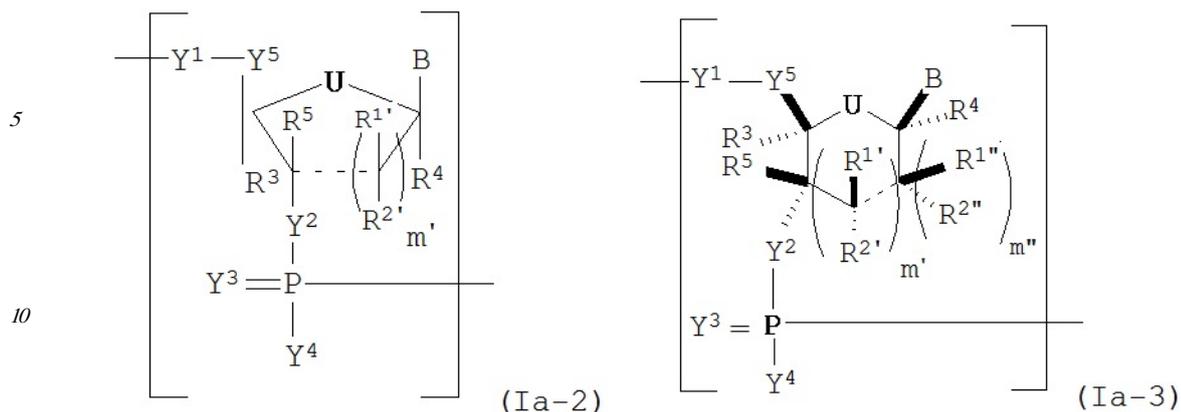
[00109] каждый Y^5 независимо представляет собой O, S, Se, необязательно замещенный алкилен (например, метилен) или необязательно замещенный гетероалкилен;

[00110] n равно целому числу от 1 до 100 000; и

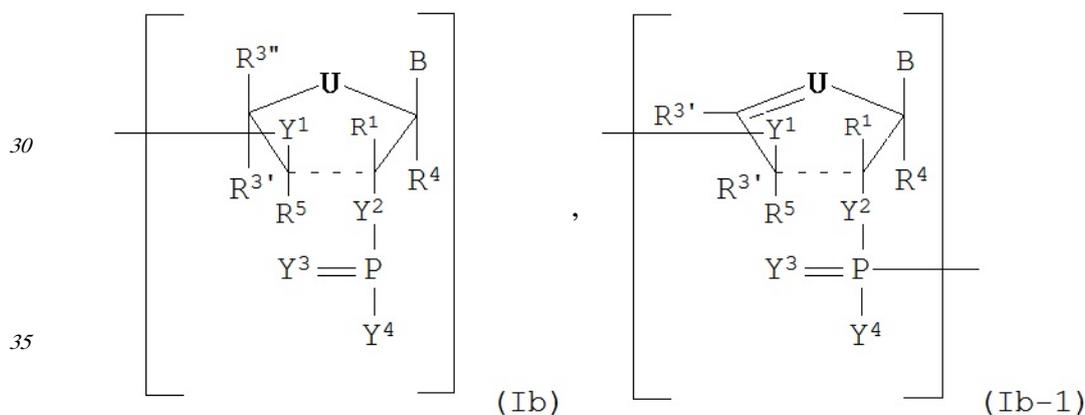
[00111] В представляет собой нуклеиновое основание (например, пурин, пиримидин или их производные), где комбинация В и $R^{1'}$, комбинация В и $R^{2'}$, комбинация В и $R^{1''}$ или комбинация В и $R^{2''}$ могут, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, необязательно образовывать бициклическую группу (например, бициклический гетероциклил), или где комбинация В, $R^{1''}$ и R^3 или комбинация В, $R^{2''}$ и R^3 необязательно может образовывать трициклическую или тетрациклическую группу (например, трициклический или тетрациклический гетероциклил, такой как в Формулах (По)-(Пр) настоящего документа). В некоторых вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или ммРНК содержит модифицированную рибозу.

[00112] В некоторых вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или ммРНК содержит n связанных нуклеозидов Формулы (Ia-2)-(Ia-5) или

фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанного соединения.



25 [00113] В некоторых, вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК содержит n связанных нуклеозидов Формулы (Ib) или Формулы (Ib-1):



или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанного соединения, где

40 [00114] U представляет собой O, S, N(R^U)_{nu} или C(R^U)_{nu}, где nu равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил;

45 [00115] --- представляет собой одинарную связь или отсутствует; [00116] каждый из R¹, R^{3'}, R^{3''} и R⁴ независимо представляет собой H, галоген, гидроксиль, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный

гидроксиалкокси, необязательно замещенный амино, азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный аминоксил, необязательно замещенный аминоксил, необязательно замещенный аминоксил или отсутствует; и где комбинация R^1 и $R^{3'}$ или комбинация R^1 и $R^{3''}$ вместе может образовывать необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен (например, с образованием циклической нуклеиновой кислоты);

[00117] каждый R^5 независимо представляет собой H, галоген, гидроксид, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкоксид, необязательно замещенный алкенилоксид, необязательно замещенный алкинилоксид, необязательно замещенный аминоксил, необязательно замещенный алкоксиалкоксид или отсутствует;

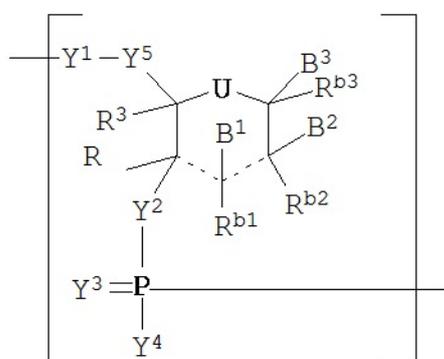
[00118] каждый из Y^1 , Y^2 и Y^3 независимо представляет собой O, S, Se, $-NR^{N1}$ -, необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил;

каждый Y^4 независимо представляет собой H, гидроксид, тиол, боранил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкоксид, необязательно замещенный алкенилоксид, необязательно замещенный алкинилоксид, необязательно замещенный алкоксиалкоксид или необязательно замещенный амино;

[00119] n равно целому числу от 1 до 100 000; и

[00120] B представляет собой нуклеиновое основание.

[00121] B в некоторых вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК содержит n связанных нуклеозидов Формулы (Ic):



или фармацевтически приемлемую соль или

стереоизомер указанного соединения, где

[00122] U представляет собой O, S, $N(R^U)_{nu}$ или $C(R^U)_{nu}$, где nu равно целому числу

от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил;

[00123] - представляет собой одинарную связь или отсутствует;

[00124] каждый из B^1 , B^2 и B^3 независимо представляет собой нуклеиновое основание (например, пурин, пиримидин или их производные, как раскрыто в настоящем документе), H, галоген, гидроксид, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкоксид, необязательно замещенный алкенилоксид, необязательно замещенный алкинилоксид, необязательно замещенный аминоксил, необязательно замещенный алкоксиалкоксид, необязательно замещенный гидроксиалкоксид,

необязательно замещенный амино, азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный аминокалкил, необязательно замещенный аминокалкенил или необязательно замещенный аминокалкинил, где один и только один из B^1 , B^2 и B^3 представляет собой нуклеиновое основание;

[00125] каждый из R^{b1} , R^{b2} , R^{b3} , R^3 и R^5 независимо представляет собой H, галоген, гидрокси, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминококси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный гидроксиалкокси, необязательно замещенный амино, азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный аминокалкил, необязательно замещенный аминокалкенил или необязательно замещенный аминокалкинил;

[00126] каждый из Y^1 , Y^2 и Y^3 , независимо представляет собой O, S, Se, $-NR^{N1}-$, необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил;

[00127] каждый Y^4 независимо представляет собой H, гидрокси, тиол, боранил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный тиоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси или необязательно замещенный амино;

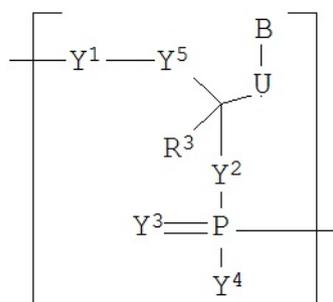
[00128] каждый Y^5 независимо представляет собой O, S, Se, необязательно замещенный алкилен (например, метилен) или необязательно замещенный гетероалкилен;

[00129] n равно целому числу от 1 до 100 000; и

[00130] где содержащее U кольцо может содержать одну или более двойных связей.

[00131] В конкретных вариантах реализации кольцо, содержащее U, не содержит двойной связи между $U-CB^3R^{b3}$ или между $CB^3R^{b3}-C^{B2}R^{b2}$.

[00132] В некоторых вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК содержит n связанных нуклеозидов Формулы (Id):



(Id)

или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер

указанного соединения, где

[00133] U представляет собой O, S, $N(R^U)_n$ или $C(R^U)_n$, где n равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил;

[00134] каждый R^3 независимо представляет собой H, галоген, гидроксид, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоксокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный гидроксидалкокси, необязательно замещенный аминоксо, азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный аминоксоалкил, необязательно замещенный аминоксоалкенил или необязательно замещенный аминоксоалкинил;

[00135] каждый из Y^1 , Y^2 и Y^3 независимо представляет собой O, S, Se, $-NR^{N1}$ -, необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил;

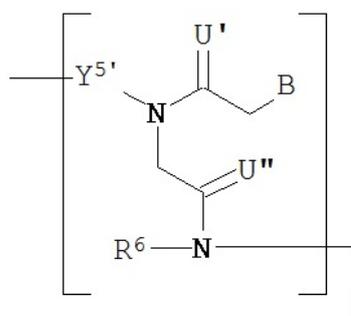
[00136] каждый Y^4 независимо представляет собой H, гидроксид, тиол, боранил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный тиоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси или необязательно замещенный аминоксо;

[00137] каждый Y^5 независимо представляет собой O, S, необязательно замещенный алкилен (например, метилен) или необязательно замещенный гетероалкилен;

[00138] n равно целому числу от 1 до 100 000; и

[00139] B представляет собой нуклеиновое основание (например, пуриновое, пиримидиновое или их производные).

[00140] B в некоторых вариантах реализации реализованные молекулы нуклеиновой кислоты или модифицированные мРНК содержат n связанных нуклеозидов
Формулы (Ie):



или фармацевтически приемлемую соль или

стереоизомер указанного соединения, где

[00141] каждый из U' и U'' независимо представляет собой O, S, $N(R^U)_{nu}$ или $C(R^U)_{nu}$, где nu равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил;

каждый R^6 независимо представляет собой H, галоген, гидроксид, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоксокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный гидроксидалкокси, необязательно замещенный аминоксо, азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный аминоксоалкил, необязательно замещенный

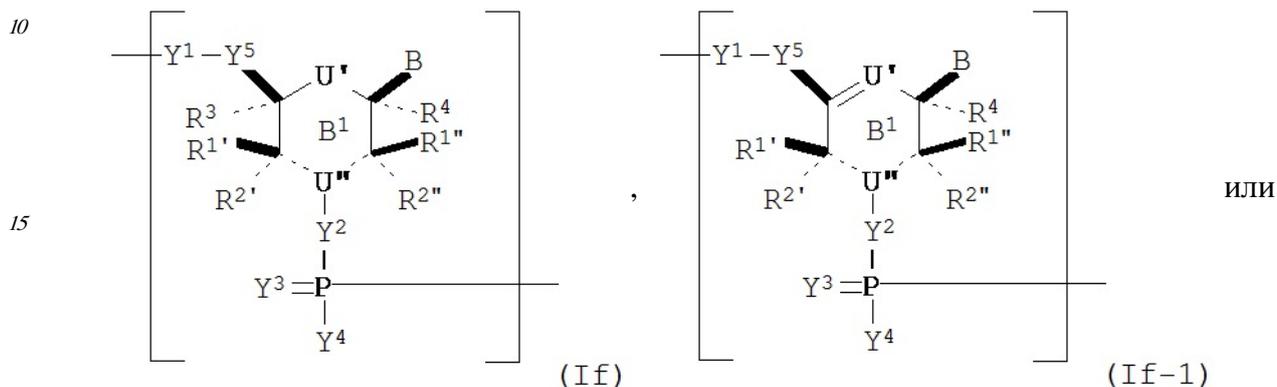
аминоалкенил, или необязательно замещенный аминоалкинил;

[00142] каждый Y^5 независимо представляет собой O, S, необязательно замещенный алкилен (например, метилен или этилен) или необязательно замещенный гетероалкилен;

[00143] n равно целому числу от 1 до 100 000; и

[00144] B представляет собой нуклеиновое основание (например, пуриновое, пиримидиновое или их производные).

[00145] В некоторых вариантах реализации реализация модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК содержит n связанных нуклеозидов Формулы (If) или (If-1):



фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанного соединения, где

[00146] каждый из U' и U'' независимо представляет собой O, S, N, $N(R^U)_{nu}$ или $C(R^U)_{nu}$,

где nu равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил (например, U' представляет собой O и U'' представляет собой N);

[00147] - представляет собой одинарную связь или отсутствует;

[00148] каждый из $R^{1'}$, $R^{2'}$, $R^{1''}$, $R^{2''}$, R^3 и R^4 независимо представляет собой H, галоген, гидрокси, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный гидроксиалкокси, необязательно замещенный амина, азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный аминоалкил, необязательно замещенный аминоалкенил, необязательно замещенный аминоалкинил или отсутствует; и где комбинация $R^{1'}$ и R^3 , комбинация $R^{1''}$ и R^3 , комбинация $R^{2'}$ и R^3 или комбинация $R^{2''}$ и R^3 вместе может образовывать необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен (например, с образованием циклической нуклеиновой кислоты); каждое из m' и m'' независимо равно целому числу от 0 до 3 (например, от 0 до 2, от 0 до 1, от 1 до 3 или от 1 до 2);

[00149] каждый из Y^1 , Y^2 и Y^3 , независимо представляет собой O, S, Se, $-NR^{N1}-$, необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный арил или отсутствует;

[00150] каждый Y^4 независимо представляет собой H, гидрокси, тиол, боранил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный

алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный тиоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси или необязательно замещенный амино;

[00151] каждый Y^5 независимо представляет собой O, S, Se, необязательно замещенный алкилен (например, метилен) или необязательно замещенный гетероалкилен;

[00152] n равно целому числу от 1 до 100 000; и

[00153] В представляет собой нуклеиновое основание (например, пурин, пиримидин или их производные).

[00154] В некоторых вариантах модифицированной нуклеиновой кислоты или ммРНК (например, (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), кольцо, содержащее U, содержит одну или две двойные связи.

[00155] В некоторых вариантах модифицированной нуклеиновой кислоты или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), каждый из R^1 , $R^{1'}$ и $R^{1''}$, если он присутствует,

представляет собой H. В дополнительных вариантах реализации каждый из R^2 , $R^{2'}$ и $R^{2''}$, если он присутствует, независимо представляет собой H, галоген (например, фтор), гидроксид, необязательно замещенный алкокси (например, метокси или этокси) или необязательно замещенный алкоксиалкокси. В конкретных вариантах реализации алкоксиалкокси представляет собой $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10) и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил). В некоторых вариантах реализации $s2$ равно 0, $s1$ равно 1 или 2, $s3$ равно 0 или 1, и R' представляет собой C_{1-6} алкил.

[00156] В некоторых вариантах модифицированной нуклеиновой кислоты или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), каждый из R^2 , $R^{2'}$ и $R^{2''}$, если он присутствует,

представляет собой H. В дополнительных вариантах реализации каждый из R^1 , $R^{1'}$ и $R^{1''}$, если он присутствует, независимо представляет собой H, галоген (например, фтор), гидроксид, необязательно замещенный алкокси (например, метокси или этокси) или необязательно замещенный алкоксиалкокси. В конкретных вариантах реализации алкоксиалкокси представляет собой $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил). В некоторых вариантах реализации $s2$ равно 0, $s1$ равно 1 или 2, $s3$ равно 0 или 1, и R' представляет собой C_{1-6} алкил.

[00157] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), каждый из R^3 , R^4 и R^5 независимо представляет собой H, галоген (например, фтор), гидроксид, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси (например, метокси или этокси) или необязательно замещенный алкоксиалкокси. В конкретных вариантах реализации R^3 представляет собой H, R^4 представляет собой H, R^5 представляет собой H или R^3 , R^4 и R^5 все представляют собой

Н. В конкретных вариантах реализации R^3 представляет собой C_{1-6} алкил, R^4 представляет собой C_{1-6} алкил, R^5 представляет собой C_{1-6} алкил или R^3 , R^4 и R^5 все представляют собой C_{1-6} алкил. В конкретных вариантах реализации R^3 и R^4 оба представляют собой Н, и R^5 представляет собой C_{1-6} алкил.

[00158] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), R^3 и R^5 вместе образуют необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен и, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный гетероцикл (например, бициклический, трициклический или тетрациклический гетероцикл, такой как транс-3',4' аналоги, где R^3 и R^5 вместе образуют гетероалкилен (например, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, где каждое из $b1$, $b2$ и $b3$ независимо равно целому числу от 0 до 3).

[00159] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), R^3 и один или более из R^1 , R^1 , R^2 , R^2 или R^5 вместе образуют необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен и, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный гетероцикл (например, бициклический, трициклический или тетрациклический гетероцикл, R^3 и один или более из R^1 , R^1 , R^2 , R^2 или R^5 вместе образуют гетероалкилен (например, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, где каждое из $b1$, $b2$ и $b3$ независимо равно целому числу от 0 до 3).

[00160] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), R^5 и один или более из R^1 , R^1 , R^2 или R^2 вместе образуют необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен и, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный гетероцикл (например, бициклический, трициклический или тетрациклический гетероцикл, R^5 и один или более из R^1 , R^1 , R^2 или R^2 вместе образуют гетероалкилен (например, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, где каждое из $b1$, $b2$ и $b3$ независимо равно целому числу от 0 до 3).

[00161] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)) каждый Y^2 независимо представляет собой О, S или $-NR^{N1}$, где R^{N1} представляет собой Н, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил. В конкретных вариантах реализации Y^2 представляет собой NR^{N1} , где R^{N1} представляет собой Н или необязательно замещенный алкил (например, C_{1-6} алкил, такой как метил, этил, изопропил или н-пропил).

[00162] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), каждый Y^3 независимо представляет собой О или S.

[00163] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), R^1 представляет собой H; каждый R^2 независимо представляет собой H, галоген (например, фтор), гидроксильная группа, необязательно замещенный алкокси (например, метокси или этокси) или необязательно замещенный алкоксиалкокси (например, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10) и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил, например, где $s2$ равно 0, $s1$ равно 1 или 2, $s3$ равно 0 или 1, и R' представляет собой C_{1-6} алкил); каждый Y^2 независимо представляет собой O или $-NR^{N1}$, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил (например, где R^{N1} представляет собой H или необязательно замещенный алкил (например, C_{1-6} алкил, такой как метил, этил, изопропил или н-пропил)); и каждый Y^3 независимо представляет собой O или S (например, S). В дополнительных вариантах реализации R^3 представляет собой H, галоген (например, фтор), гидроксильная группа, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси (например, метокси или этокси) или необязательно замещенный алкоксиалкокси. Еще в других вариантах реализации каждый Y^1 независимо представляет собой O или $-NR^{N1}$, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил (например, где R^{N1} представляет собой H или необязательно замещенный алкил (например, C_{1-6} алкил, такой как метил, этил, изопропил или н-пропил)); и каждый Y^4 независимо представляет собой H, гидроксильная группа, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный тиоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси или необязательно замещенный амин.

[00164] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК (например, Формул (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), каждый R^1 независимо представляет собой H, галоген (например, фтор), гидроксильная группа, необязательно замещенный алкокси (например, метокси или этокси) или необязательно замещенный алкоксиалкокси (например, $(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил, такой как, где $s2$ равно 0, $s1$ равно 1 или 2, $s3$ равно 0 или 1, и R' представляет собой C_{1-6} алкил); R^2 представляет собой H; каждый Y^2 независимо представляет собой O или $-NR^{N1}$, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил (например, где R^{N1} представляет собой H или необязательно замещенный алкил (например, C_{1-6} алкил, такой как метил, этил,

изопропил или н-пропил)); и каждый Y^3 независимо представляет собой О или S (например, S). В дополнительных вариантах реализации R^3 представляет собой H, галоген (например, фтор), гидроксигруппа, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси (например, метокси или этокси) или необязательно замещенный алкоксиалкокси. Еще в других вариантах реализации каждый Y^1 независимо представляет собой О или $-NR^{N1}$ -, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил (например, где R^{N1} представляет собой H или необязательно замещенный алкил (например, C_{1-6} -алкил, такой как метил, этил, изопропил или н-пропил)); и каждый Y^4 независимо представляет собой H, гидроксигруппа, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный тиоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси или необязательно замещенный аминоксигруппа.

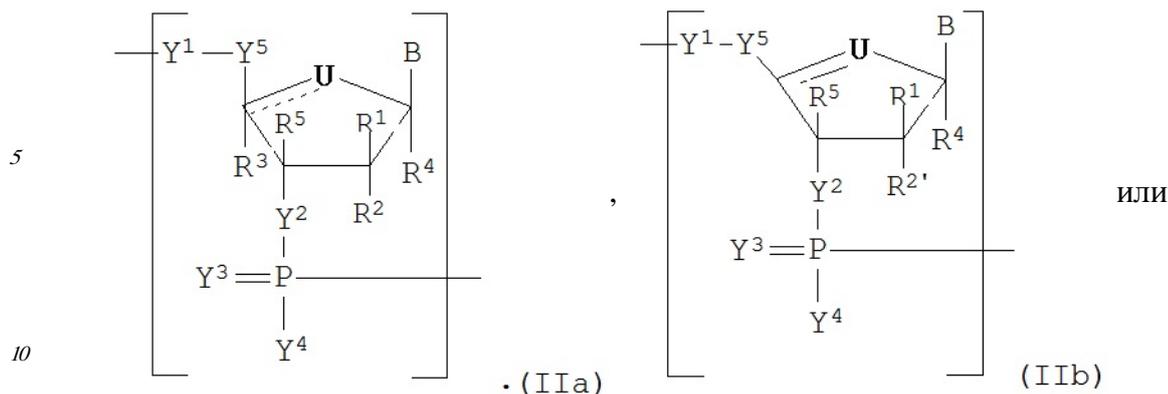
[00165] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)) кольцо, содержащее U, находится в β -D (например, β -D-рибо) конфигурации.

[00166] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)) кольцо, содержащее U, находится в α -L (например, α -L-рибо) конфигурации.

[00167] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), один или более В не являются псевдоуридином (ψ) или 5-метил-цитидином (m^5C). В некоторых вариантах реализации от приблизительно 10% до приблизительно 100% нуклеиновых оснований В не является ψ или m^5C (например, от 10% до 20%, от 10% до 35%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 75%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 98%, от 10% до 99%, от 20% до 35%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 75%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 98%, от 20% до 99%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 75%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 98%, от 50% до 99%, от 50% до 100%, от 75% до 90%, от 75% до 95%, от 75% до 98%, от 75% до 99% и от 75% до 100% и в составе В не является ψ или m^5C). В некоторых вариантах реализации В не является ψ или m^5C .

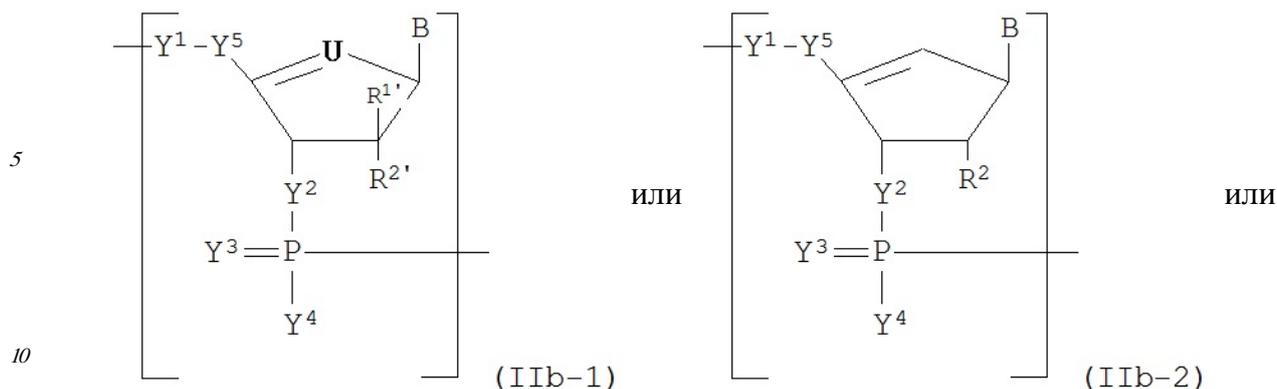
[00168] В некоторых вариантах модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК (например, Формулы (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVl) и (IXa)-(IXr)), если В представляет собой немодифицированное нуклеиновое основание, выбранное из цитозина, гуанина, урацила и аденина, то по меньшей мере один из Y^1 , Y^2 или Y^3 не является О.

[00169] В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат модифицированную рибозу. В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат n связанных нуклеозидов Формулы (IIa)-(IIc):



стереоизомер указанного соединения. В конкретных вариантах реализации U представляет собой O или $C(R^U)_{nu}$, где nu равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил (например, U представляет собой $-CH_2-$ или $-CH-$). В других вариантах реализации каждый из R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо представляет собой H, галоген, гидрокси, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный гидроксиалкокси, необязательно замещенный amino, азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный aminoалкил, необязательно замещенный aminoалкенил, необязательно замещенный aminoалкинил или отсутствует (например, каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой H, галоген, гидрокси, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный алкокси; каждый R^3 и R^4 независимо представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и R^5 представляет собой H или гидрокси) и $---$ представляет собой одинарную связь или двойную связь.

[00170] В конкретных вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК содержит n связанных нуклеозидов Формулы (IIb-1)-(IIb-2):



фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанного соединения. В

некоторых вариантах реализации U представляет собой O или $C(R^U)_{nu}$, где nu равно

15 целому числу от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил (например, U представляет собой $-CH_2-$ или $-CH-$).

В других вариантах реализации каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой H,

галоген, гидроксид, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный

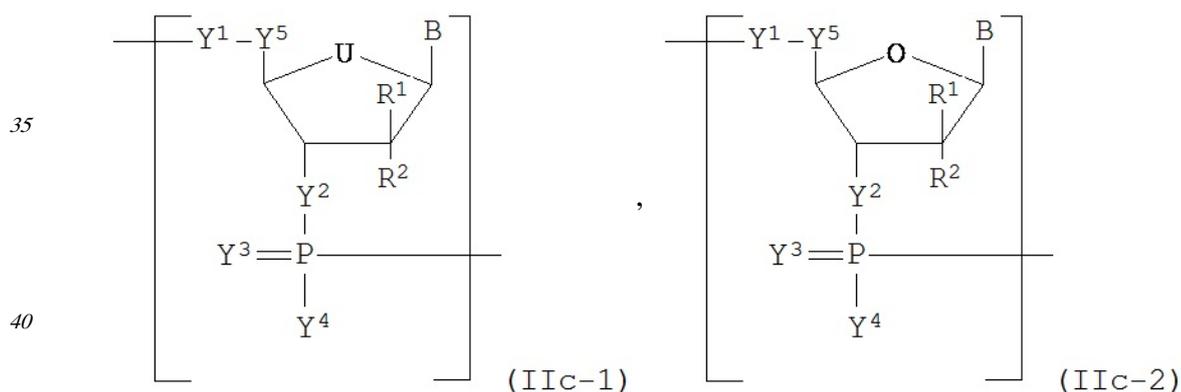
20 алкилокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный гидроксиалкокси, необязательно

замещенный аминазо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный

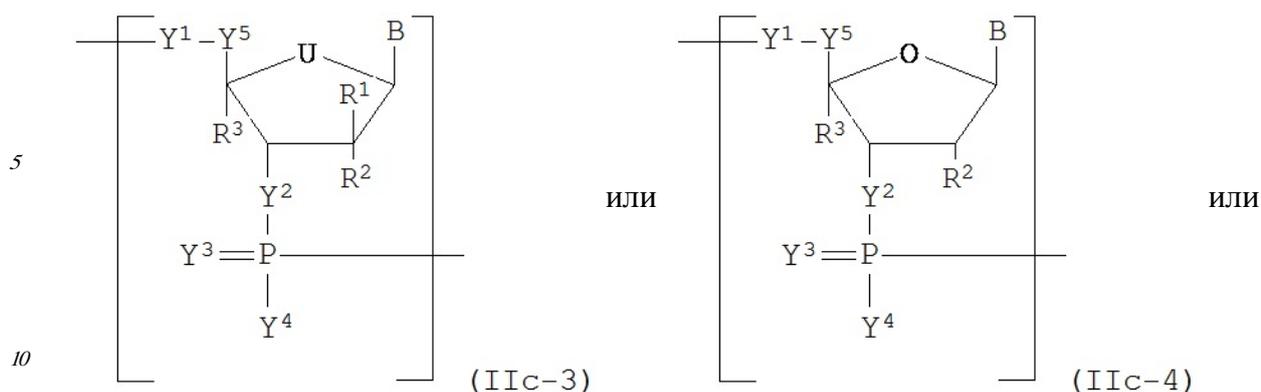
25 аминалкил, необязательно замещенный аминалкенил, необязательно замещенный аминалкинил или отсутствует (например, каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой H, галоген, гидроксид, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный алкокси, например, H, галоген, гидроксид, алкил или алкокси). В конкретных

вариантах реализации R^2 представляет собой гидроксид или необязательно замещенный

30 алкокси (например, метокси, этокси или любой, раскрытый в настоящем документе). [00171] В конкретных вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК содержит n связанных нуклеозидов Формулы (IIc-1)-(IIc-4):



45



фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанного соединения. В

некоторых вариантах реализации U представляет собой O или $C(R^U)_{nu}$, где nu равно

15 целому числу от 0 до 2, и каждый R^U независимо представляет собой H, галоген или необязательно замещенный алкил (например, U представляет собой $-CH_2-$ или $-CH-$).

В некоторых вариантах реализации каждый из R^1 , R^2 и R^3 независимо представляет собой H, галоген, гидроксид, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно

20 замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный гидроксиалкокси, необязательно замещенный аминазо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный аминалкил, необязательно замещенный аминалкенил,

25 необязательно замещенный аминалкинил или отсутствует (например, каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой H, галоген, гидроксид, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный алкокси, например, H, галоген, гидроксид, алкил или

алкокси; и каждый R^3 независимо представляет собой H или необязательно замещенный

30 алкил)). В конкретных вариантах реализации R^2 представляет собой необязательно замещенный алкокси (например, метокси или этокси или любой, раскрытый в настоящем

документе). В конкретных вариантах реализации R^1 представляет собой необязательно

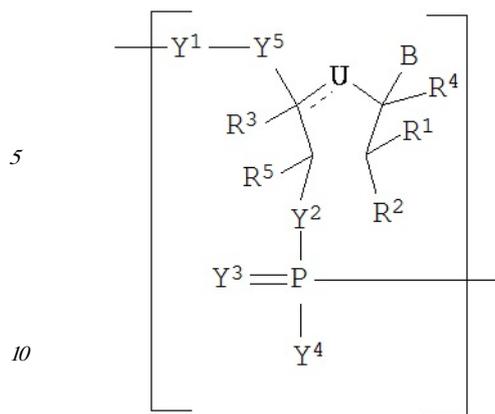
замещенный алкил, и R^2 представляет собой гидроксид. В других вариантах реализации

35 R^1 представляет собой гидроксид, и R^2 представляет собой необязательно замещенный алкил. В дополнительных вариантах реализации R^3 представляет собой необязательно

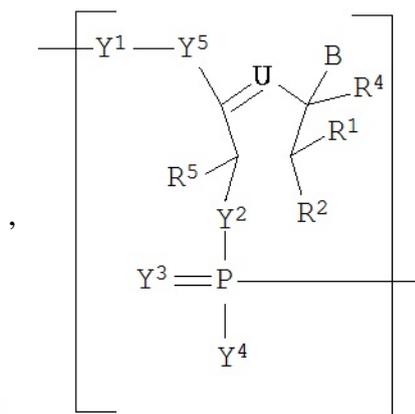
замещенный алкил.

[00172] В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат ациклическую модифицированную рибозу. В некоторых вариантах

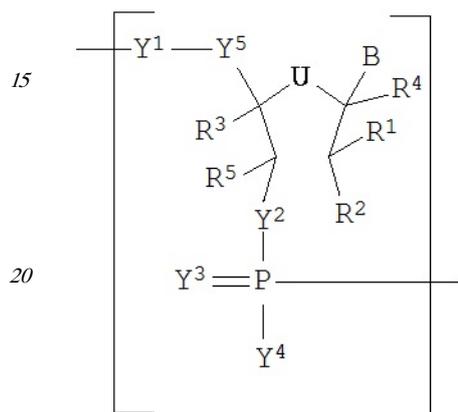
40 реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат n связанных нуклеозидов Формулы (IIId)-(IIIf):



(IIId)



(IIe)

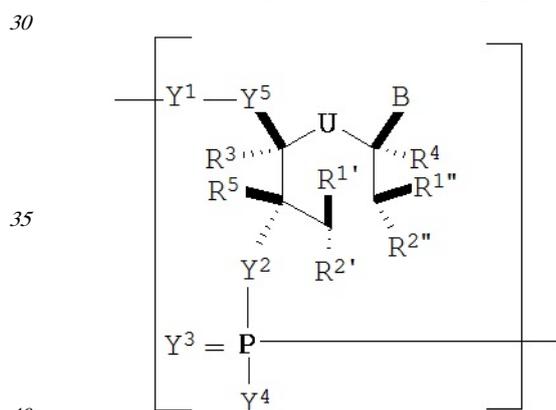


(IIIf)

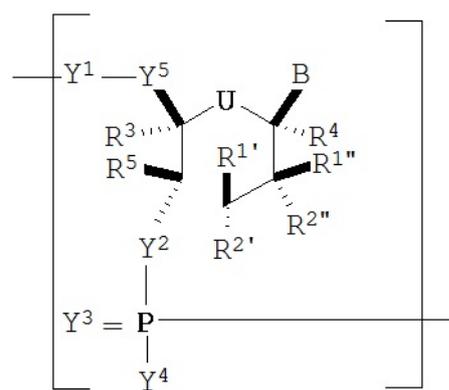
или фармацевтически приемлемую соль или

25 стереоизомер указанного соединения.

[00173] В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или мРНК содержат ациклический модифицированный гекситол. В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или мРНК содержат п связанных нуклеозидов Формулы (IIg)-(IIj):

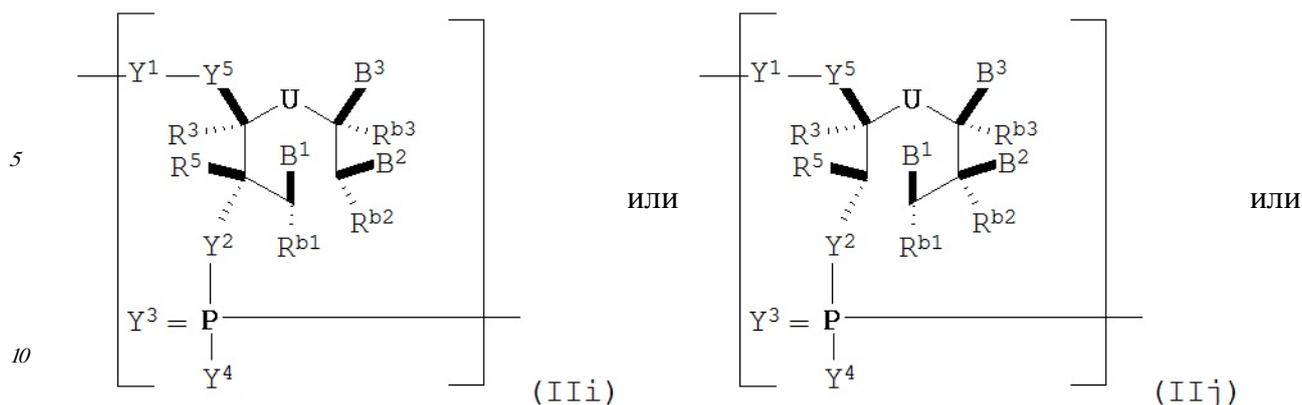


(IIIg)



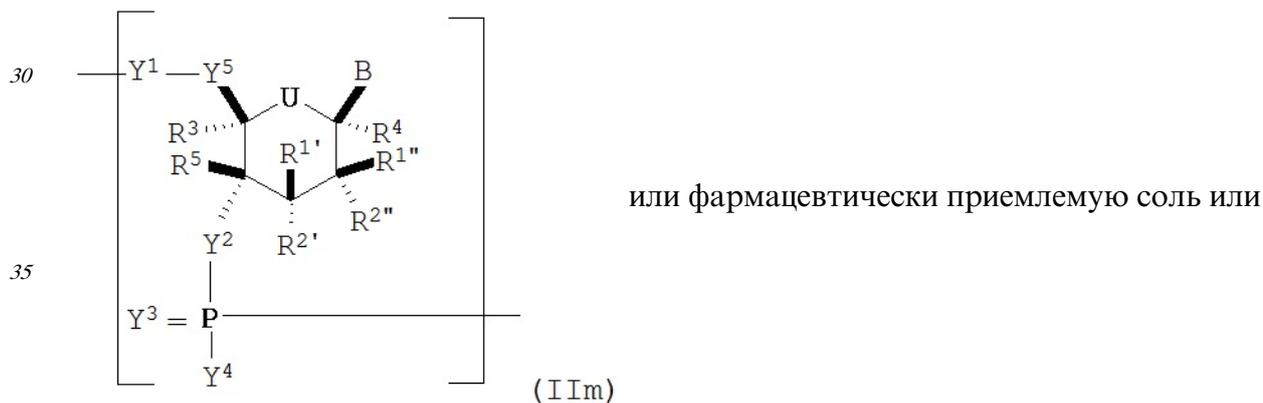
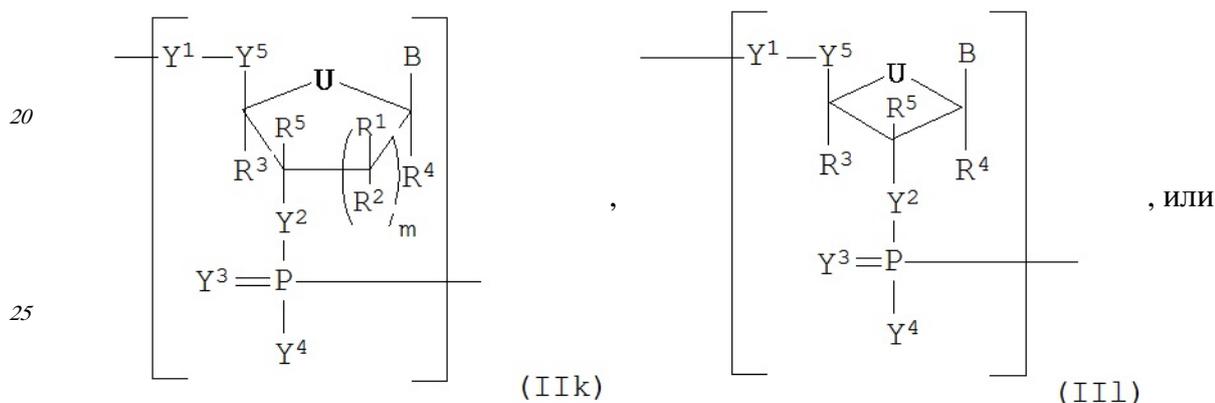
(IIH)

45



фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанного соединения.

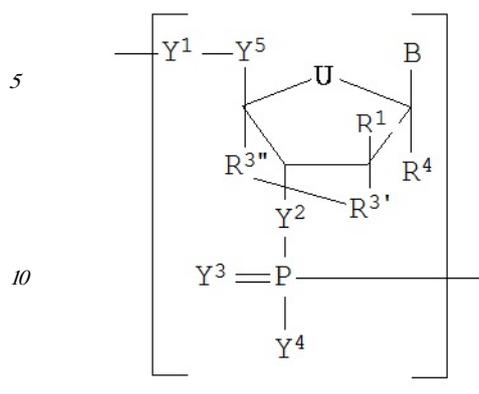
[00174] В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат сахарный остаток, содержащий сокращенное или расширенное
15 кольцо рибозы. В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат n связанных нуклеозидов Формулы (IIk)-(IIm):



40 стереоизомер указанного соединения, где каждый из R^{1'}, R^{1''}, R^{2'} и R^{2''} независимо представляет собой H, галоген, гидроксильную, необязательно замещенную алкильную, необязательно замещенную алкоксильную, необязательно замещенную алкенильную, необязательно замещенную алкинильную, необязательно замещенную аминоалкоксильную, необязательно замещенную алкоксиалкоксильную или отсутствует; и где комбинация R^{2'} и
45 R³ или комбинация R^{2''} и R³ вместе может образовывать необязательно замещенный алкилен или необязательно замещенный гетероалкилен.

[00175] В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат циклическую модифицированную рибозу. В некоторых вариантах

реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат n связанных нуклеозидов Формулы (II_n):

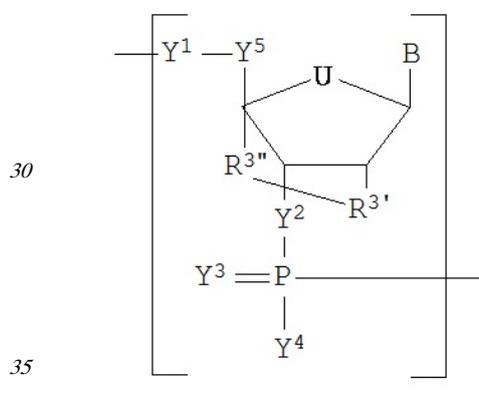


или фармацевтически приемлемую соль или

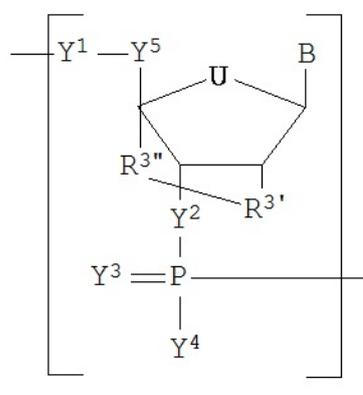
15 стереоизомер указанного соединения, где R^{3'} представляет собой O, S или -NR^{N1}-, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил и R^{3''} представляет собой необязательно замещенный алкилен (например, -CH₂-, -CH₂CH₂- или -CH₂CH₂CH₂-) или необязательно замещенный

20 гетероалкилен (например, -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂OCH₂- или -CH₂CH₂OCH₂-) (например, R^{3'} представляет собой O и R^{3''} представляет собой необязательно замещенный алкилен (например, -CH₂-, -CH₂CH₂- или -CH₂CH₂CH₂-)).

25 [00176] В некоторых вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или ммРНК содержит n связанных нуклеозидов Формулы (II_{n-1})-(II_{n-2}):



или



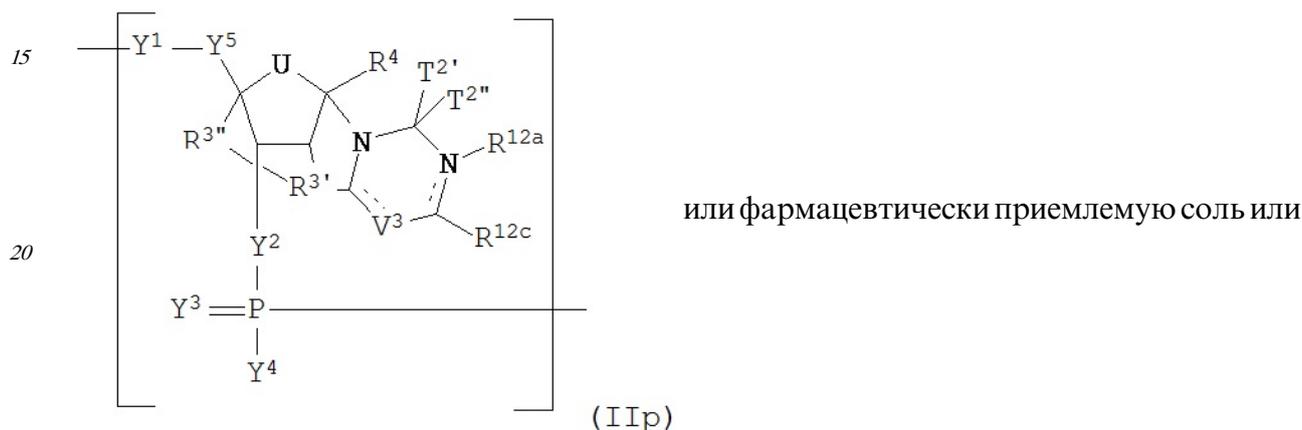
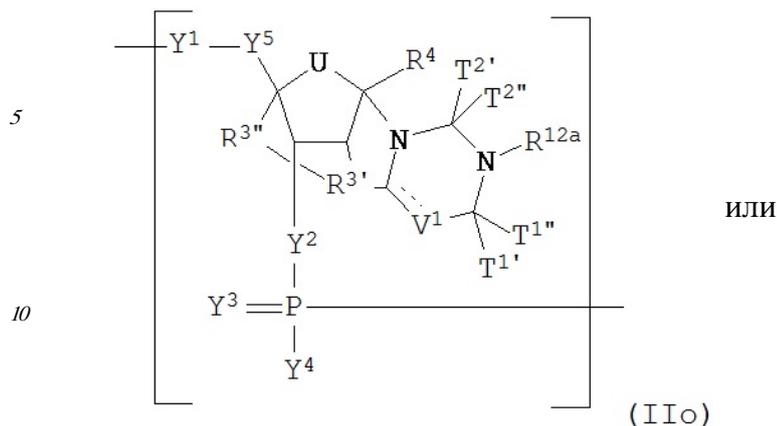
или

30 фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанного соединения, где R^{3'} представляет собой O, S или -NR^{N1}-, где R^{N1} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный арил, и R^{3''} представляет собой необязательно замещенный алкилен (например, -CH₂-, -CH₂CH₂- или -CH₂CH₂CH₂-) или необязательно замещенный гетероалкилен (например, -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂OCH₂- или -CH₂CH₂OCH₂-) (например, R^{3'} представляет собой O, и R^{3''} представляет собой

40 необязательно замещенный алкилен (например, -CH₂-, -CH₂CH₂- или -CH₂CH₂CH₂-)).

[00177] В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат модифицированную циклическую рибозу, которая образует тетрациклический гетероцикл. В некоторых вариантах реализации модифицированные

нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат n связанных нуклеозидов Формулы (IIo):



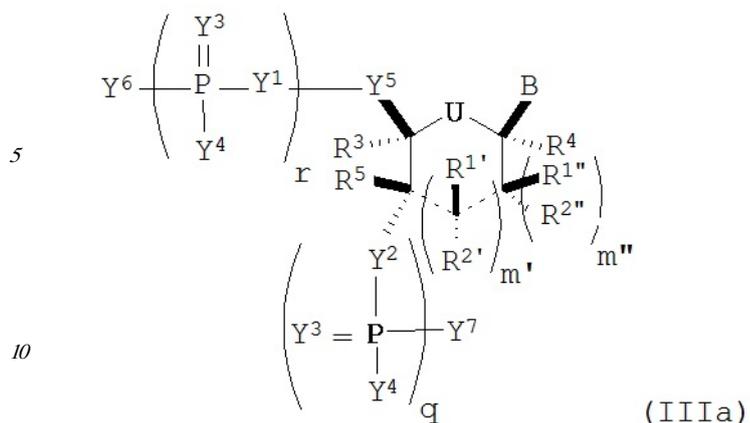
25 стереоизомер указанного соединения, где R^{12a} , R^{12c} , T^1 , T^1'' , T^2 , T^2'' , V^1 и V^3 являются такими, как раскрыто в настоящем документе.

[00178] Любые формулы модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК могут включать одно или более нуклеиновых оснований, раскрытых в настоящем документе (например, Формулы (b1)-(b43)).

30 [00179] В одном варианте реализации данного изобретения раскрыты способы получения модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК, содержащих по меньшей мере один нуклеотид (например, молекулы ммРНК), где модифицированная нуклеиновая кислота содержит n нуклеозидов Формулы (Ia), как определено в настоящем документе:



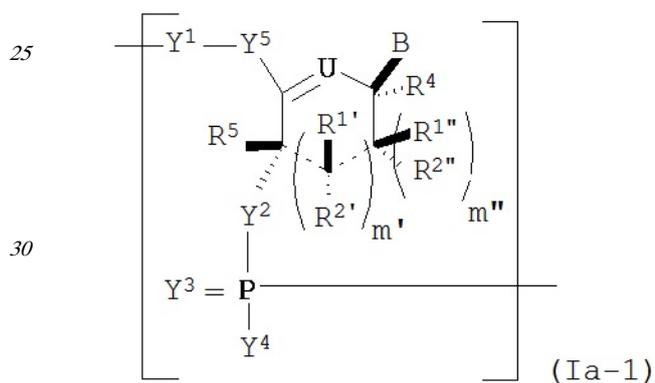
Формулы (IIIa), как определено в настоящем документе:



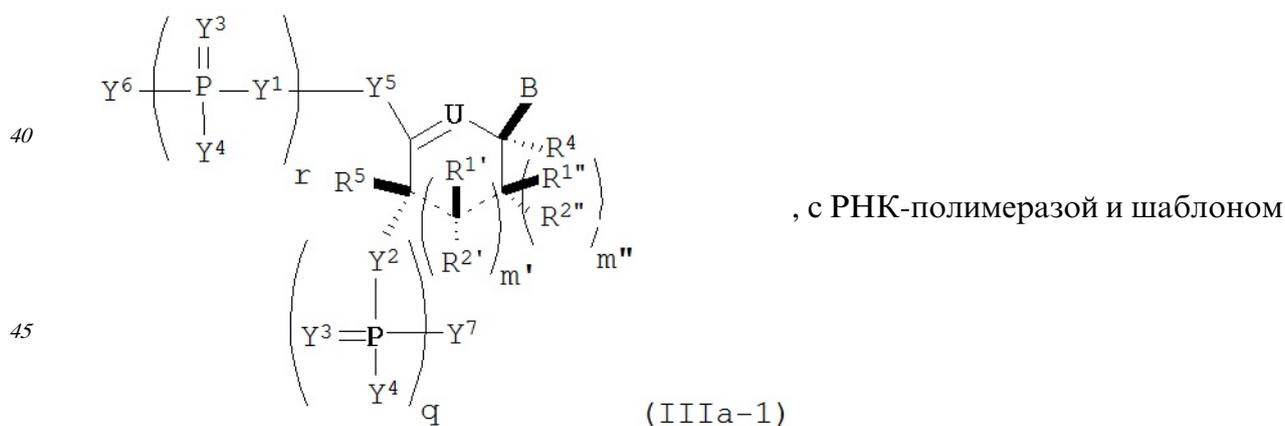
с РНК-полимеразой и шаблоном кДНК.

15 [00180] В дополнительном варианте реализации данного изобретения раскрыты способы амплификации модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК, содержащих по меньшей мере один нуклеотид (например, молекулы ммРНК), причем способ включает: реакцию соединения Формулы (IIIa), как определено в настоящем документе, с праймером, шаблоном кДНК и РНК-полимеразой.

20 [00181] В одном варианте реализации данного изобретения раскрыты способы получения модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК, содержащих по меньшей мере один нуклеотид (например, молекулы ммРНК), причем модифицированная нуклеиновая кислота содержит n нуклеозидов Формулы (Ia-1), как определено в настоящем документе:



35 и, при этом, способ включает реакцию соединения Формулы (IIIa-1), как определено в настоящем документе:

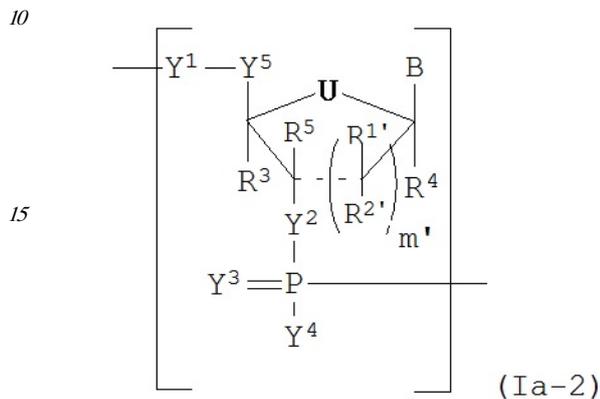


кДНК.

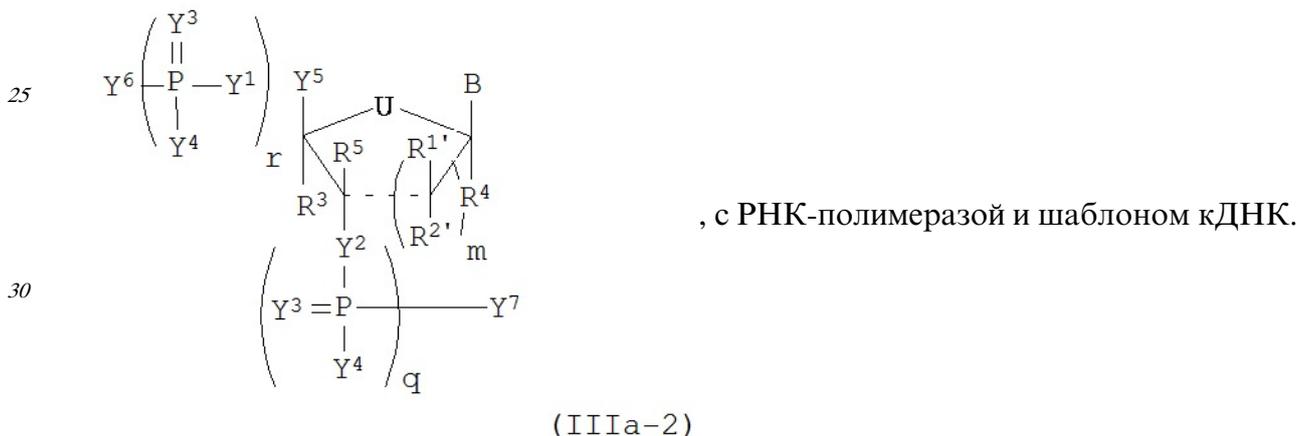
, с РНК-полимеразой и шаблоном

[00182] В дополнительном варианте реализации данного изобретения раскрыты способы амплификации модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК, содержащих по меньшей мере один нуклеотид (например, молекулы мРНК), причем способ включает реакцию соединения Формулы (Ша-1), как определено в настоящем документе, с праймером, шаблоном кДНК и РНК-полимеразой.

[00183] В одном варианте реализации данного изобретения раскрыты способы получения модифицированной мРНК, содержащей по меньшей мере один нуклеотид (например, молекулы мРНК), где полинуклеотид содержит n нуклеозидов Формулы (Ia-2), как определено в настоящем документе:



причем способ включает реакцию соединения Формулы (Ша-2), как определено в настоящем документе:



[00184] В дополнительном варианте реализации данного изобретения раскрыты способы амплификации модифицированной мРНК, содержащей по меньшей мере один нуклеотид (например, молекулы мРНК), причем способ включает

[00185] реакцию соединения Формулы (Ша-2), как определено в настоящем документе, с праймером, шаблоном кДНК и РНК-полимеразой.

[00186] В некоторых вариантах реализации реакция может быть повторена от 1 до приблизительно 7000 раз. В любом из вариантов реализации, раскрытых в настоящем документе, В может быть нуклеиновым основанием Формулы (b1)-(b43).

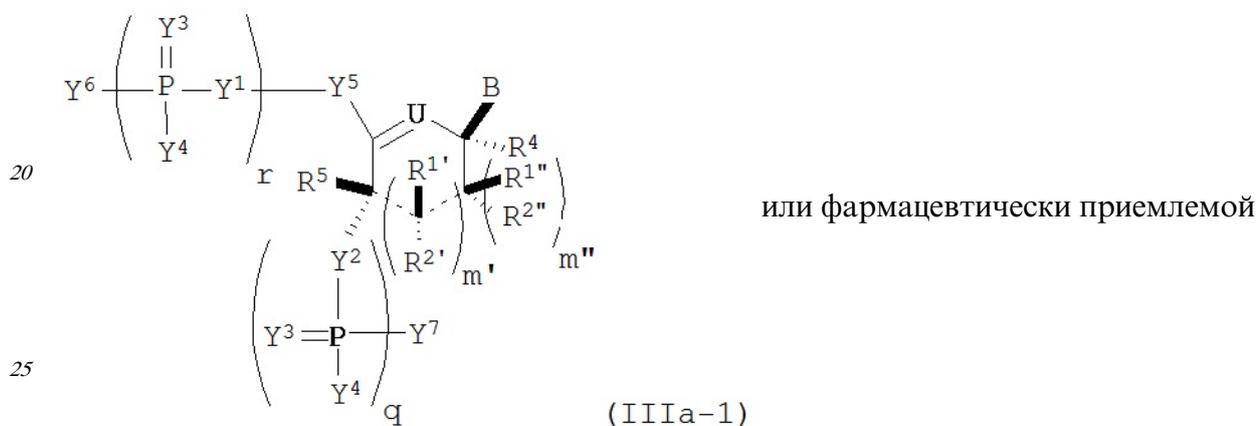
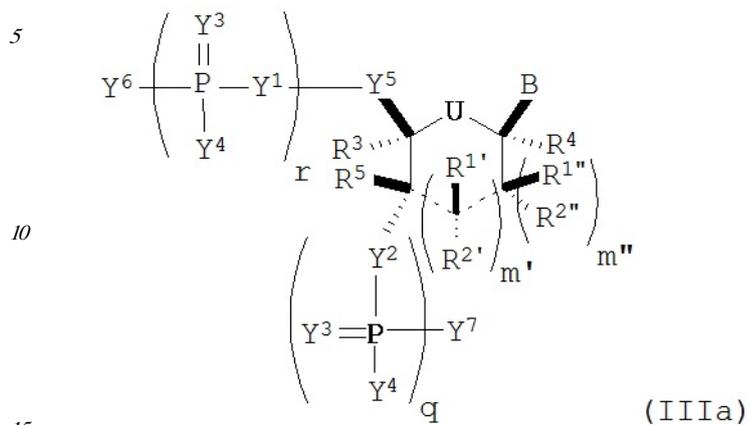
[00187] Модифицированные нуклеиновые кислоты и мРНК необязательно могут содержать 5' и/или 3' фланкирующие участки, которые раскрыты в настоящем документе.

Модифицированные молекулы РНК (например, мРНК)

[00188] Настоящее изобретение также включает строительные блоки молекул модифицированной РНК (мРНК), например, модифицированные рибонуклеозиды, модифицированные рибонуклеотиды. Например, указанные мРНК могут быть пригодны для получения модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК по

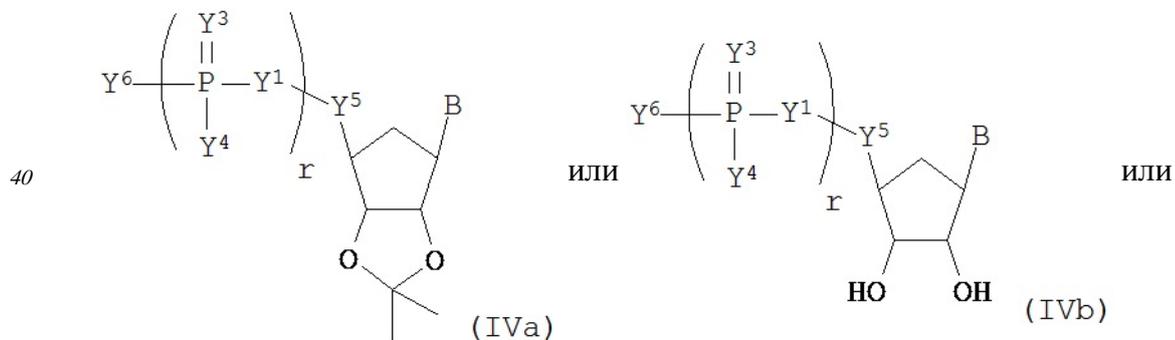
изобретению.

[00189] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока представлена Формулами (IIIa) или (IIIa-1):



30 солью или стереоизомером указанного соединения, где заместители являются такими, как раскрыто в настоящем документе (например, для Формулы (Ia) и (Ia-1)) и, где, если В представляет собой немодифицированное нуклеиновое основание, выбранное из цитозина, гуанина, урацила и аденина, то по меньшей мере один из Y¹, Y² или Y³ не является О.

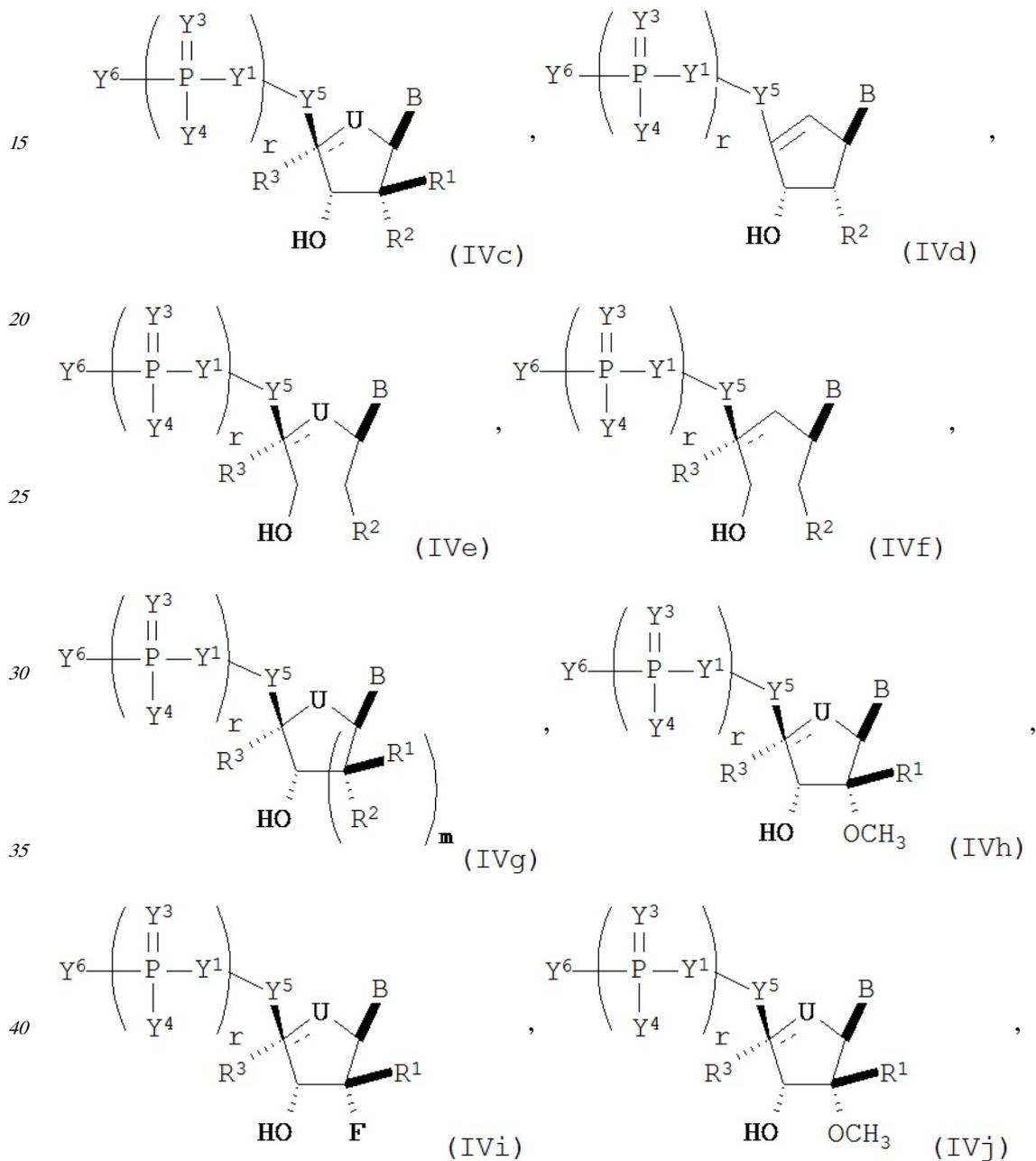
35 [00190] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в модифицированную нуклеиновую кислоту или мРНК, представлена Формулами (IVa)-(IVb):

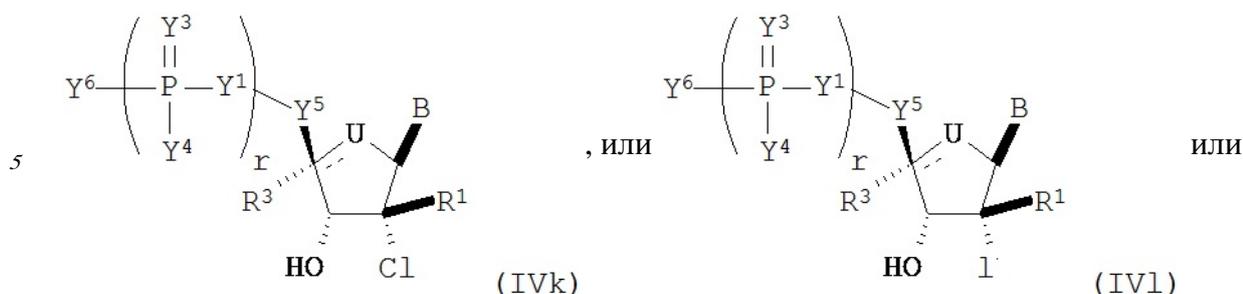


45 фармацевтически приемлемой солью или стереоизомером указанного соединения, где В является таким, как раскрыто в настоящем документе (например, любой из (b1)-(b43)). В конкретных вариантах реализации Формулы (IVa) или (IVb) объединены с модифицированным урацилом (например, любой из формул (b1)-(b9), (b21)-(b23) и (b28))

-(b31), такой как формула (b1), (b8), (b28), (b29) или (b30)). В конкретных вариантах реализации Формулы (IVa) или (IVb) объединены с модифицированным цитозином (например, любой из формул (b10)-(b14), (b24), (b25) и (b32)-(b36), такой как формула (b10) или (b32)). В конкретных вариантах реализации Формулы (IVa) или (IVb) объединены с модифицированным гуанином (например, любая из формул (b15)-(b17) и (b37)-(b40)). В конкретных вариантах реализации Формулы (IVa) или (IVb) объединены с модифицированным аденином (например, любая из формул (b18)-(b20) и (b41)-(b43)).

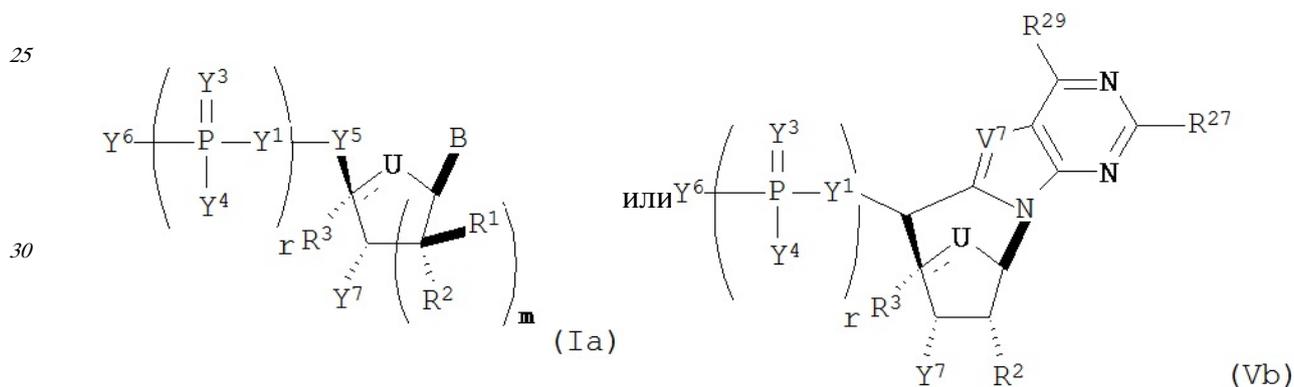
[00191] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представлена Формулами (IVc)-(IVk):





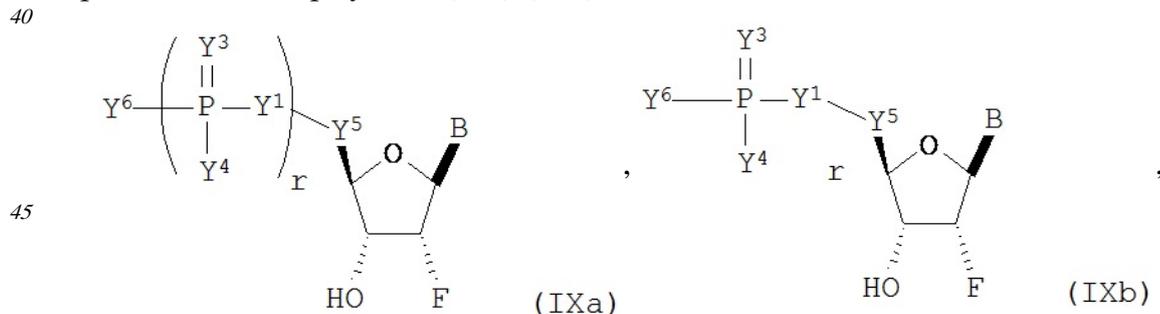
фармацевтически приемлемой солью или стереоизомером указанного соединения, где В является таким, как раскрыто в настоящем документе (например, любой из (b1)-(b43)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IVc)-(IVk) объединена с модифицированным урацилом (например, любой из формул (b1)-(b9), (b21)-(b23) и (b28)-(b31), такой как формула (b1), (b8), (b28), (b29) или (b30)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IVc)-(IVk) объединена с модифицированным цитозином (например, любой из формул (b10)-(b14), (b24), (b25) и (b32)-(b36), такой как формула (b10) или (b32)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IVc)-(IVk) объединена с модифицированным гуанином (например, любой из формул (b15)-(b17) и (b37)-(b40)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IVc)-(IVk) объединена с модифицированным аденином (например, любой из формул (b18)-(b20) и (b41)-(b43)).

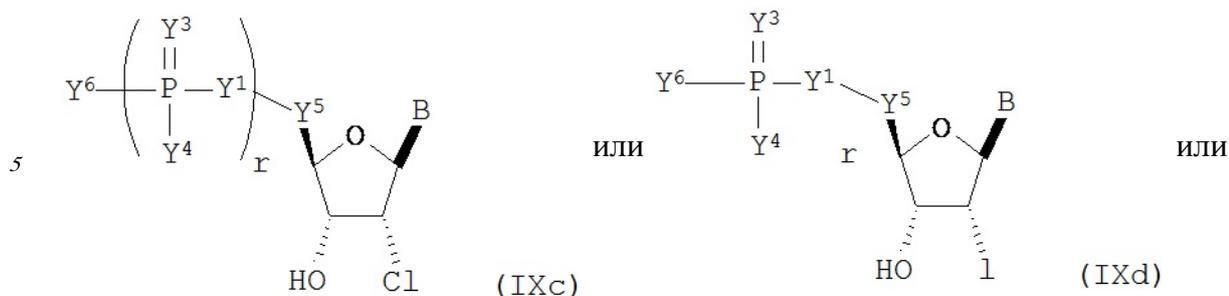
[00192] В других вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представлена Формулами (Va) или (Vb):



или фармацевтически приемлемой солью или стереоизомером указанного соединения, где В является таким, как раскрыто в настоящем документе (например, любой из (b1)-(b43)).

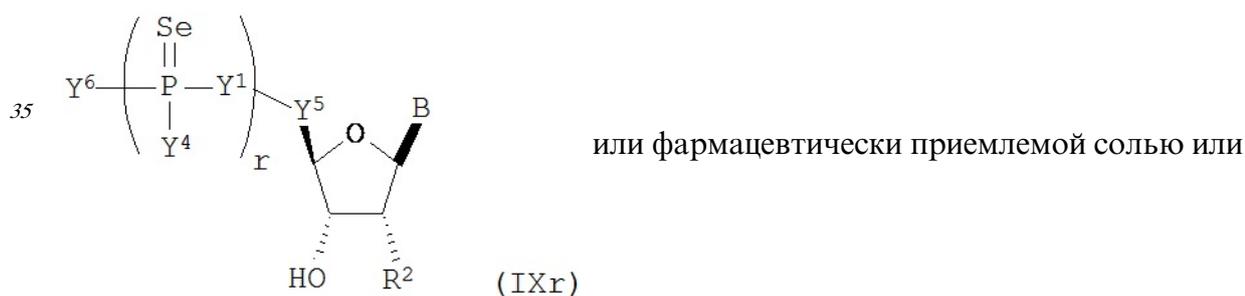
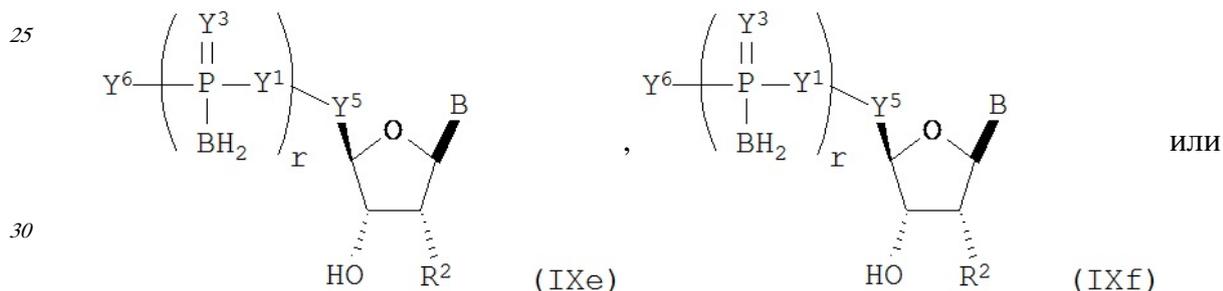
[00193] В других вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представлена Формулами (IXa)-(IXd):





фармацевтически приемлемой солью или стереоизомером указанного соединения, где
 10 В является таким, как раскрыто в настоящем документе (например, любой из (b1)-(b43)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXa)-(IXd) объединена с модифицированным урацилом (например, любой из формул (b1)-(b9), (b21)-(b23) и (b28)-(b31), такой как формула (b1), (b8), (b28), (b29) или (b30)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXa)-(IXd) объединена с модифицированным цитозином
 15 (например, любой из формул (b10)-(b14), (b24), (b25) и (b32)-(b36), такой как формула (b10) или (b32)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXa)-(IXd) объединена с модифицированным гуанином (например, любой из формул (b15)-(b17) и (b37)-(b40)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXa)-(IXd) объединена с модифицированным аденином (например, любой из формул (b18)-(b20) и (b41)-(b43)).

20 [00194] В других вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представлена Формулами (IXe)-(IXg):

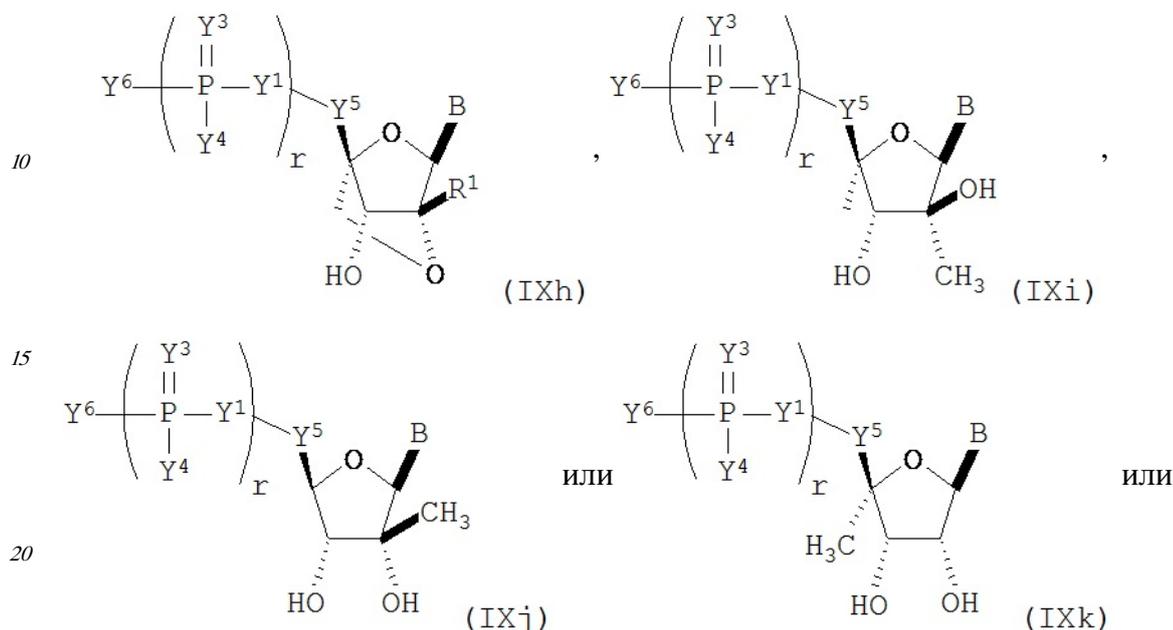


стереоизомером указанного соединения, где В является таким, как раскрыто в настоящем документе (например, любой из (b1)-(b43)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXe)-(IXg) объединена с модифицированным урацилом (например, любой из формул (b1)-(b9), (b21)-(b23) и (b28)-(b31), такой как формула (b1), (b8), (b28), (b29) или (b30)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXe)-(IXg) объединена с модифицированным цитозином (например, любой из формул (b10)-(b14), (b24), (b25) и (b32)-(b36), такой как формула (b10) или (b32)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXe)-(IXg) объединена с модифицированным гуанином (например, любой из формул (b15)-(b17) и (b37)-(b40)). В конкретных вариантах реализации одна

45

из Формул (IXe)-(IXg) объединена с модифицированным аденином (например, любой из формул (b18)-(b20) и (b41)-(b43)).

[00195] В других вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представлена Формулами (IXh)-(IXk):

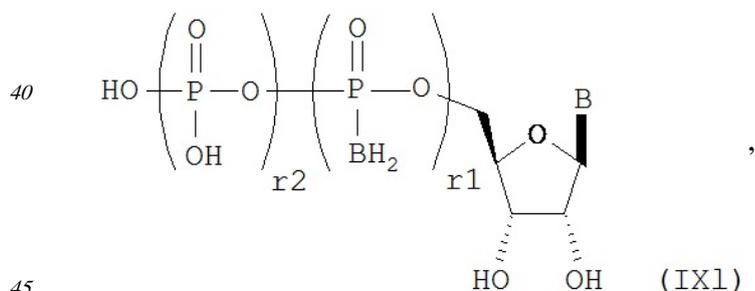


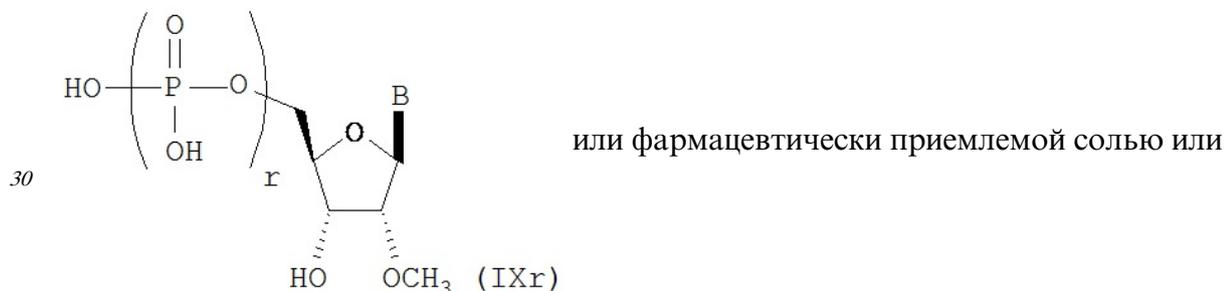
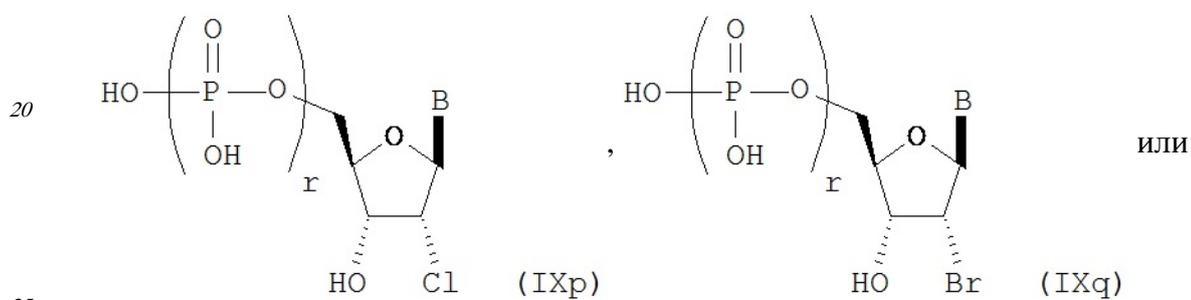
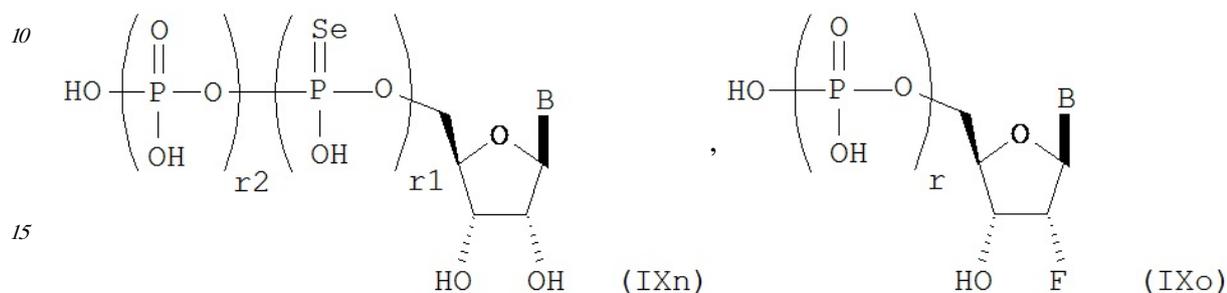
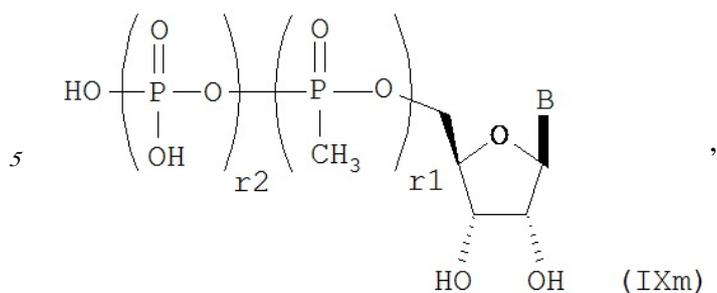
фармацевтически приемлемой солью или стереоизомером указанного соединения, где В является таким, как раскрыто в настоящем документе (например, любой из (b1)-(b43)).

25 В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXh)-(IXk) объединена с модифицированным урацилом (например, любой из формул (b1)-(b9), (b21)-(b23) и (b28)-(b31), такой как формула (b1), (b8), (b28), (b29) или (b30)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXh)-(IXk) объединена с модифицированным цитозином (например, любой из формул (b10)-(b14), (b24), (b25) и (b32)-(b36), такой как формула (b10) или (b32)).

30 В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXh)-(IXk) объединена с модифицированным гуанином (например, любой из формул (b15)-(b17) и (b37)-(b40)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXh)-(IXk) объединена с модифицированным аденином (например, любой из формул (b18)-(b20) и (b41)-(b43)).

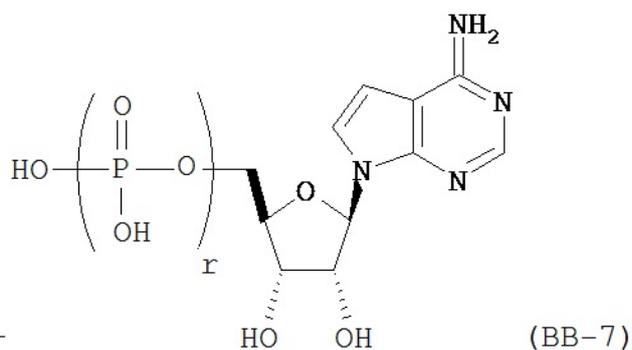
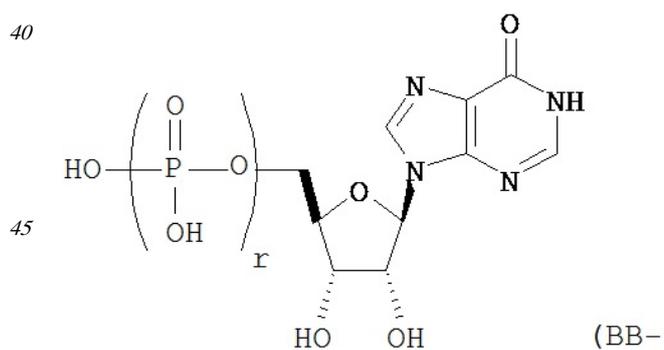
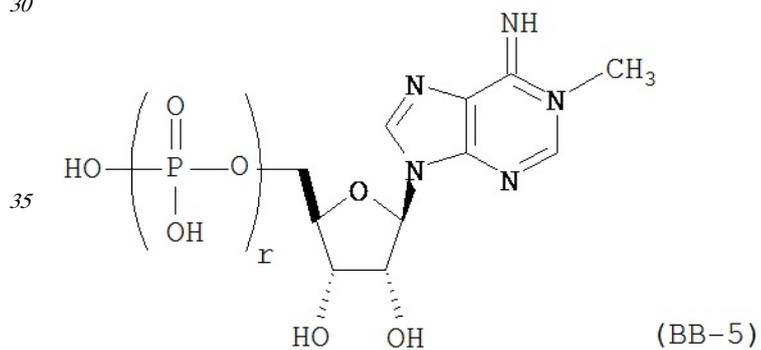
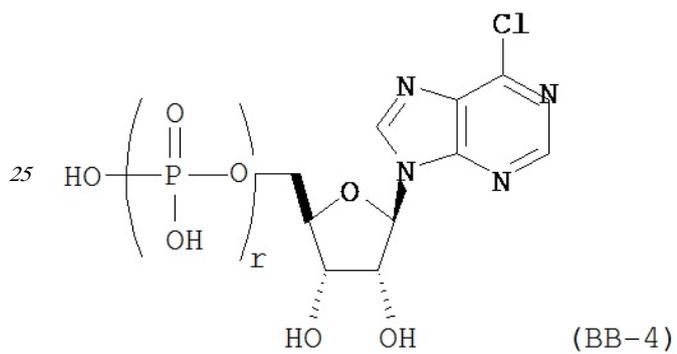
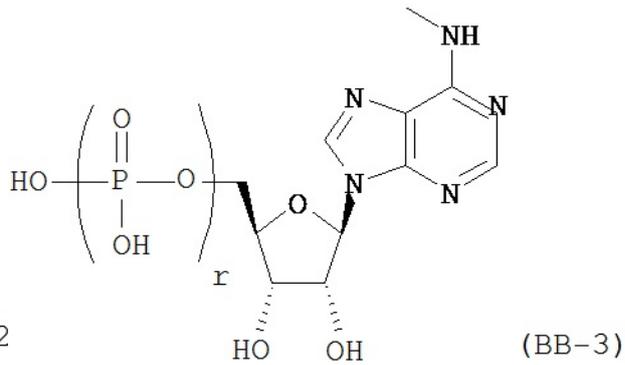
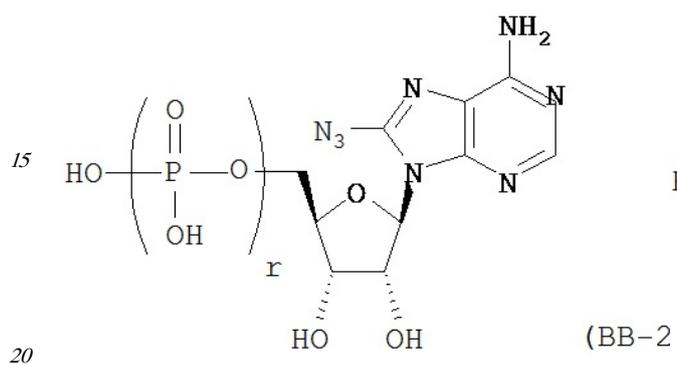
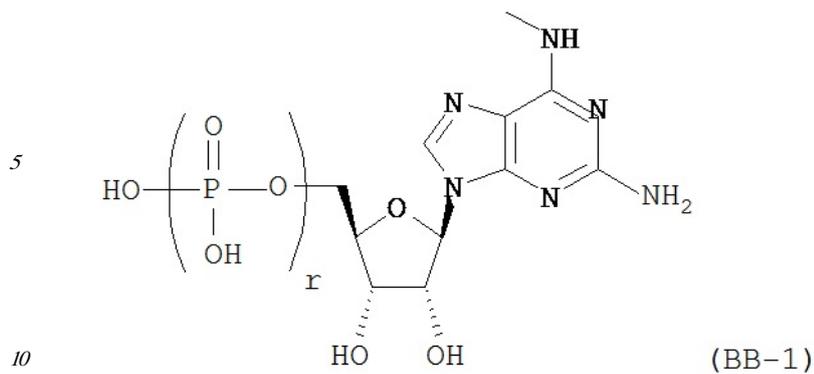
[00196] В других вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представлена Формулами (IXl)-(IXr):

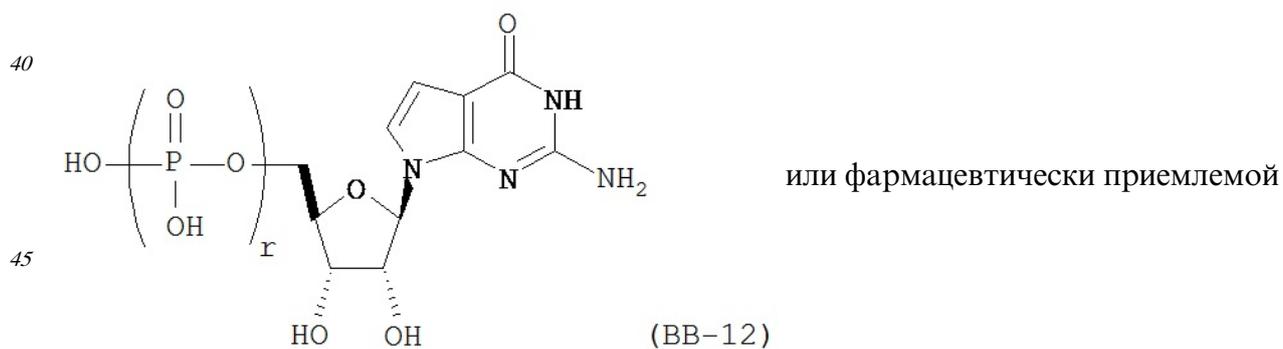
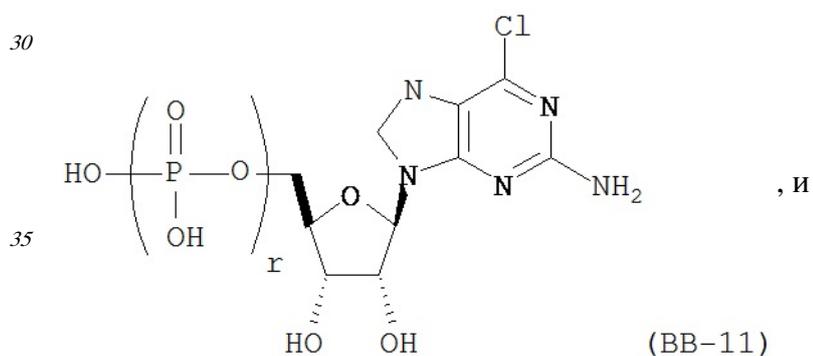
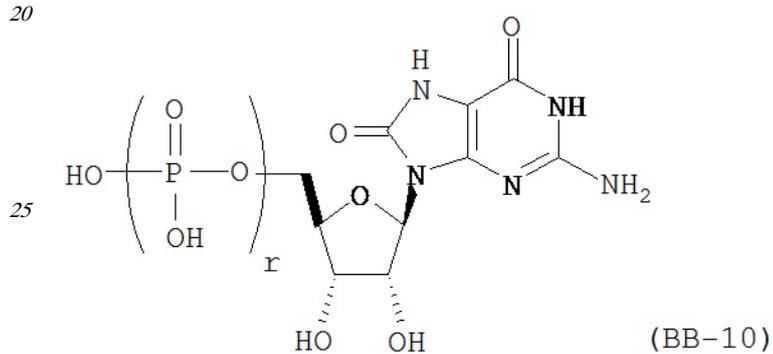
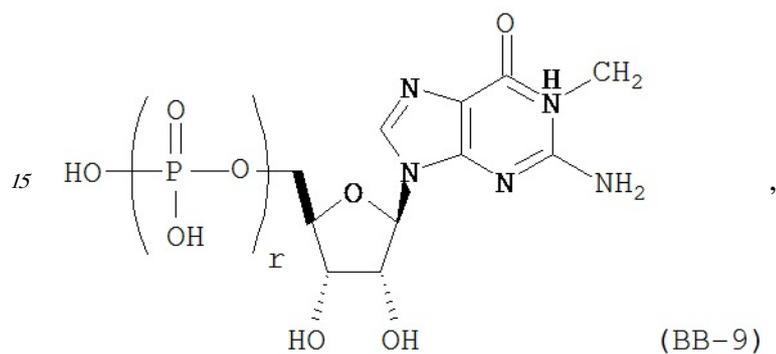
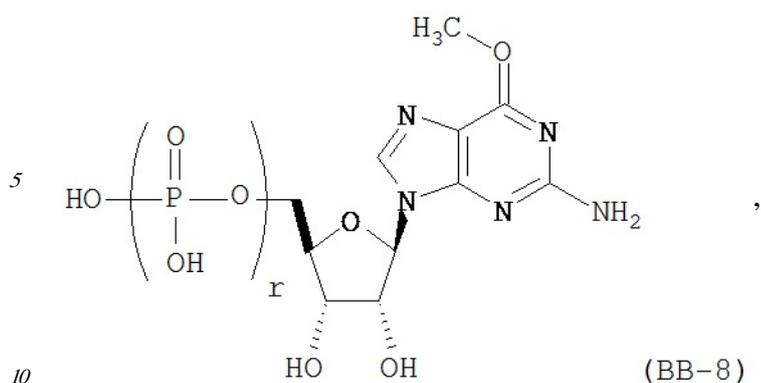




35 стереоизомером указанного соединения, где каждое из r_1 и r_2 независимо равно целому числу от 0 до 5 (например, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5) и В является таким, как раскрыто в настоящем документе (например, любой из (b1)-(b43)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXI)-(IXr) объединена с модифицированным урацилом (например, любой из формул (b1)-(b9), (b21)-(b23) и (b28)-(b31), такой как формула (b1), (b8), (b28), (b29) или (b30)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXI)-(IXr) объединена с модифицированным цитозином (например, любой из формул (b10)-(b14), (b24), (b25) и (b32)-(b36), такой как формула (b10) или (b32)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXI)-(IXr) объединена с модифицированным гуанином (например, любой из формул (b15)-(b17) и (b37)-(b40)). В конкретных вариантах реализации одна из Формул (IXI)-(IXr) объединена с модифицированным аденином (например, любой из формул (b18)-(b20) и (b41)-(b43)).

45 [00197] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК, может быть выбрана из группы, состоящей из:



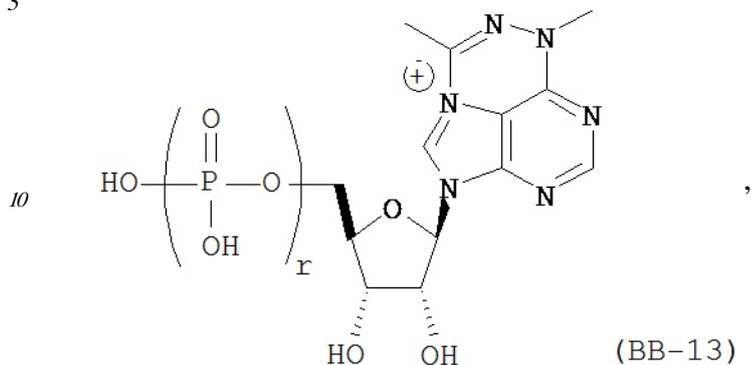


соли или стереоизомера указанных соединений, где каждое r независимо равно целому

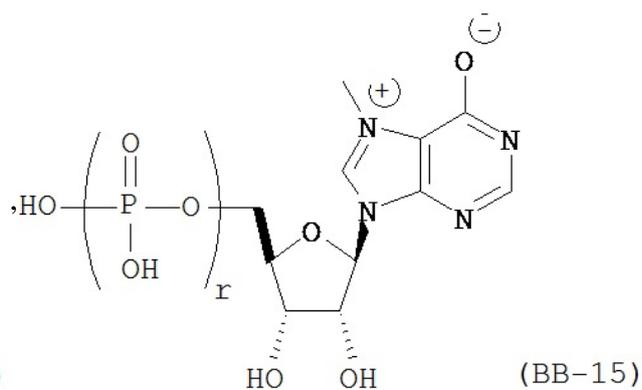
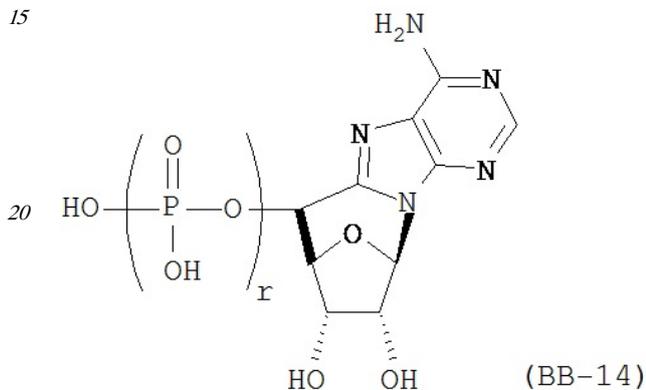
числу от 0 до 5 (например, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5).

[00198] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, может быть выбрана из группы, состоящей из:

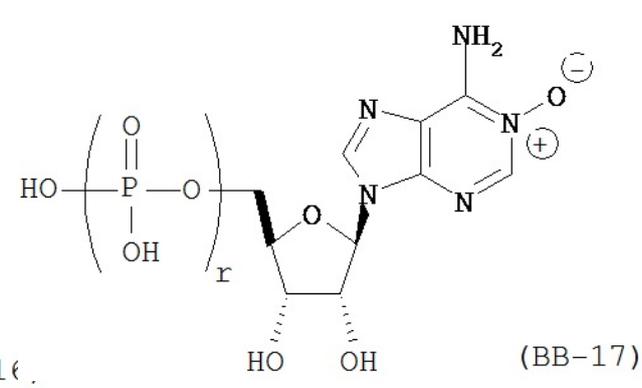
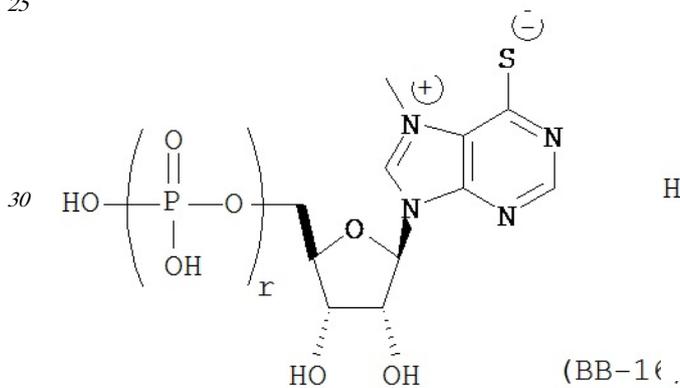
5



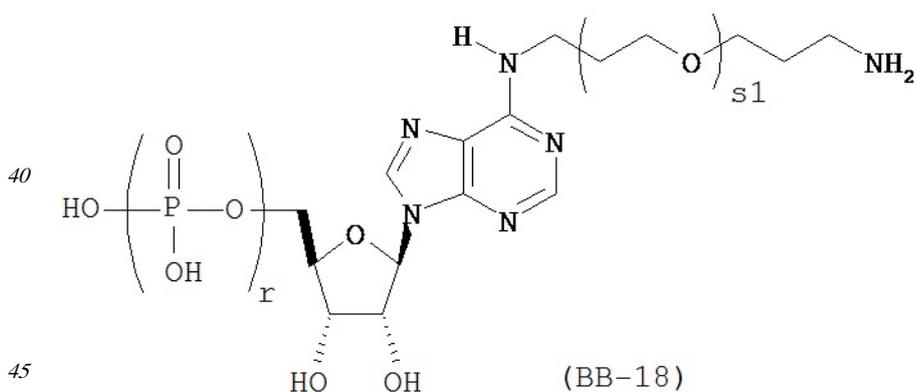
15

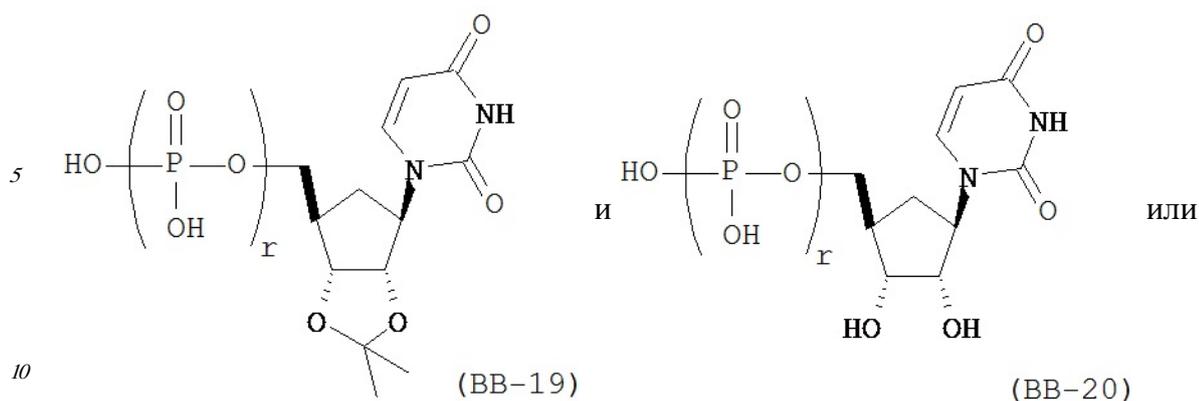


30



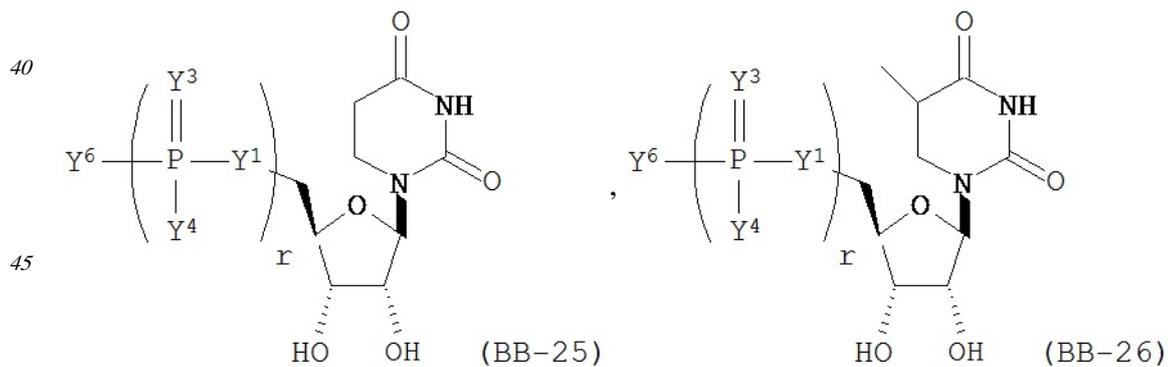
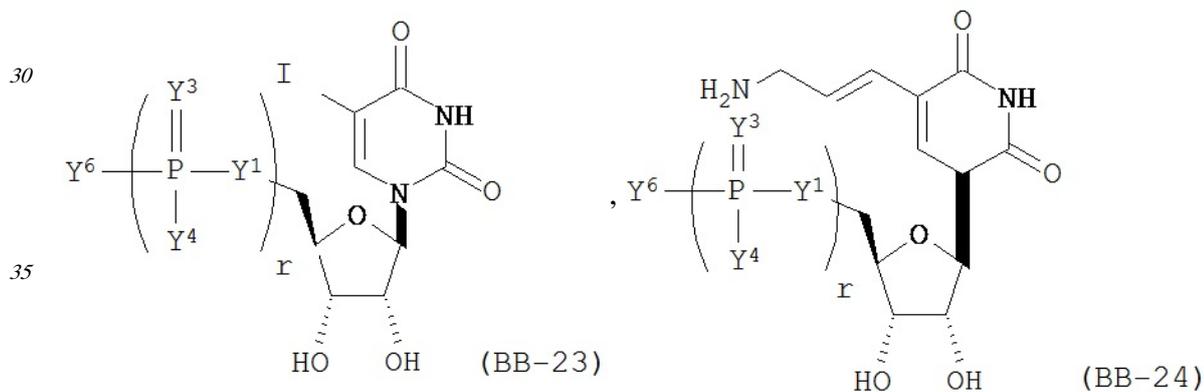
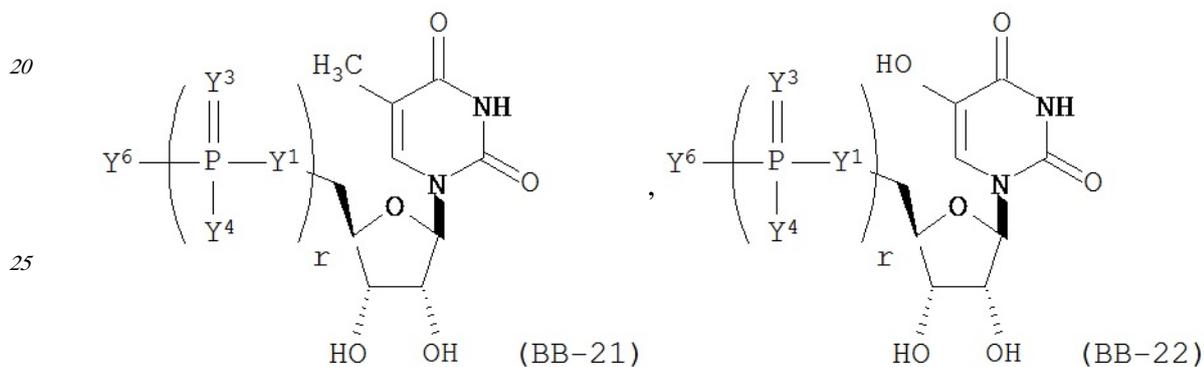
45

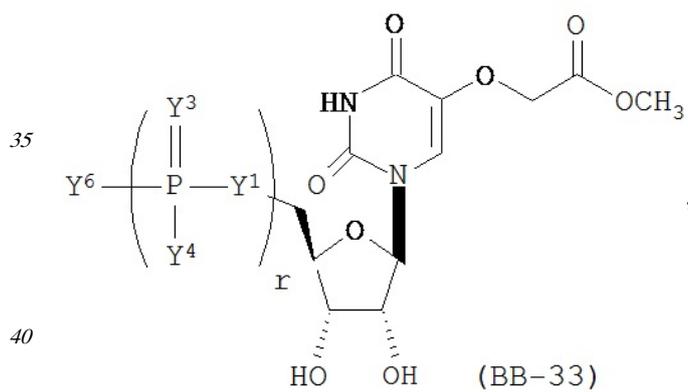
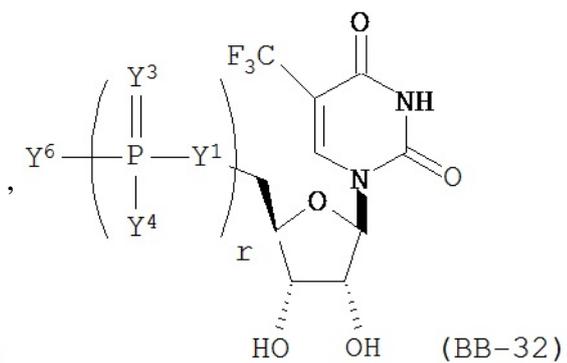
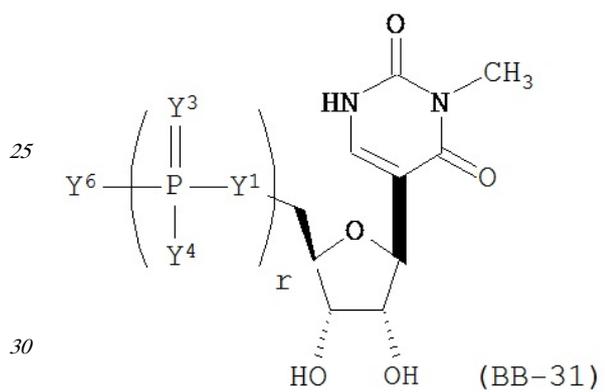
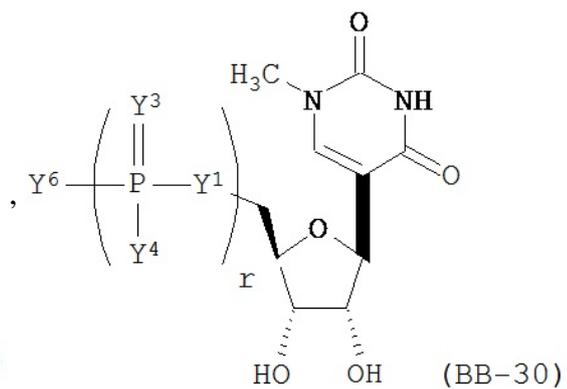
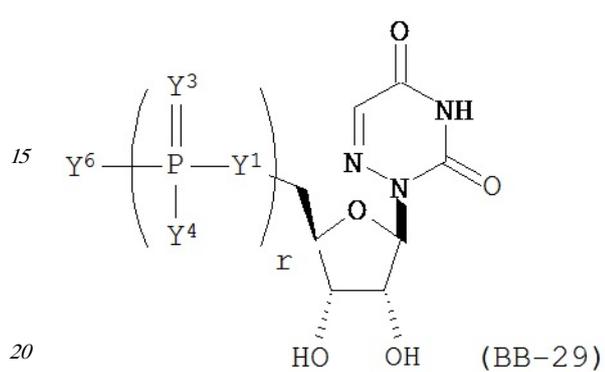
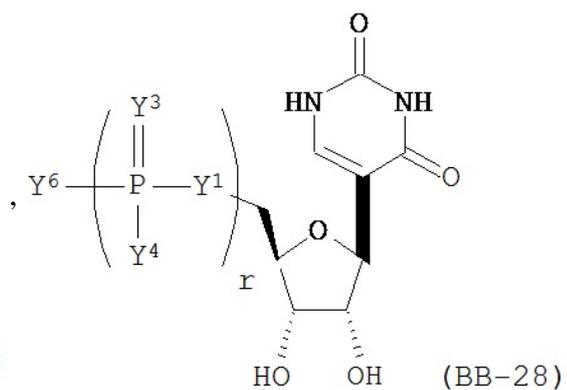
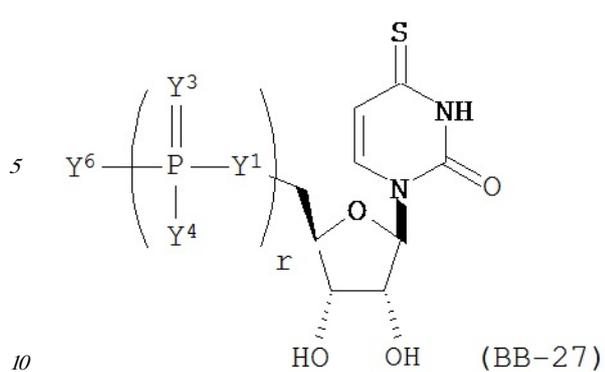




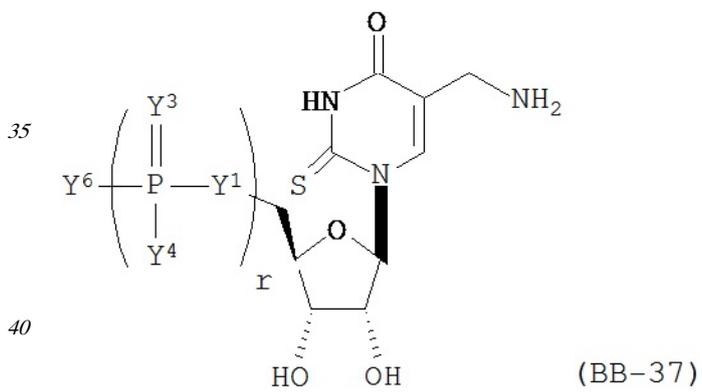
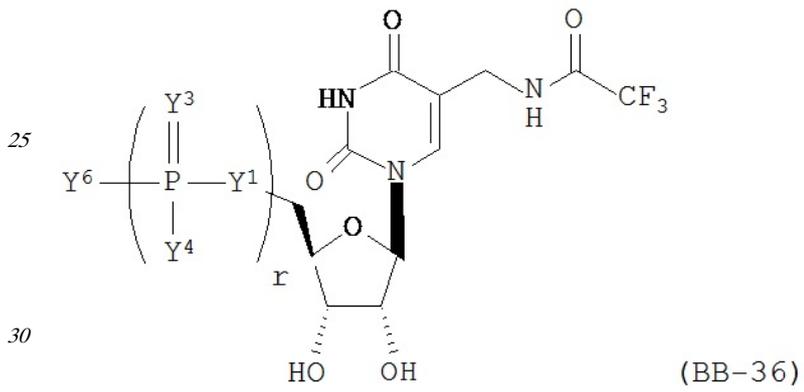
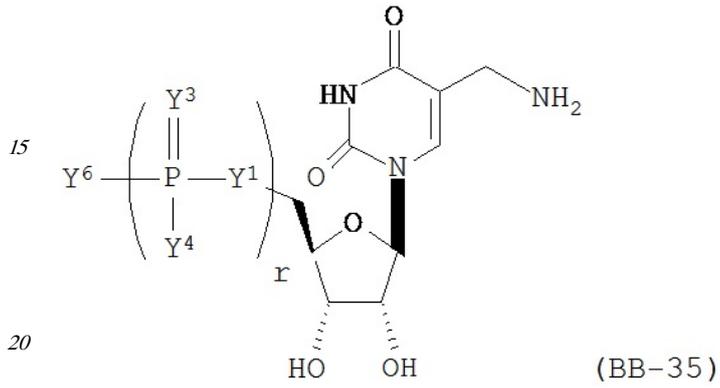
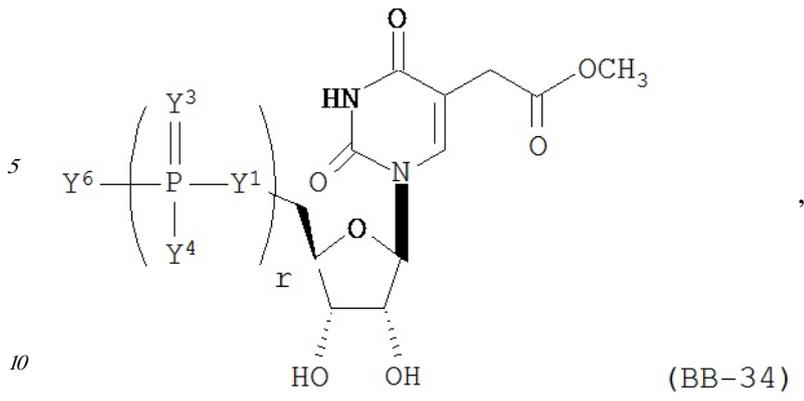
фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера указанных соединений, где каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5 (например, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5), и $s1$ является таким, как раскрыто в настоящем документе.

15 [00199] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в нуклеиновую кислоту (например, РНК, мРНК или ммРНК), представляет собой модифицированный уридин (например, выбранный из группы, состоящей из:

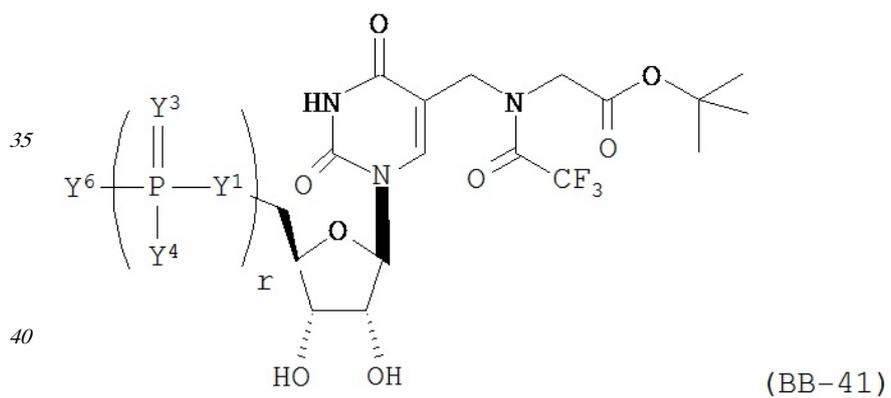
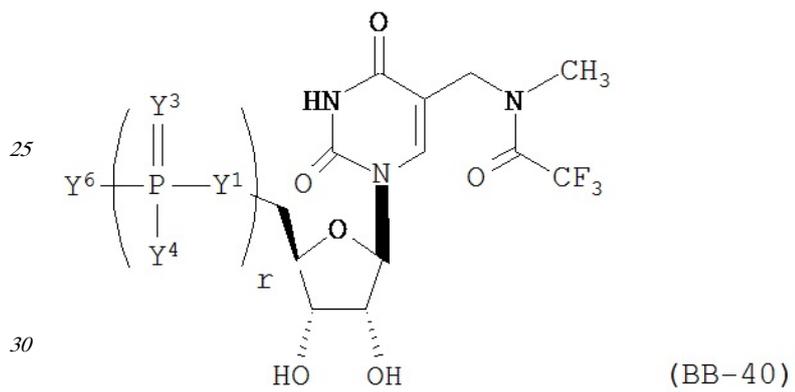
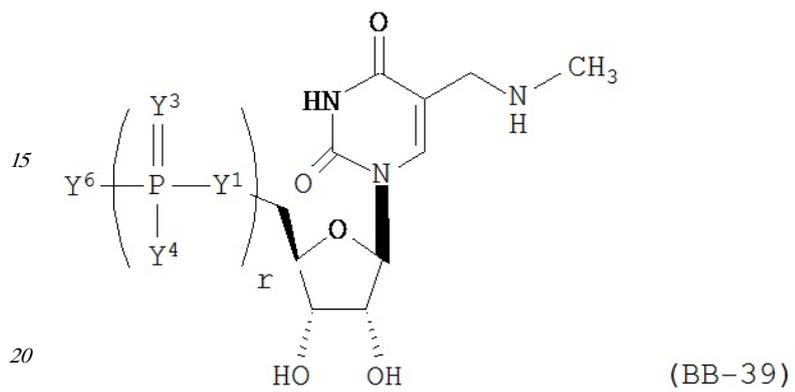
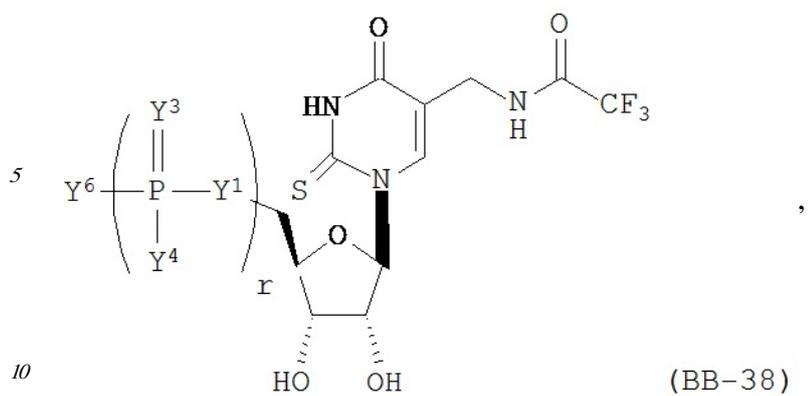




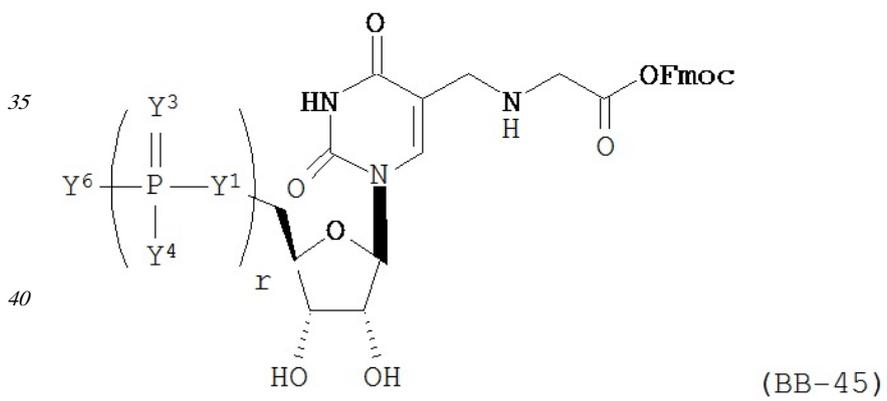
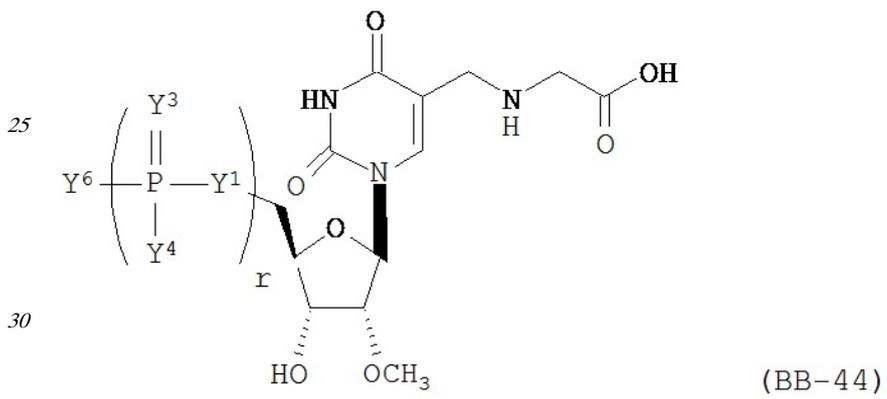
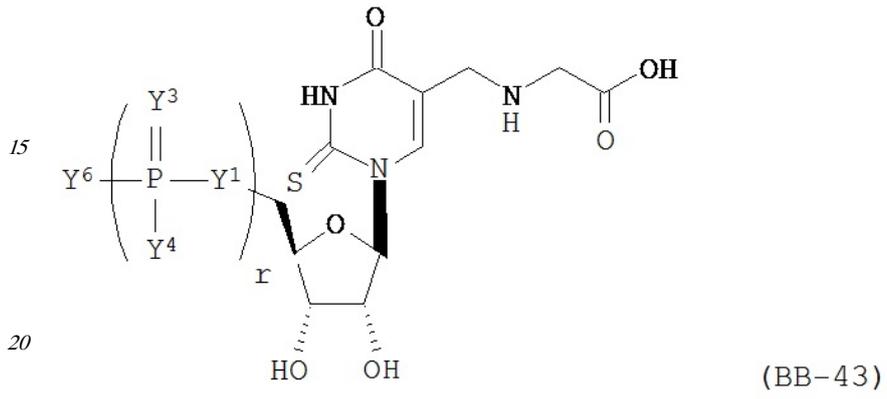
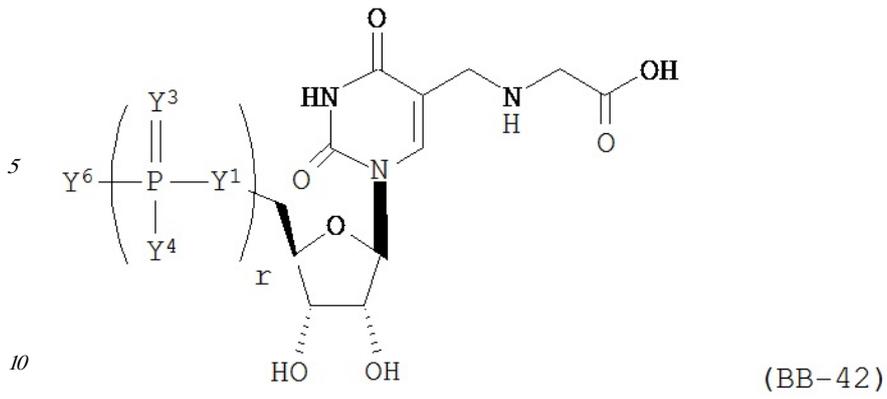
45



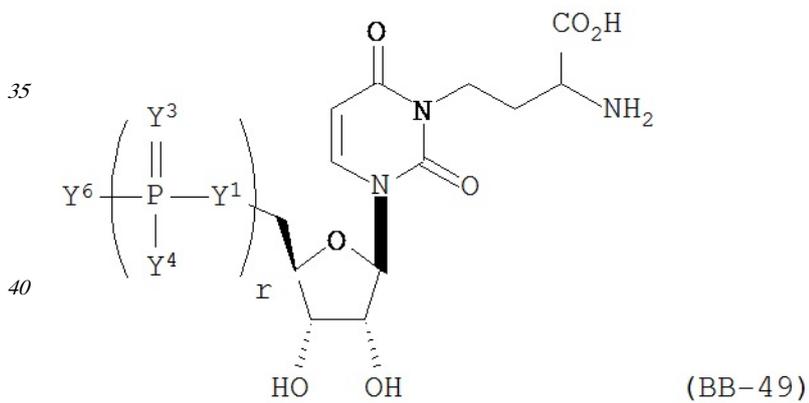
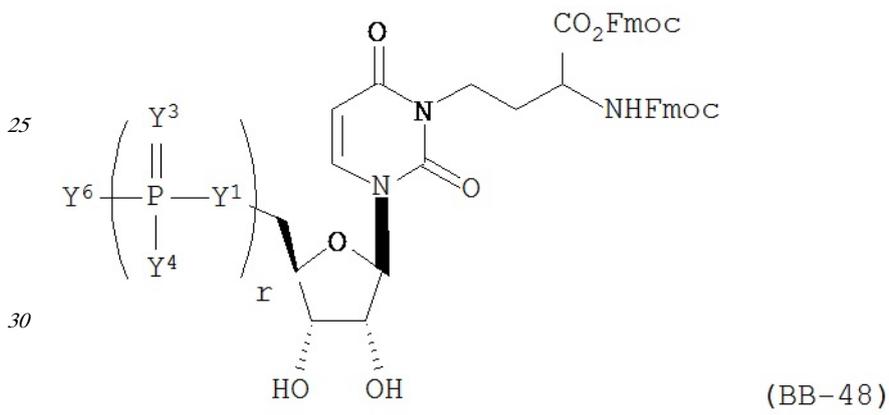
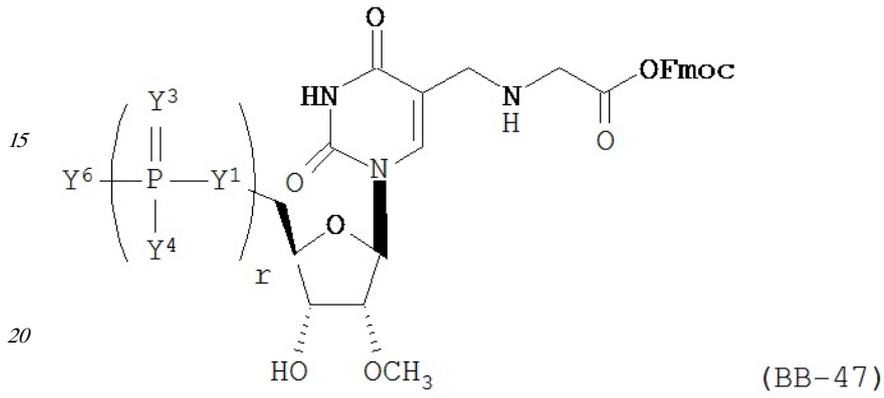
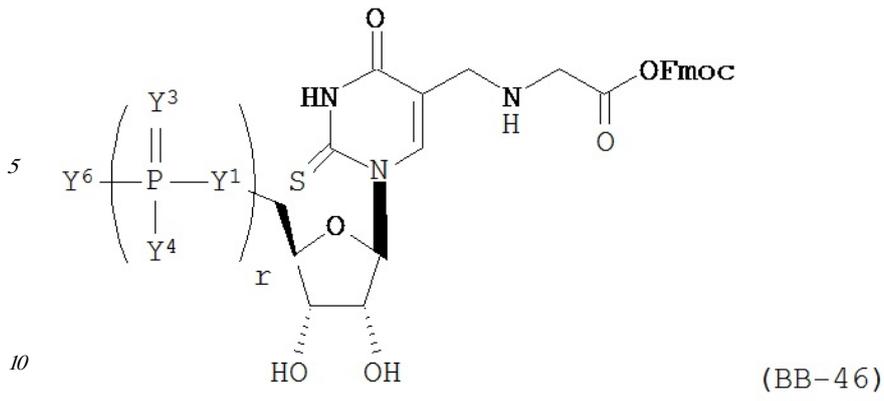
45



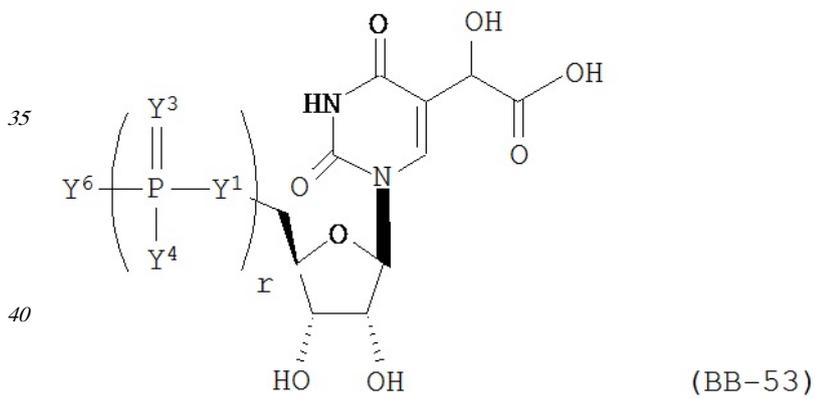
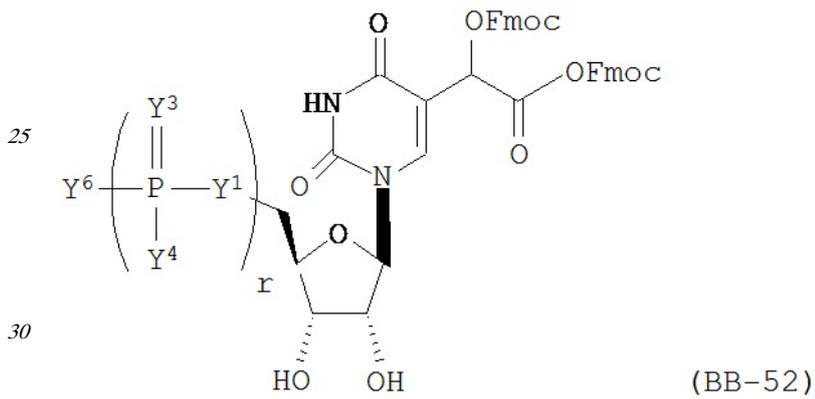
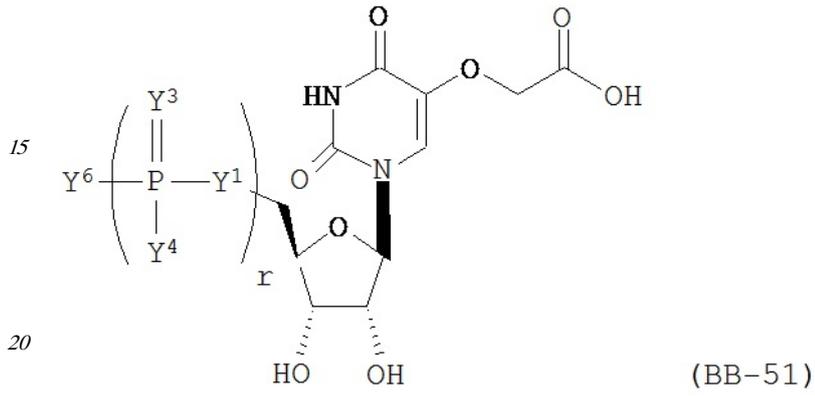
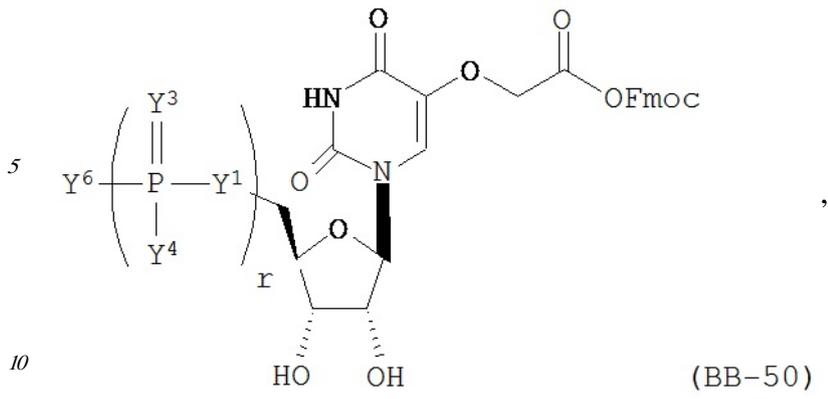
45



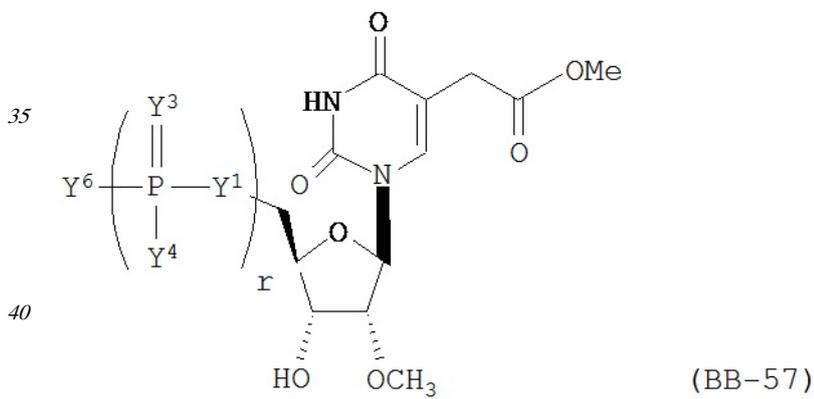
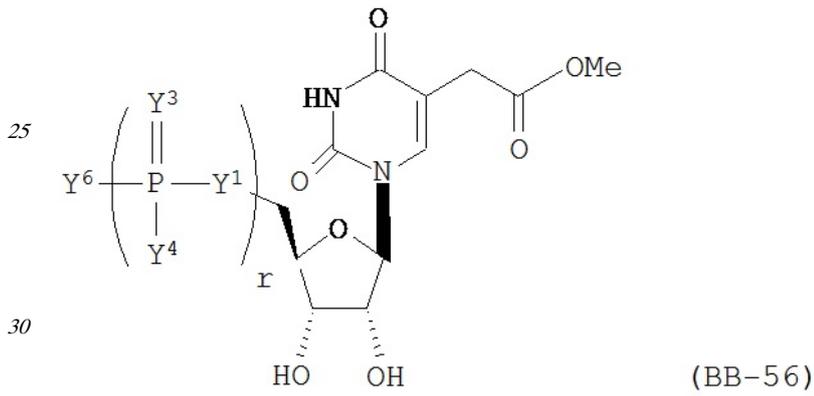
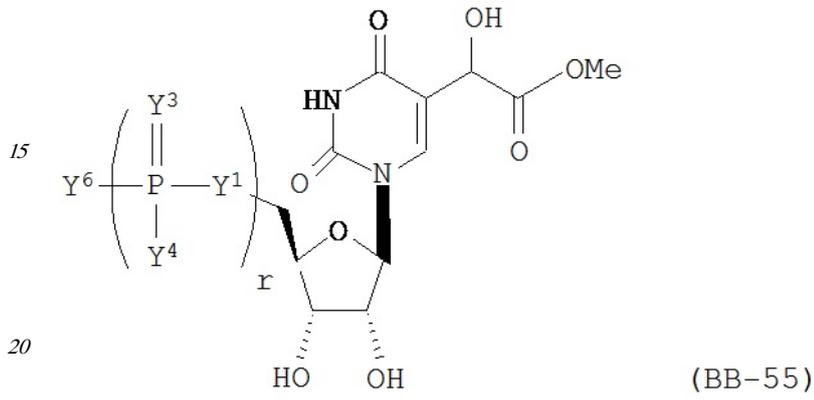
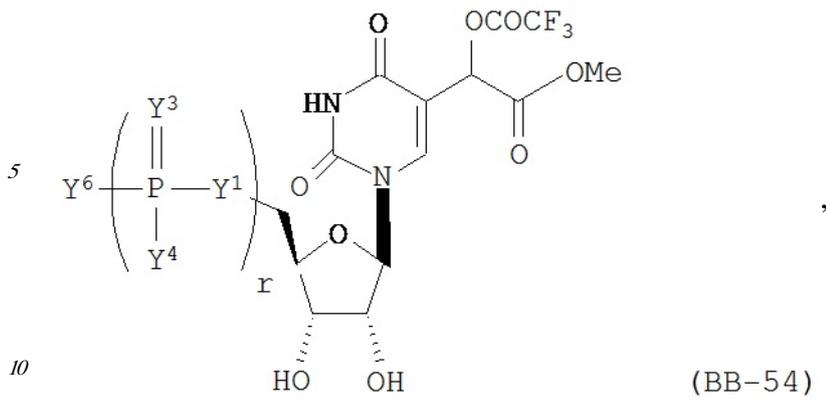
45



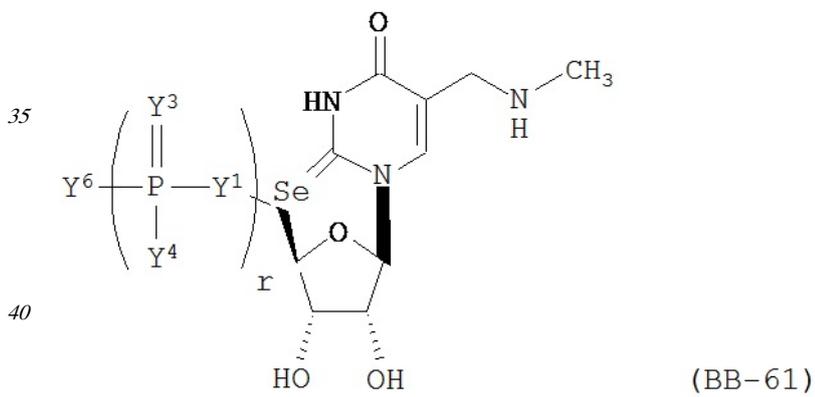
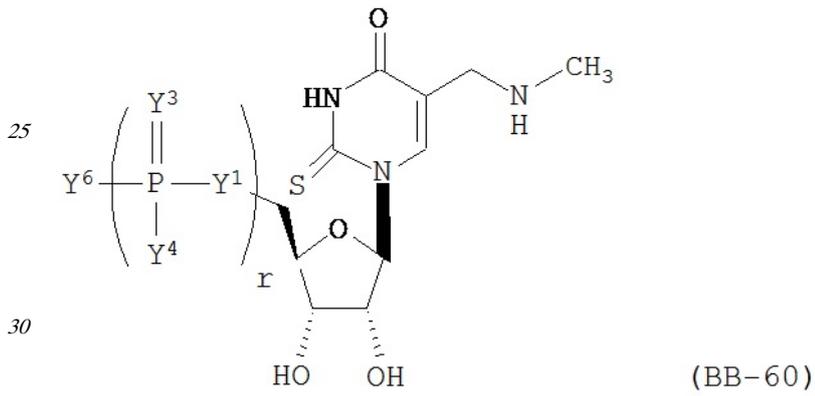
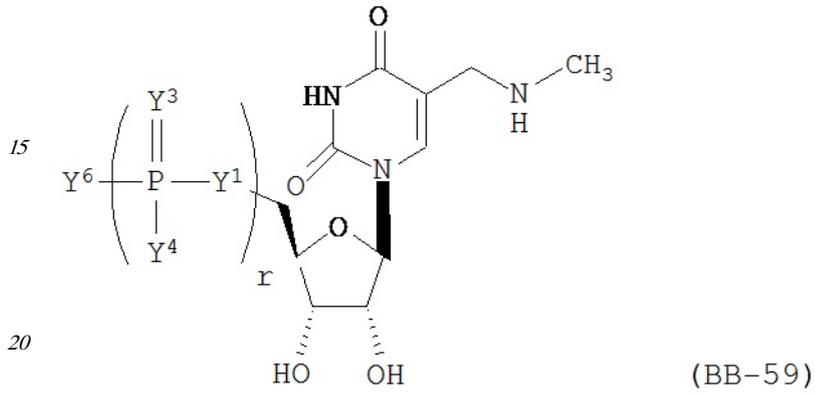
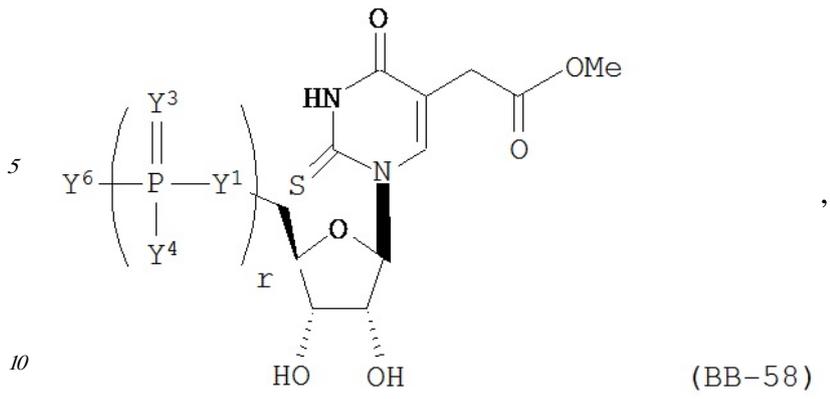
45



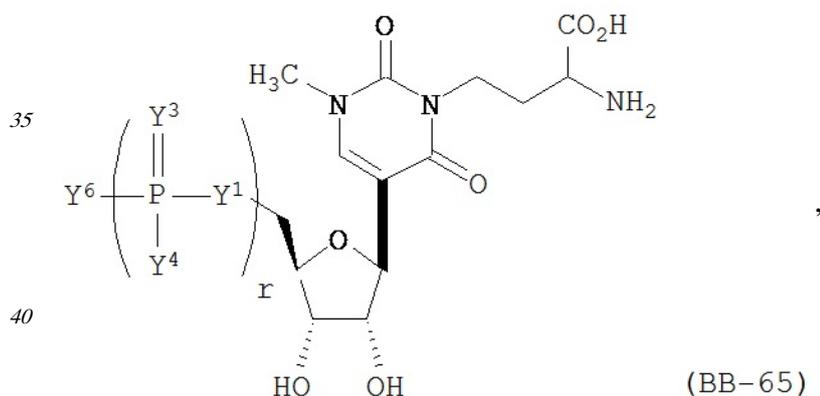
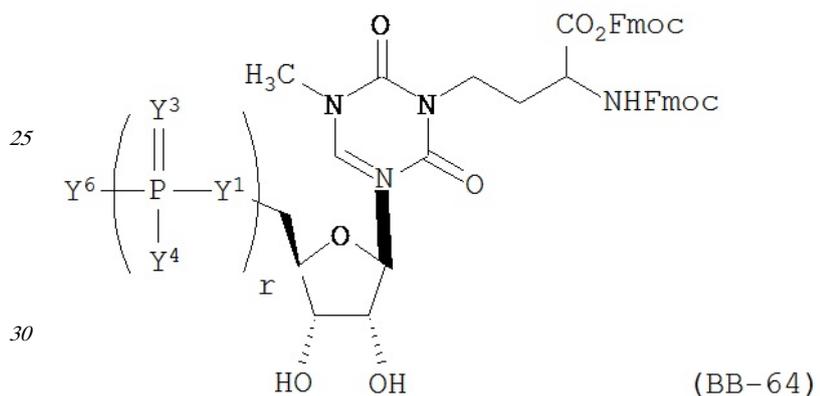
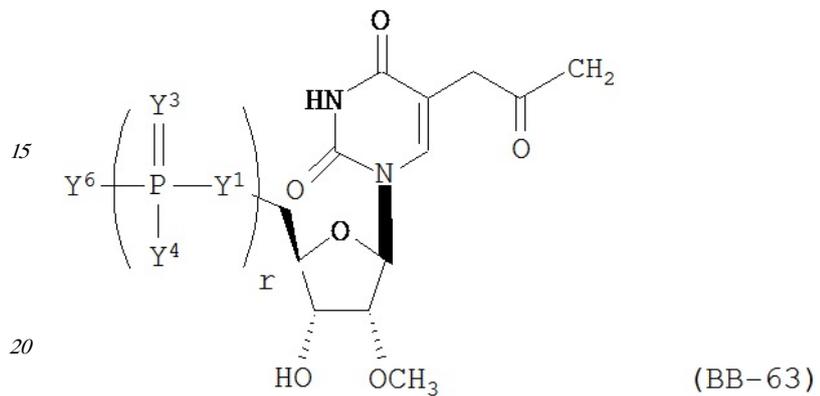
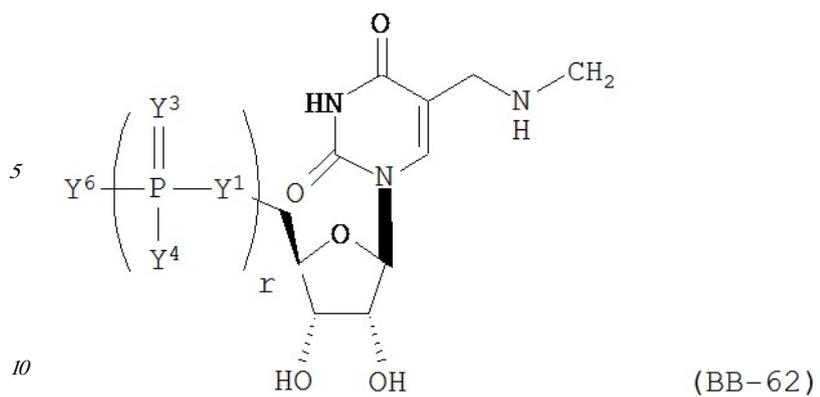
45



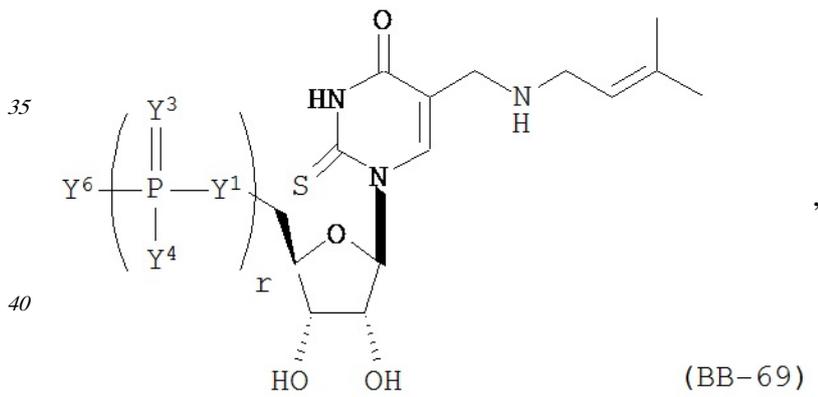
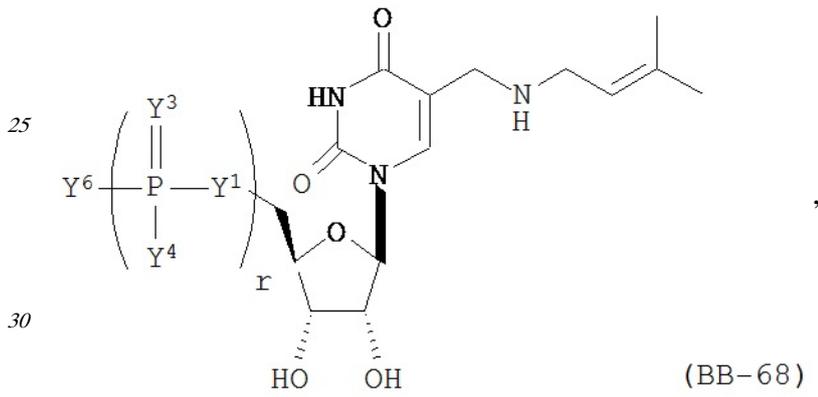
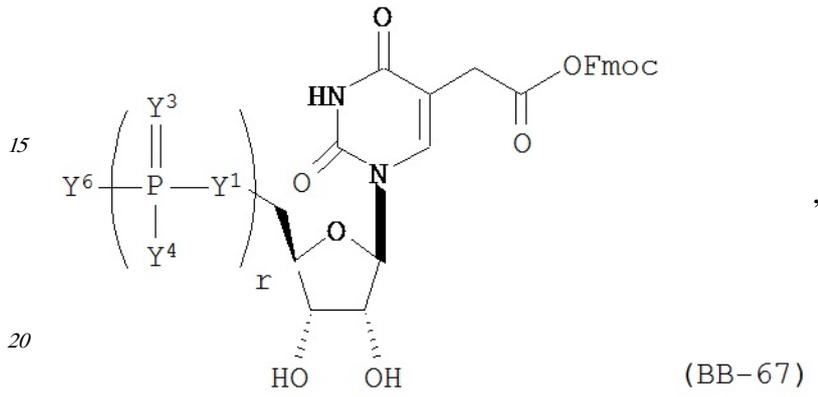
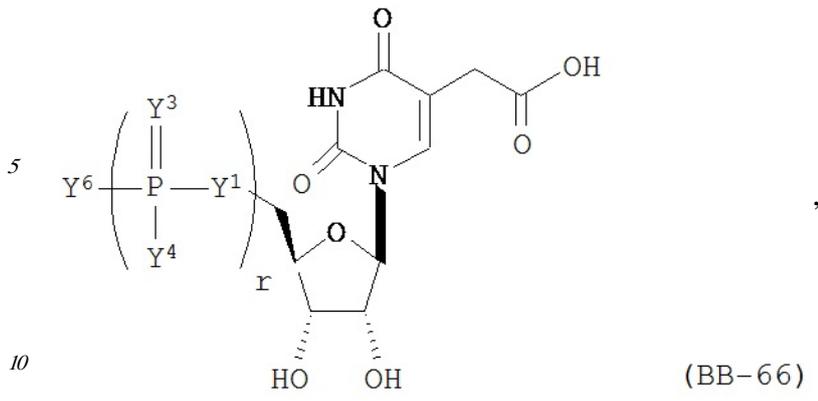
45



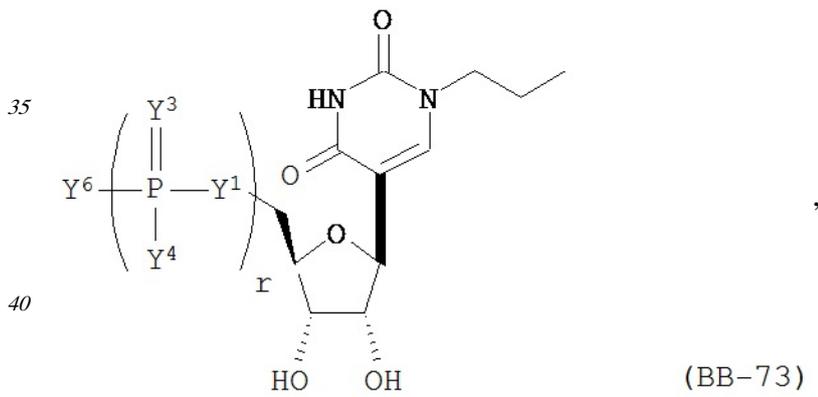
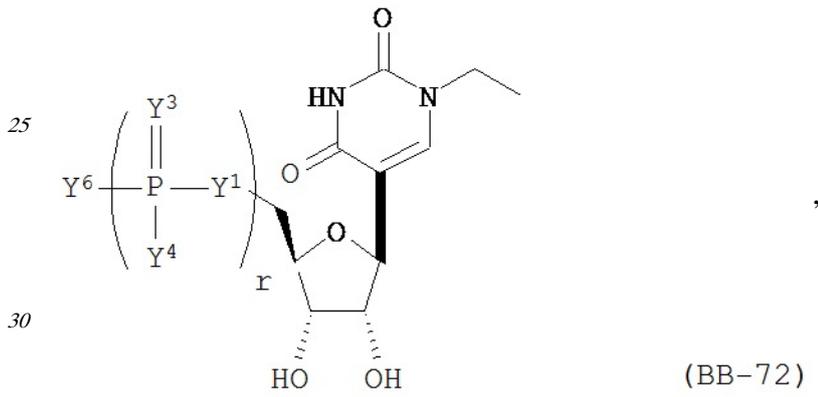
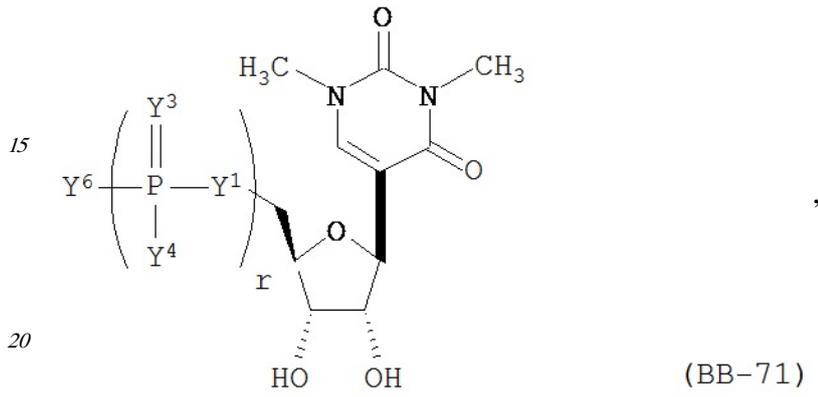
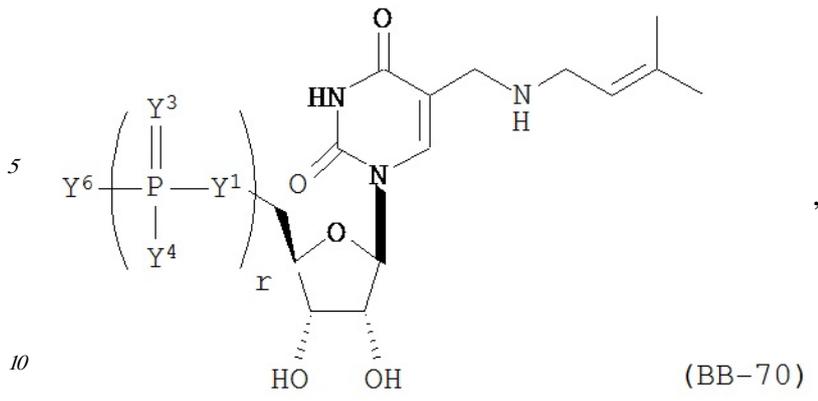
45



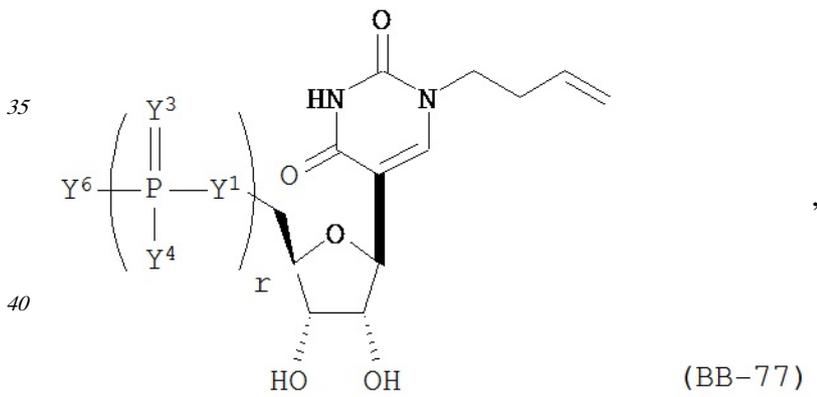
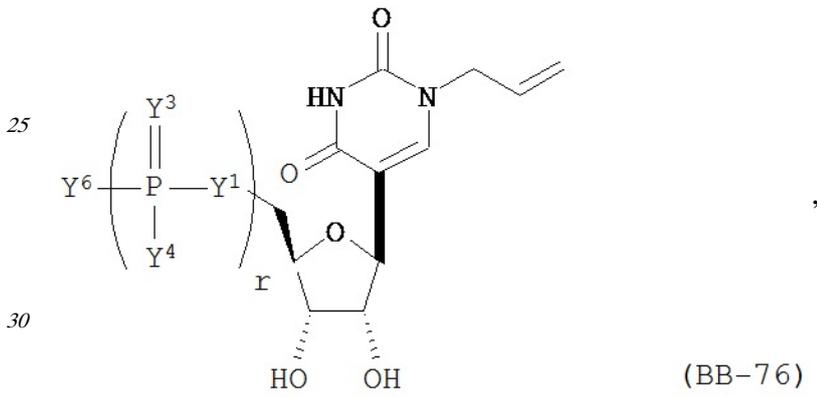
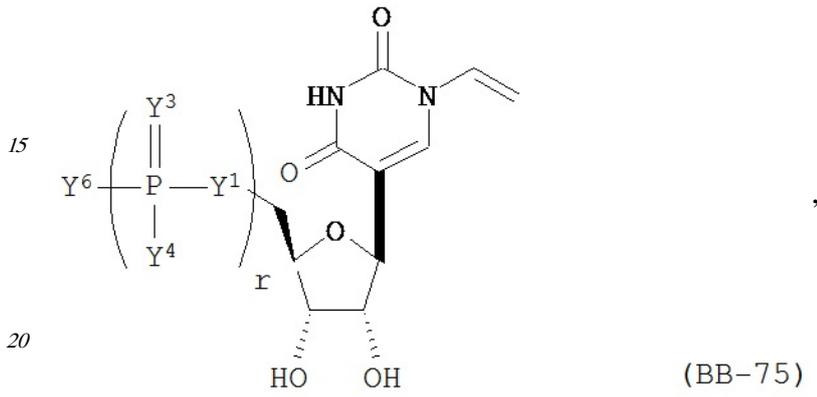
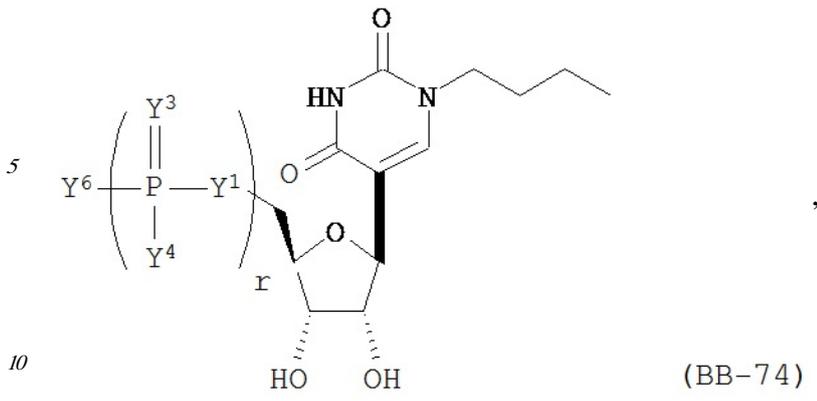
45



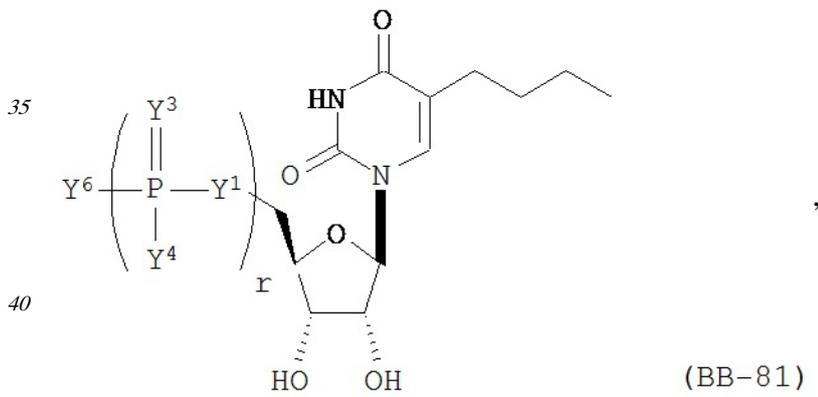
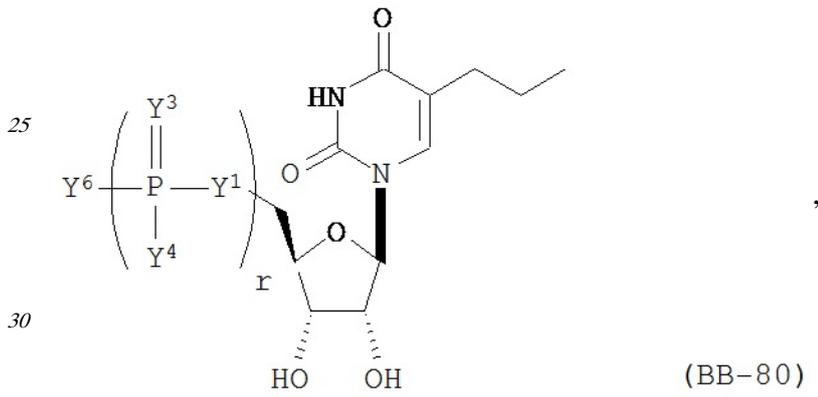
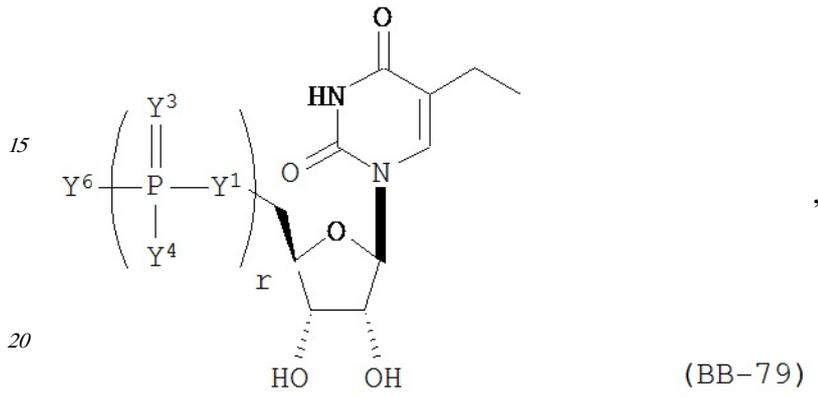
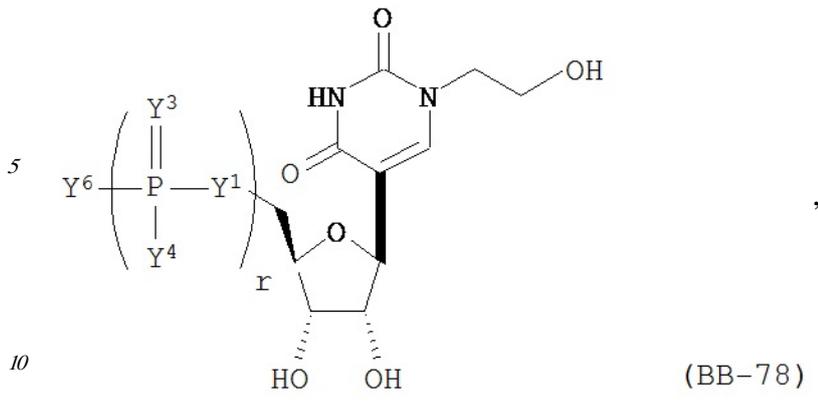
45



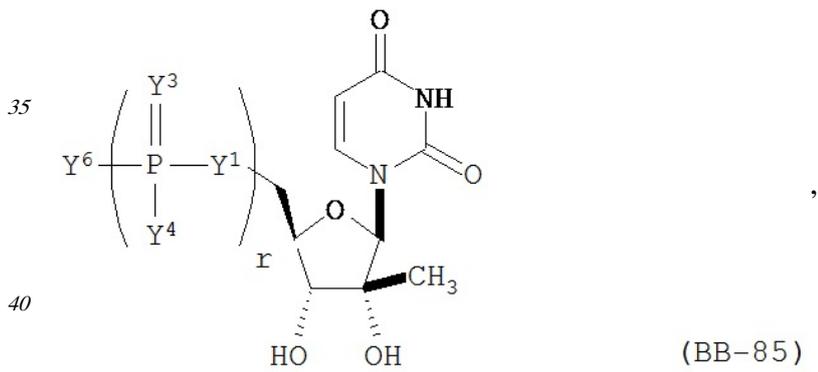
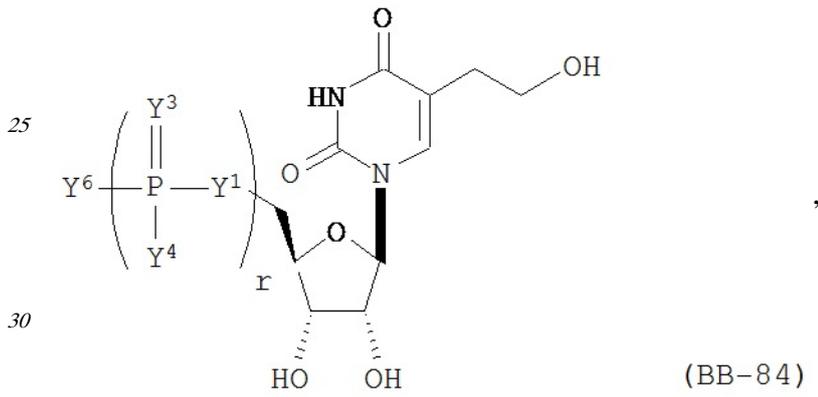
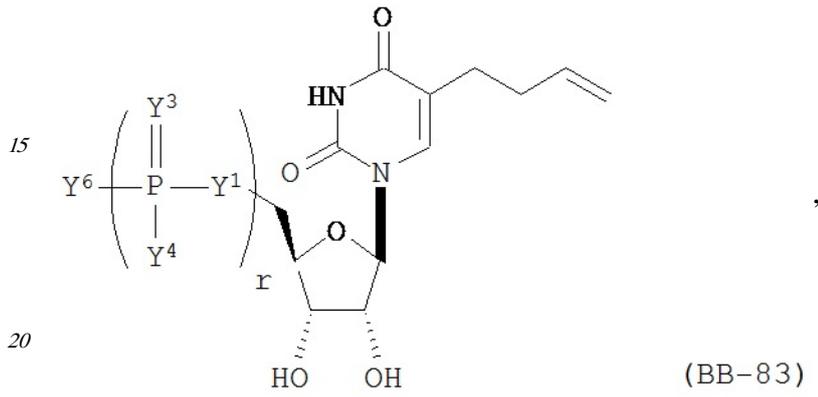
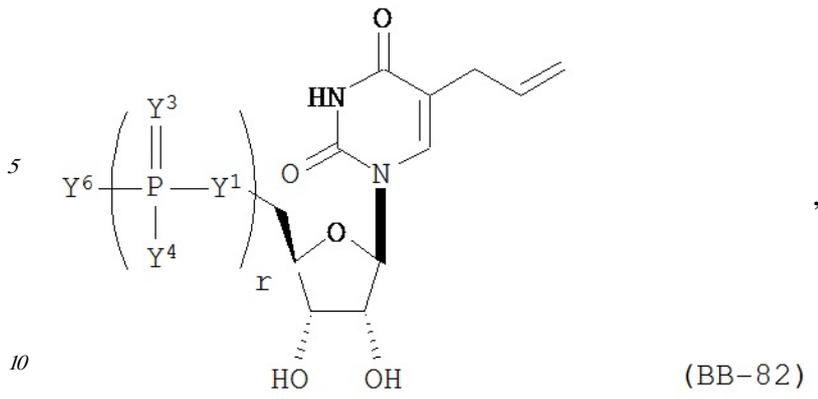
45



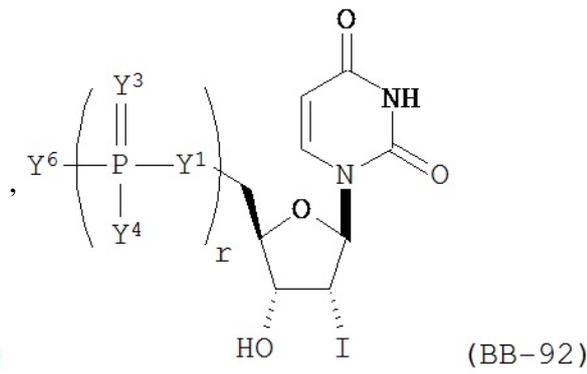
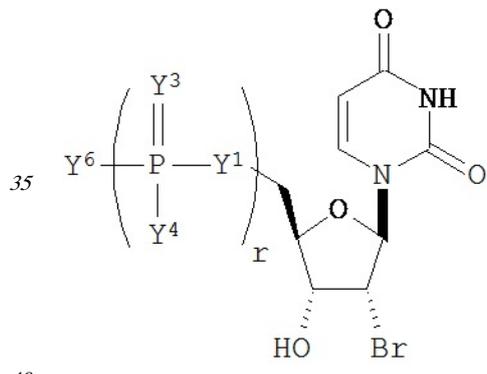
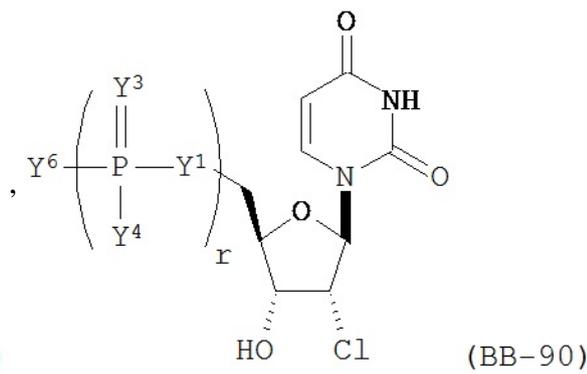
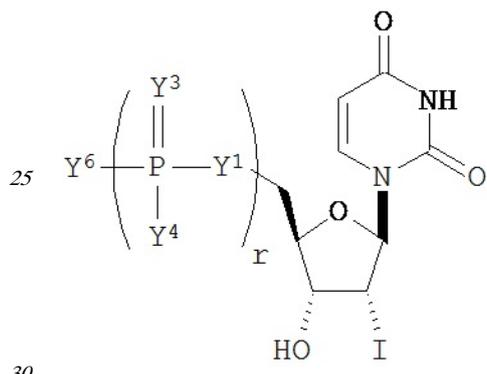
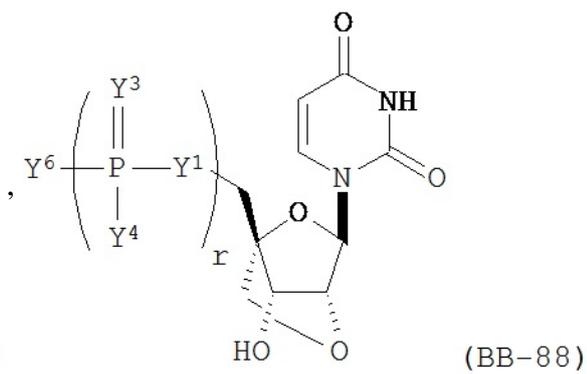
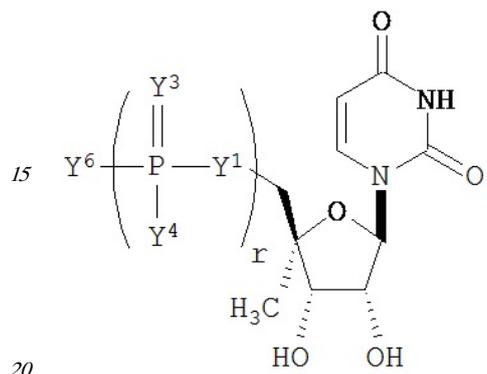
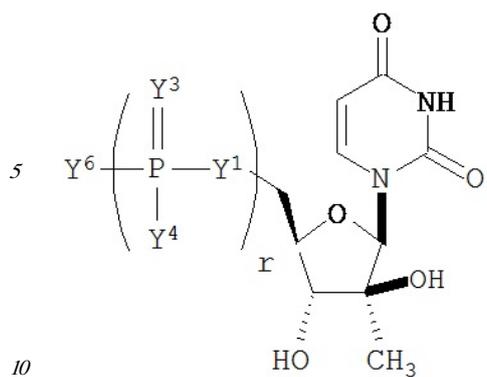
45



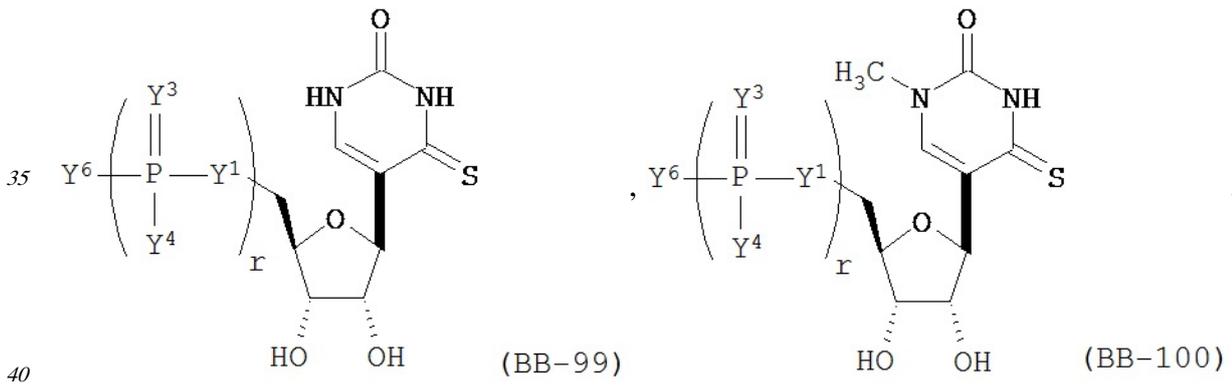
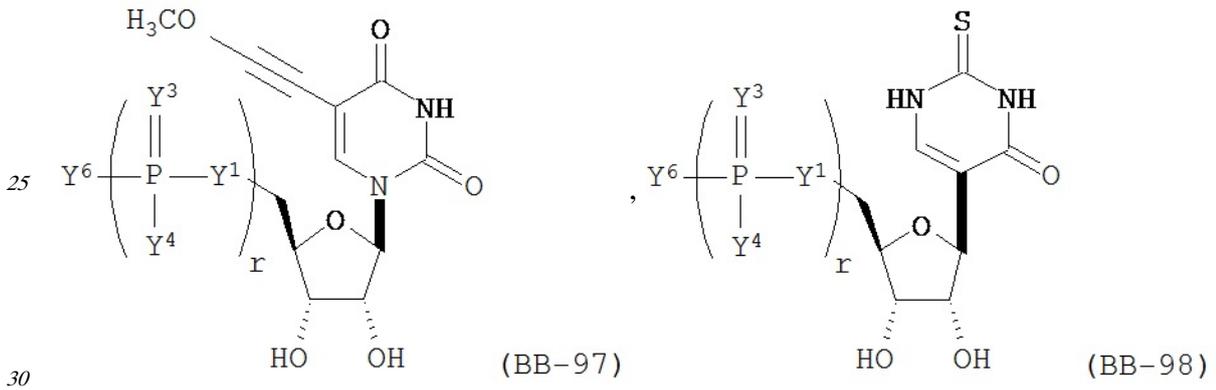
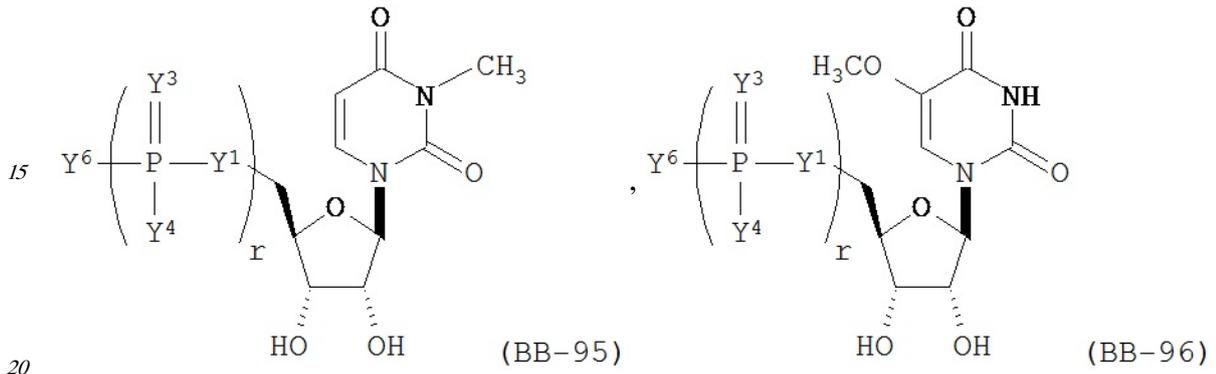
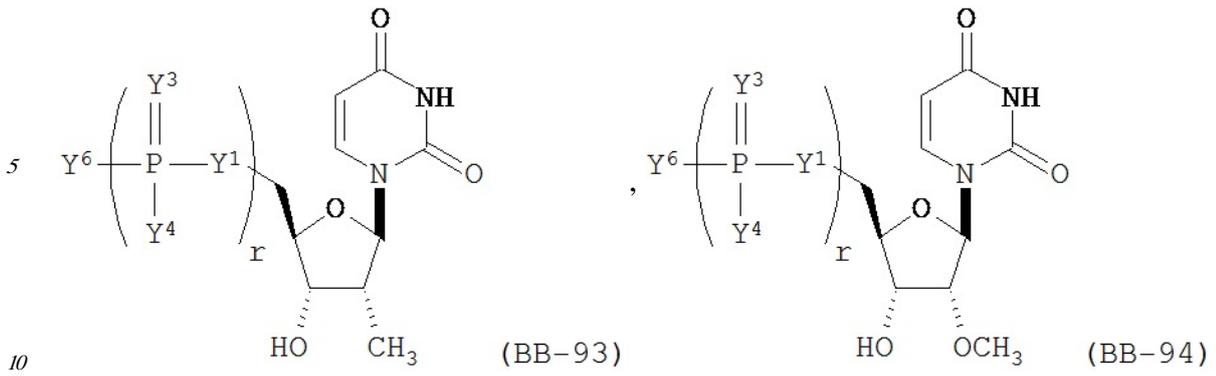
45



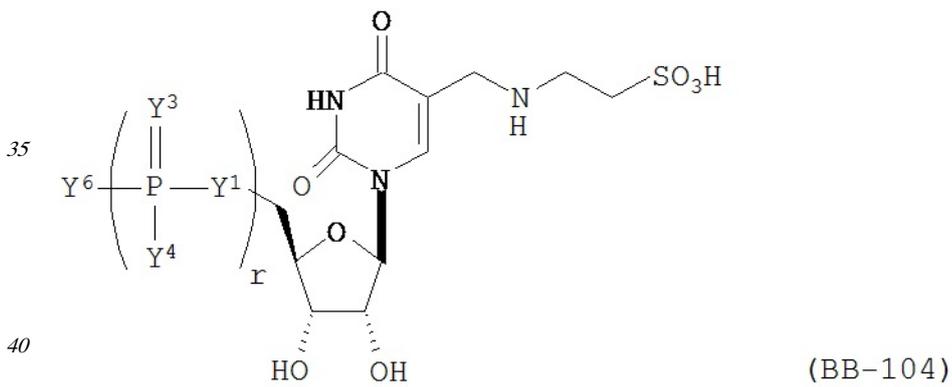
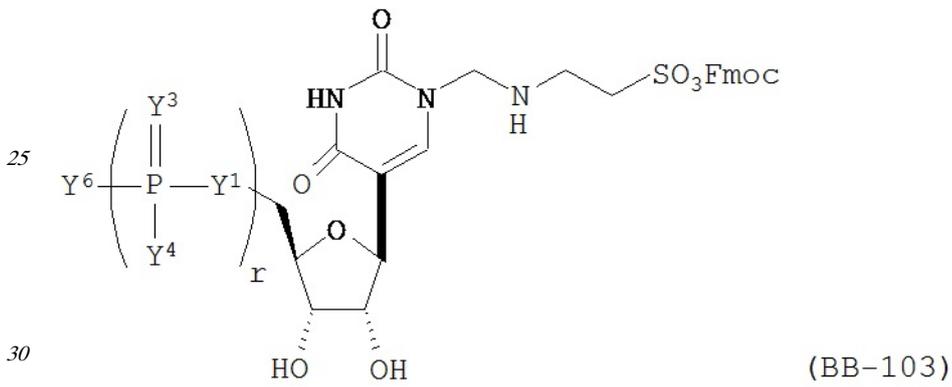
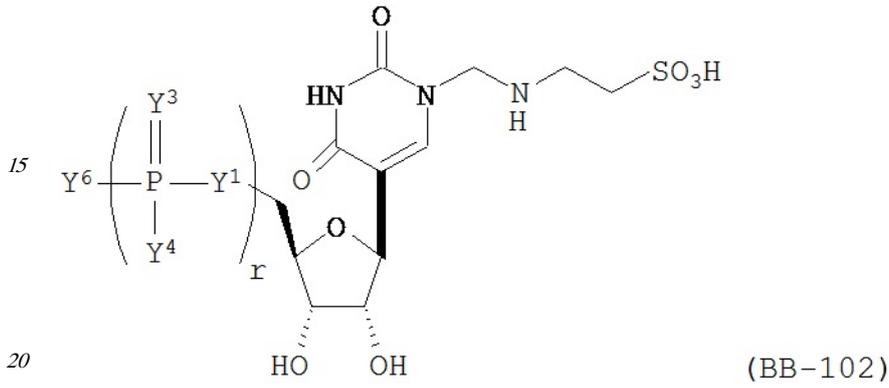
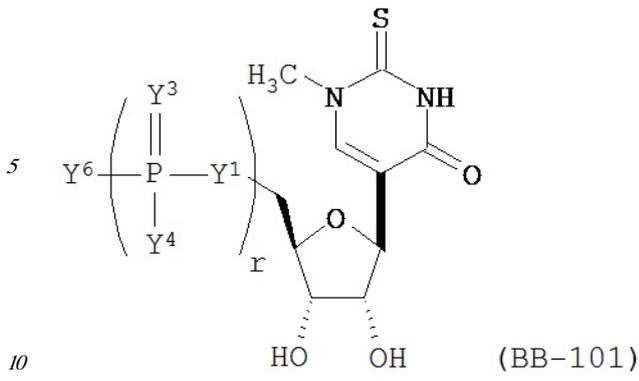
45



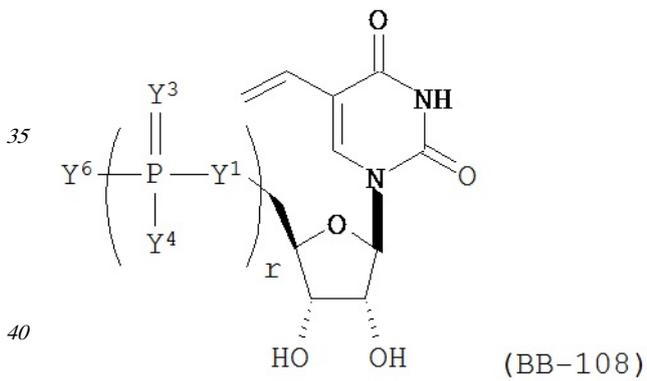
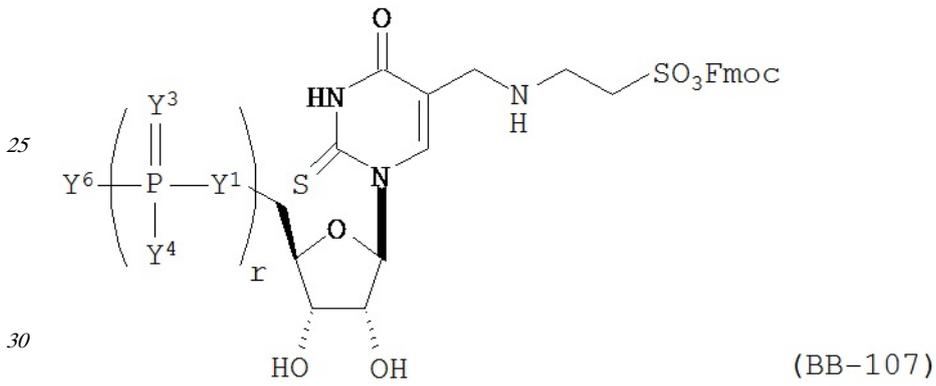
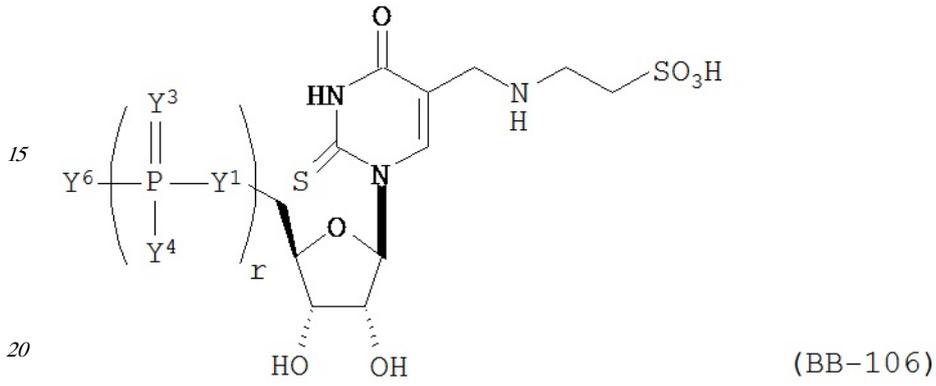
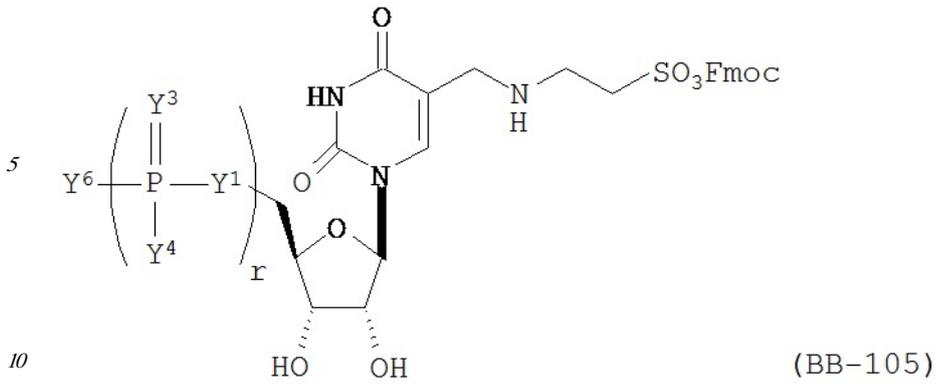
45



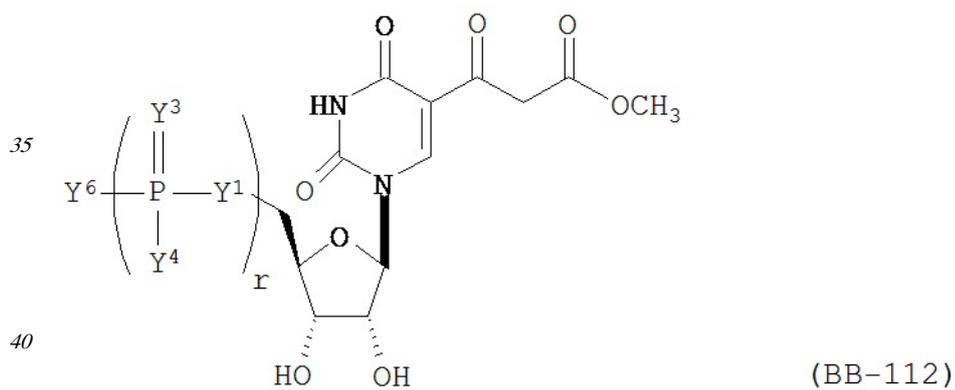
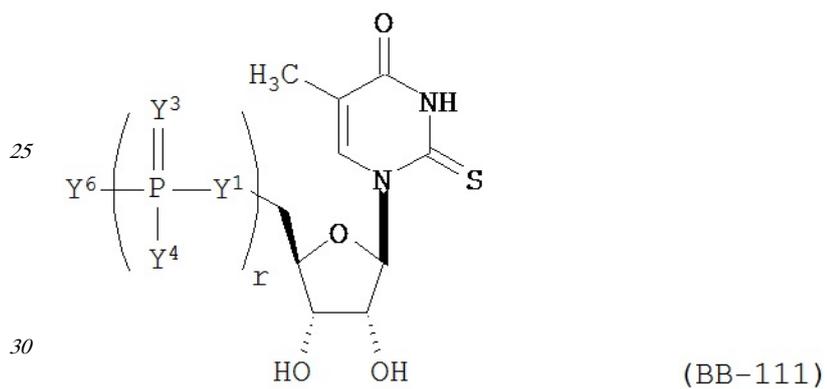
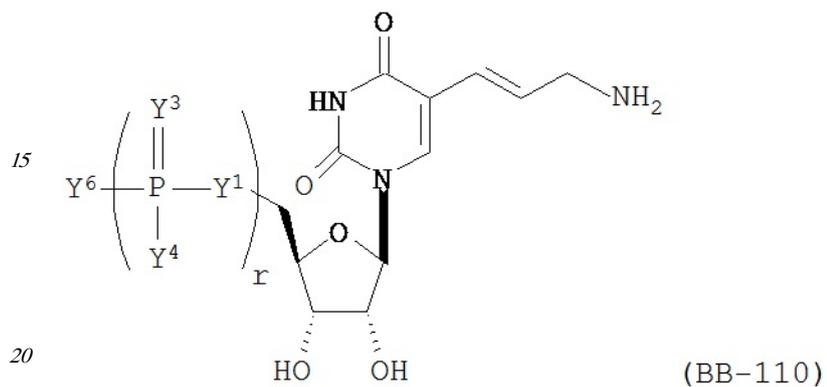
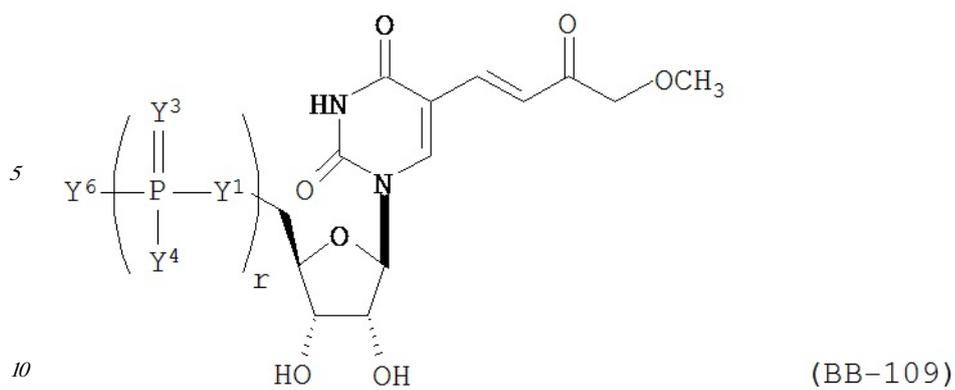
45



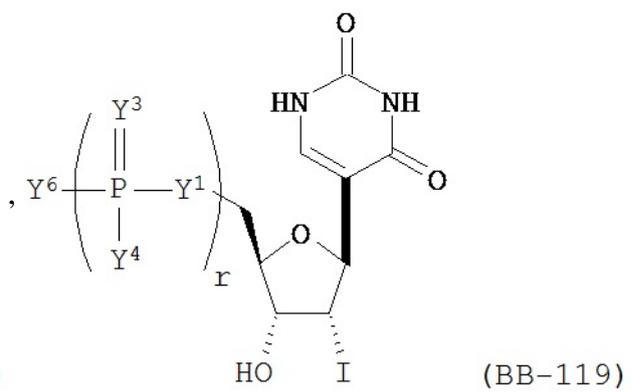
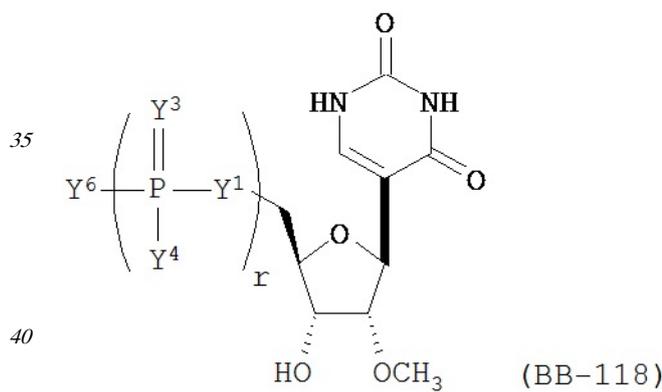
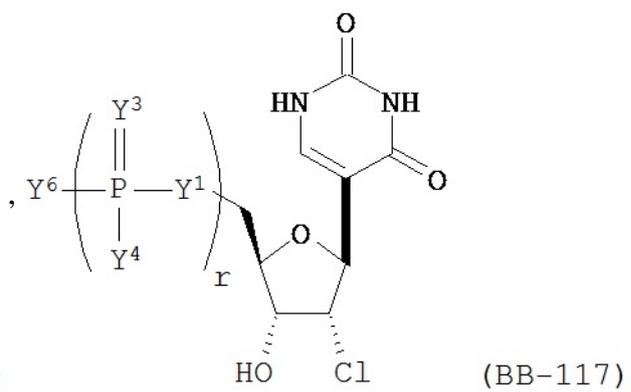
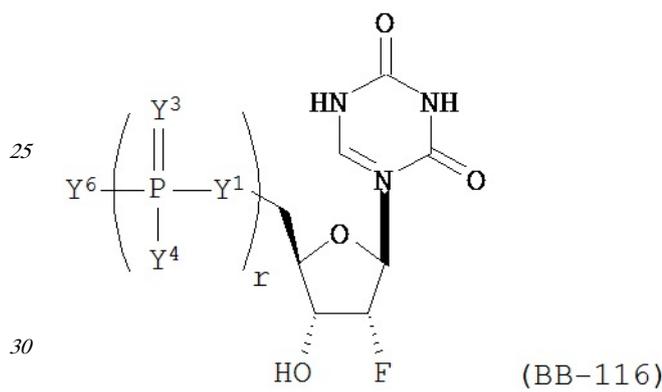
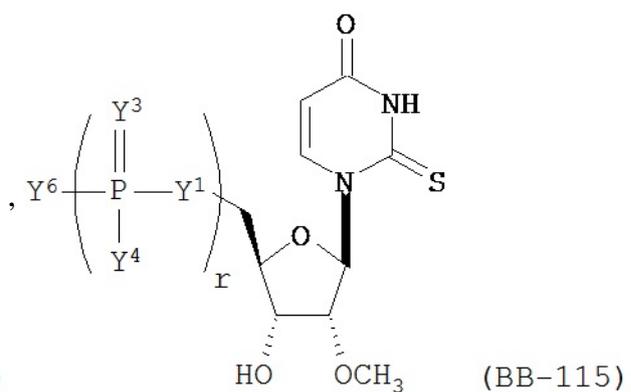
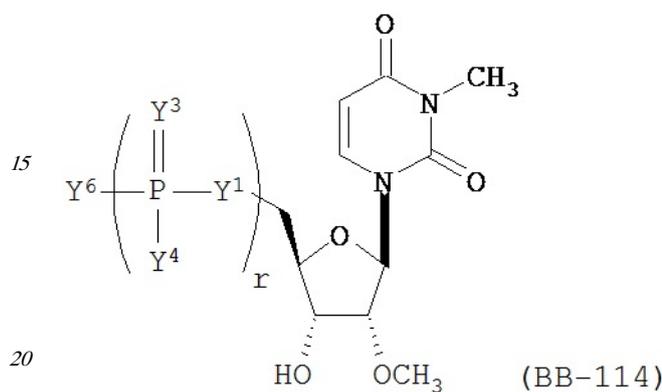
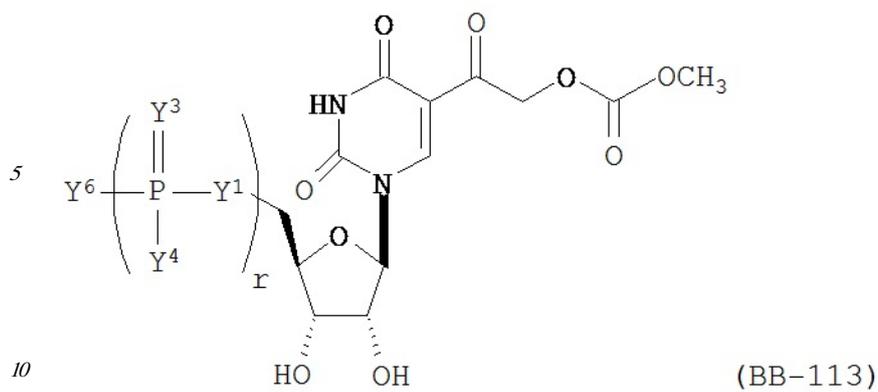
45



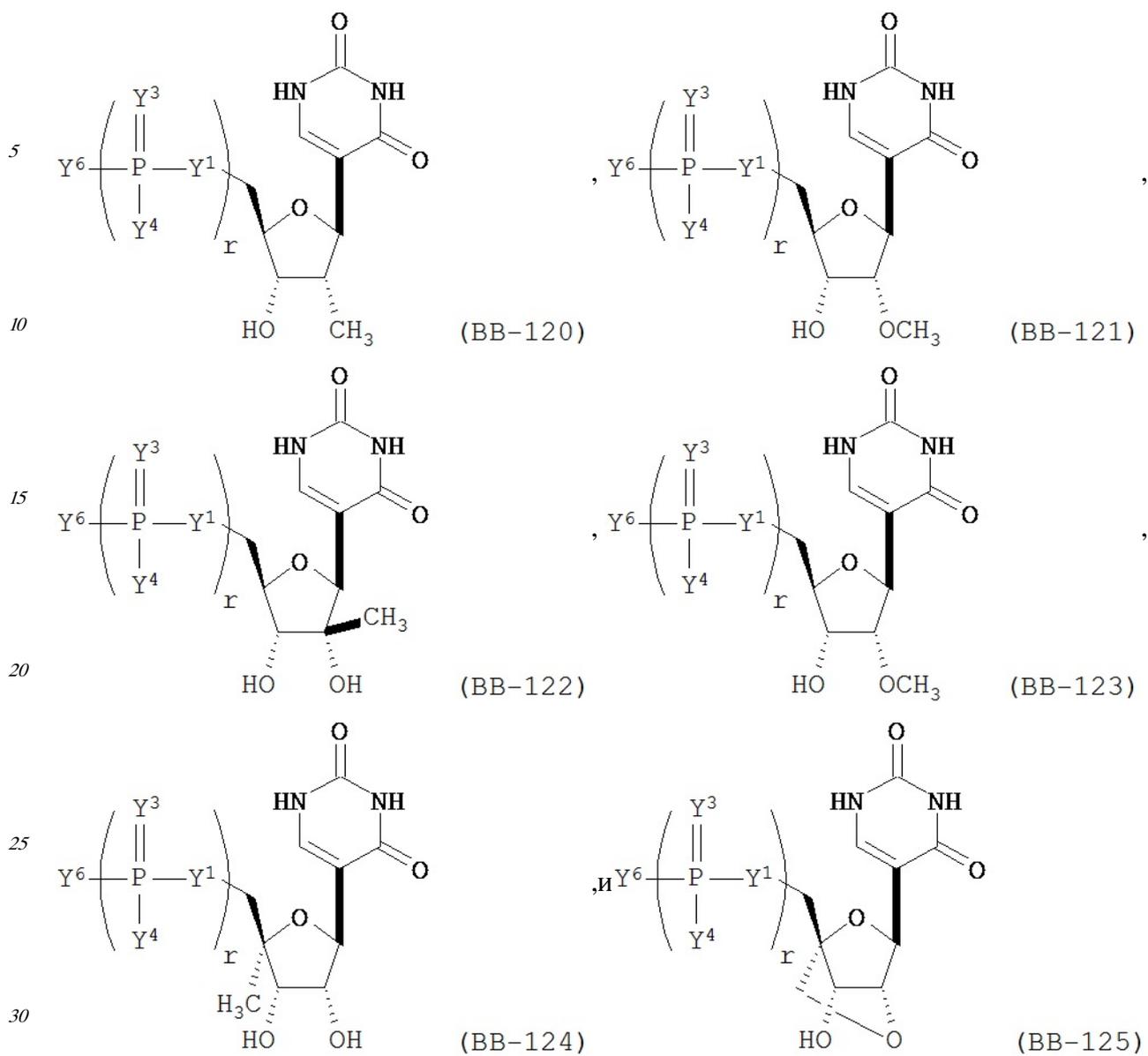
45



45



45

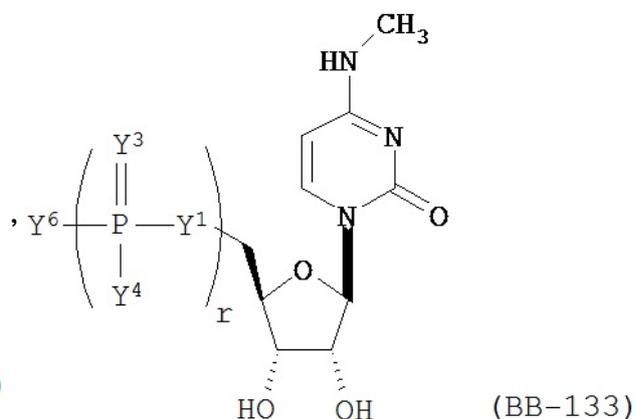
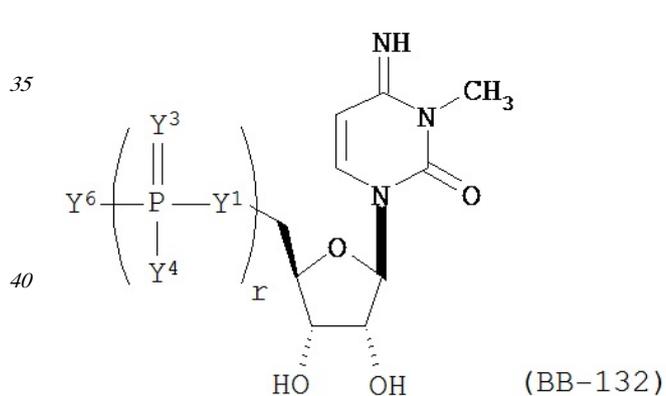
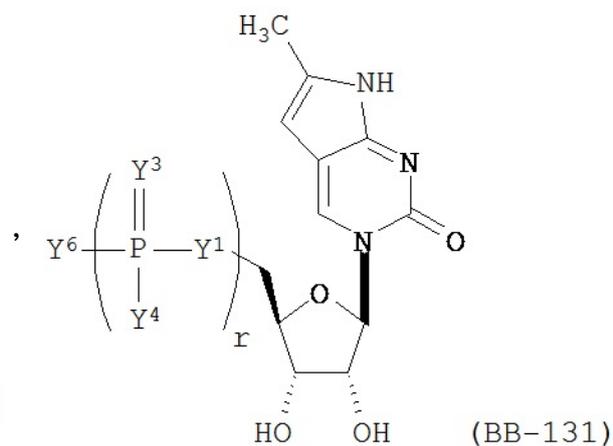
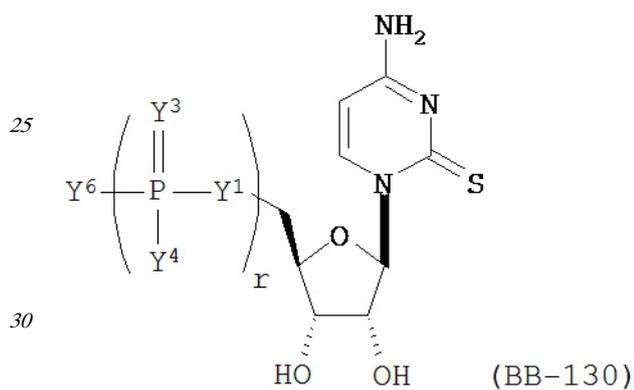
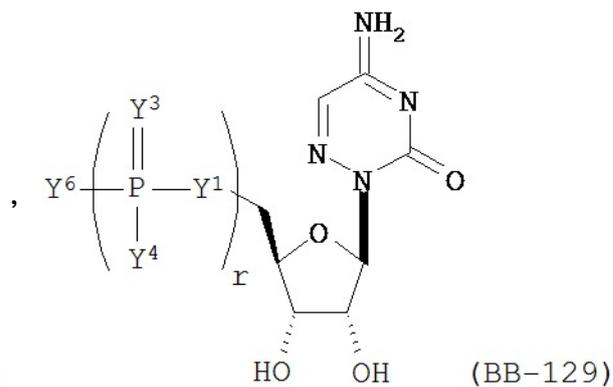
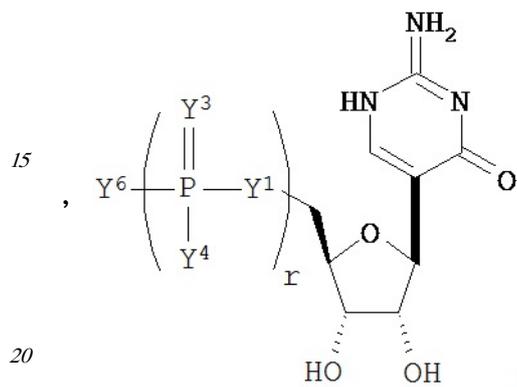
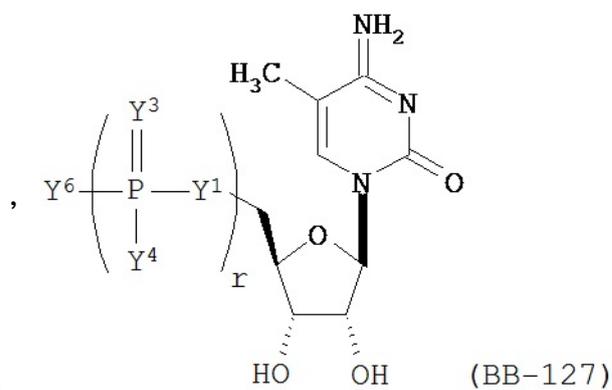
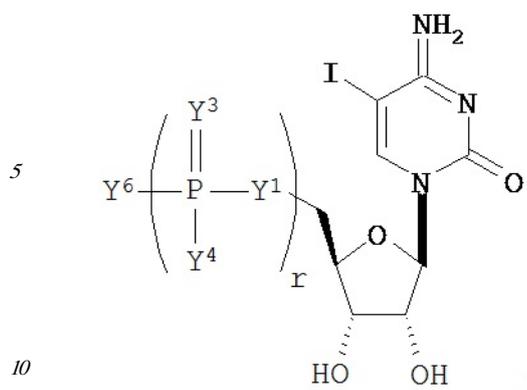


или фармацевтически приемлимой соли или стереоизомера указанных соединений, где Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶ и r являются такими, как раскрыто в настоящем документе (например, каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5, в том числе, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5)).

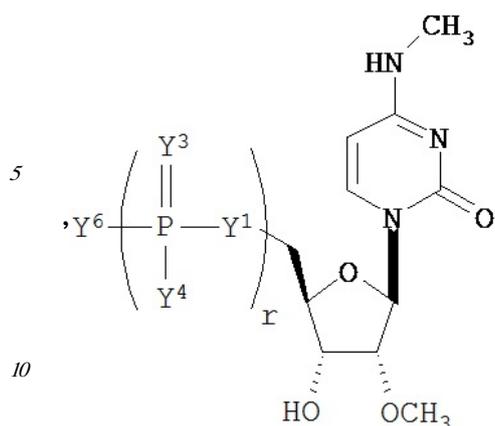
[00200] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представляет собой модифицированный цитидин (например, выбранный из группы, состоящей из:

40

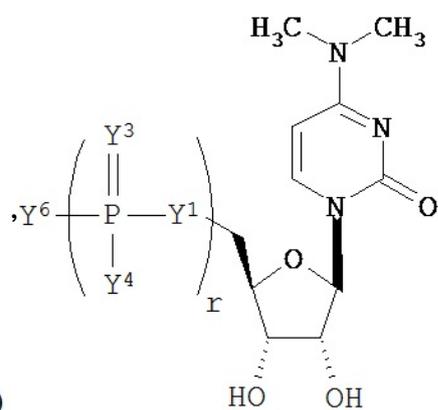
45



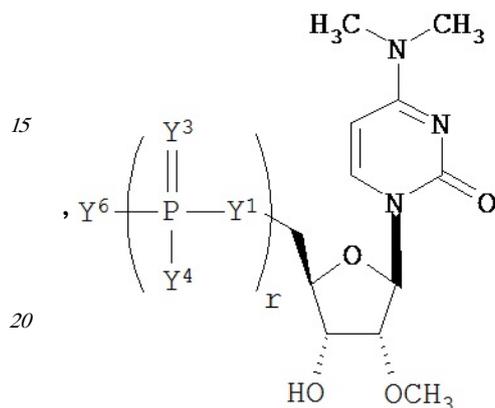
45



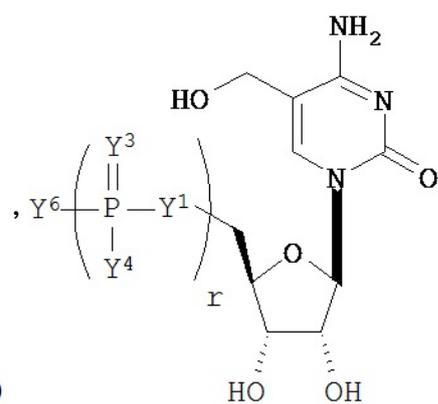
(BB-134)



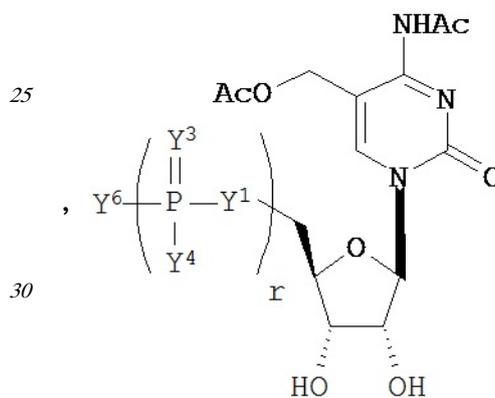
(BB-135)



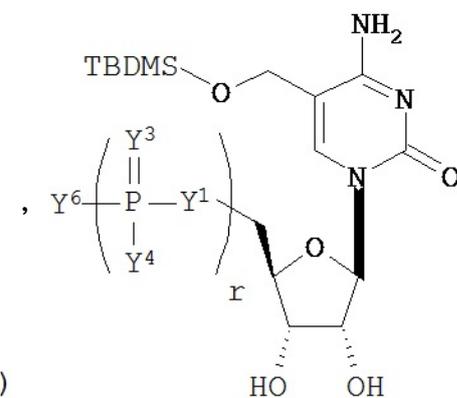
(BB-136)



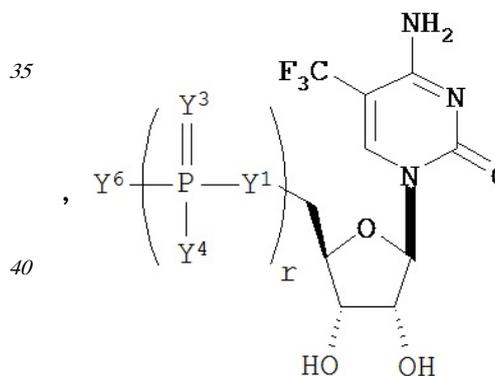
(BB-137)



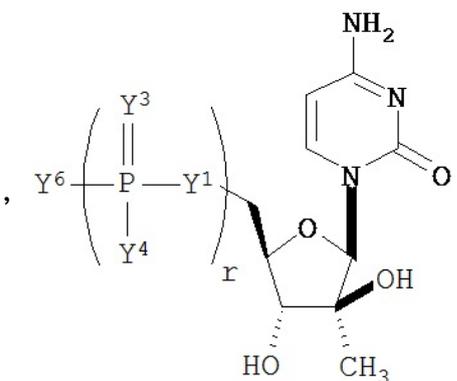
(BB-138)



(BB-139)

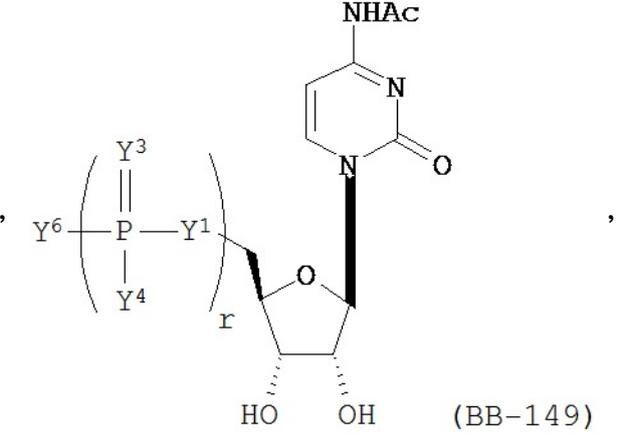
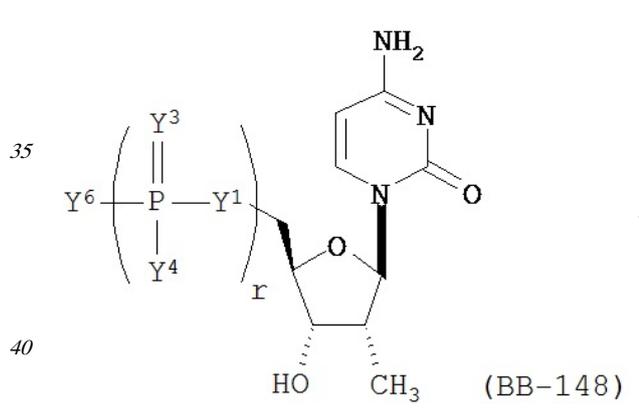
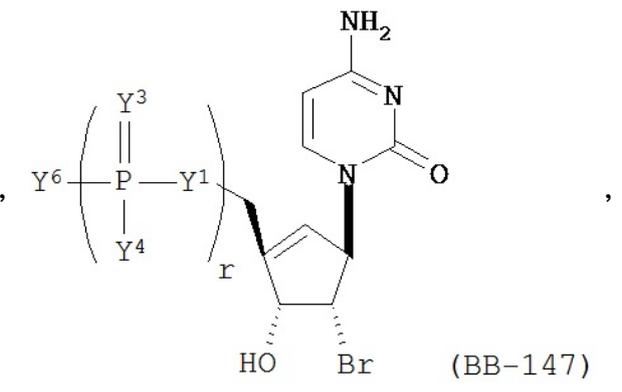
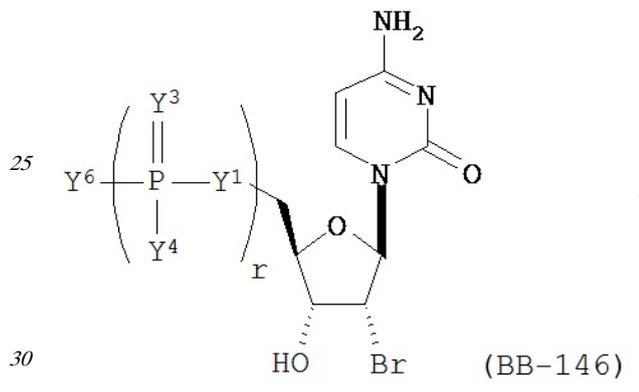
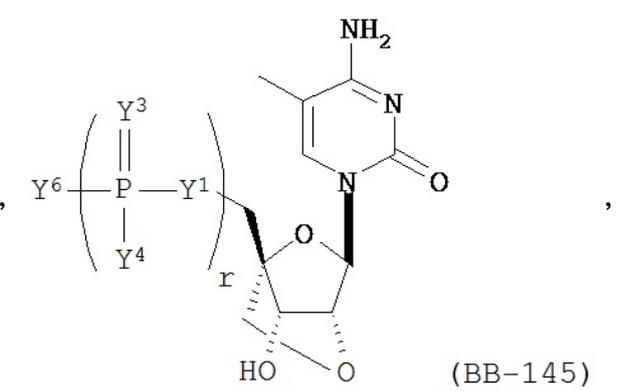
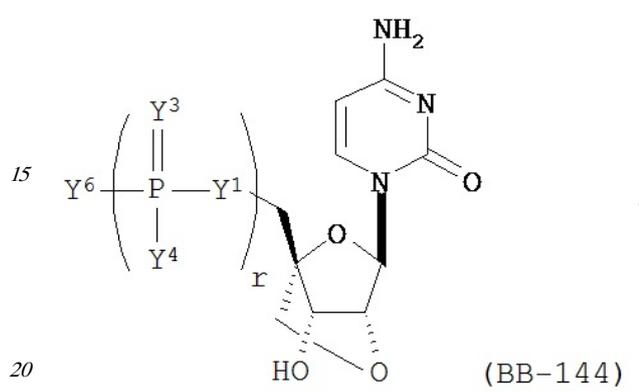
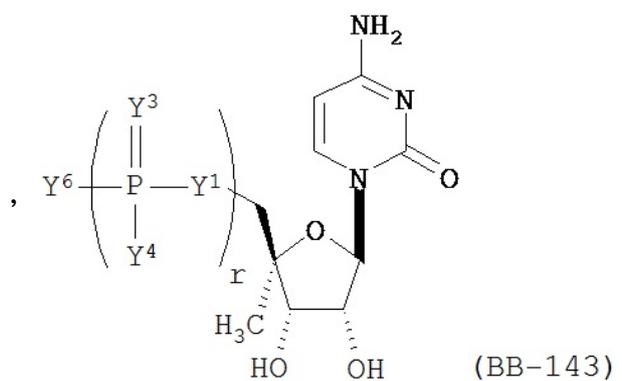
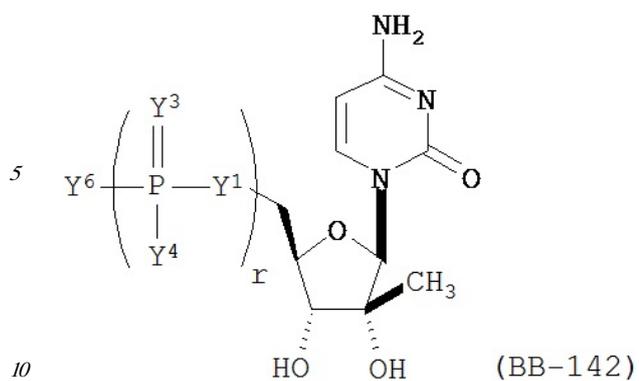


(BB-140)

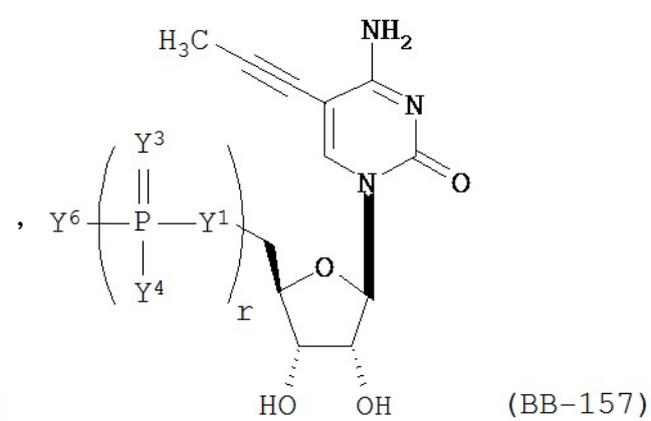
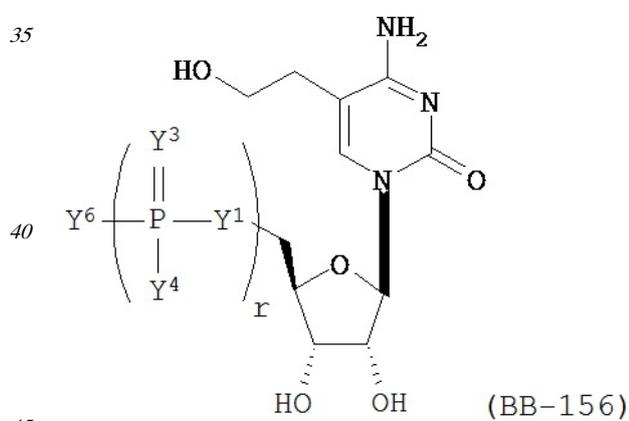
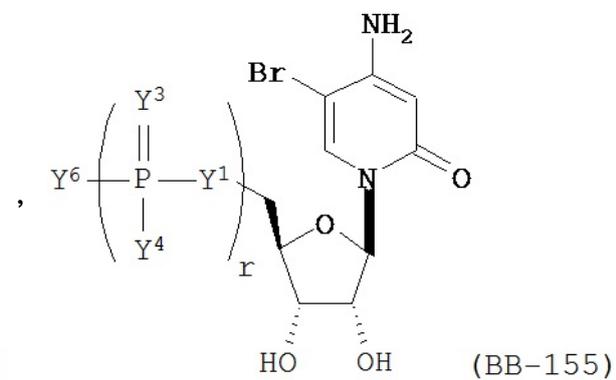
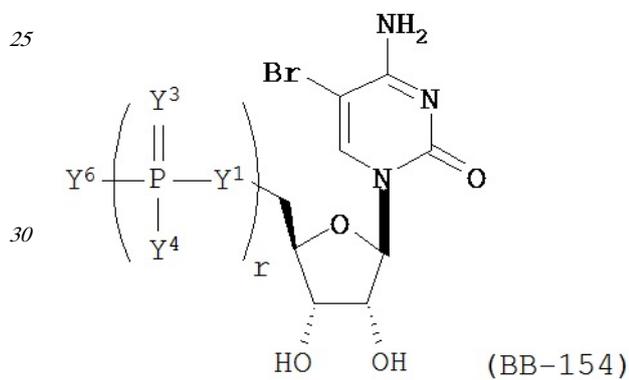
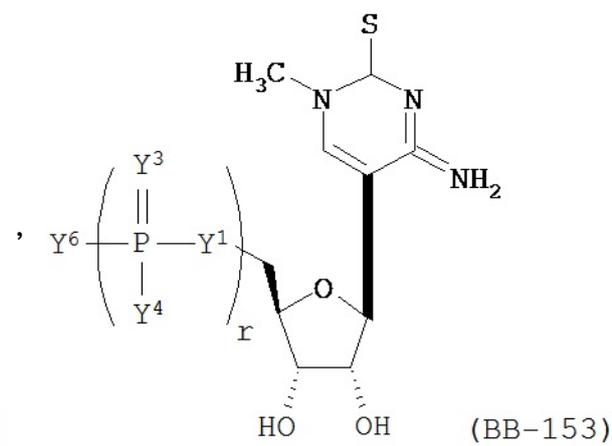
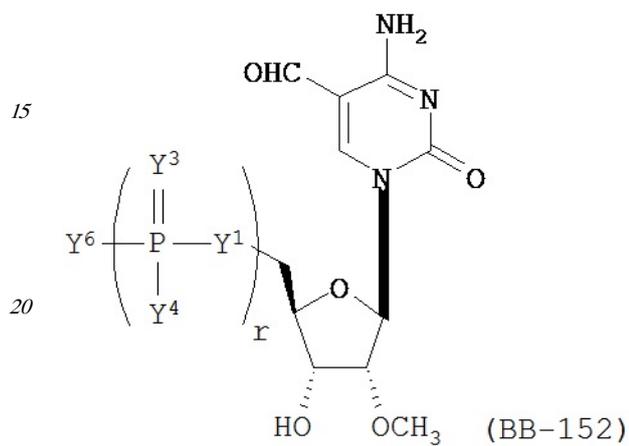
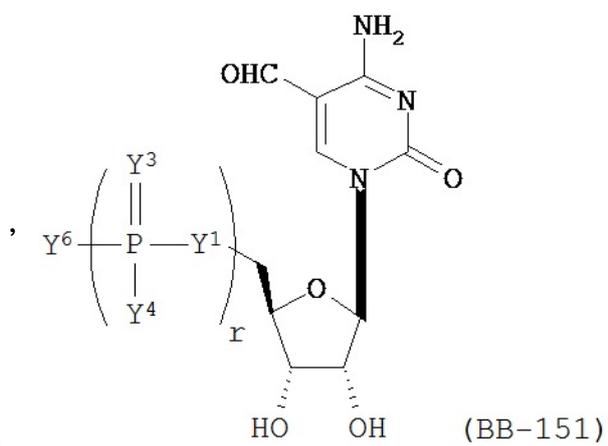
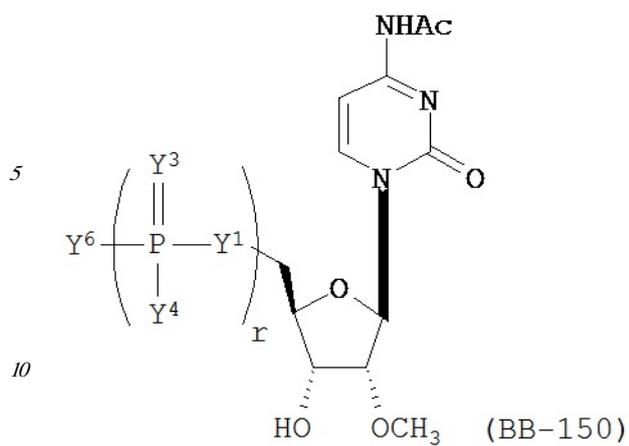


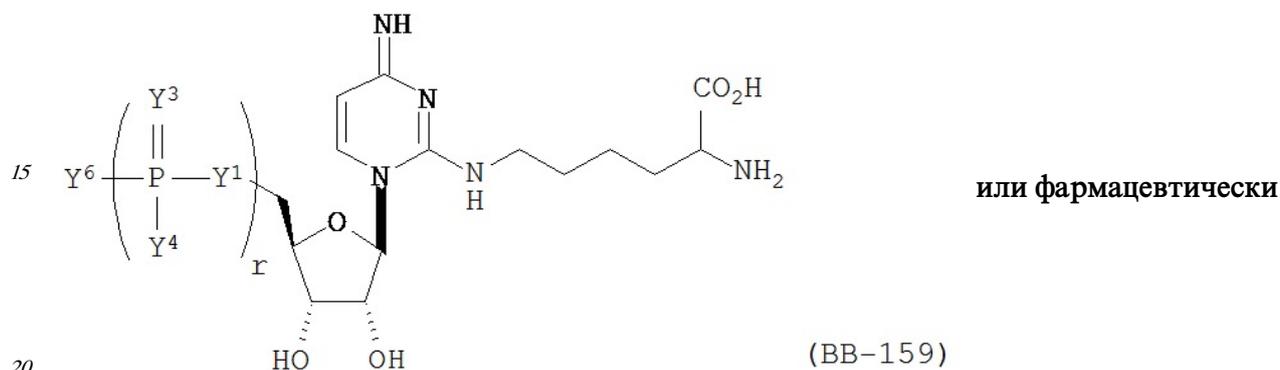
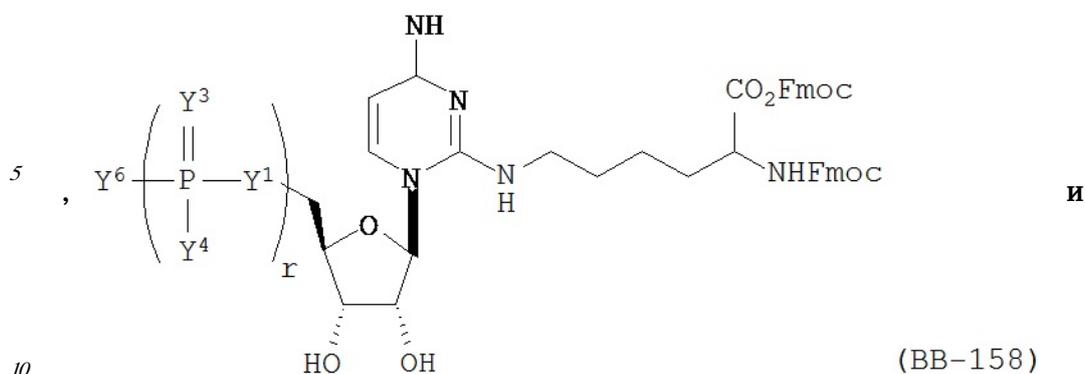
(BB-141)

45

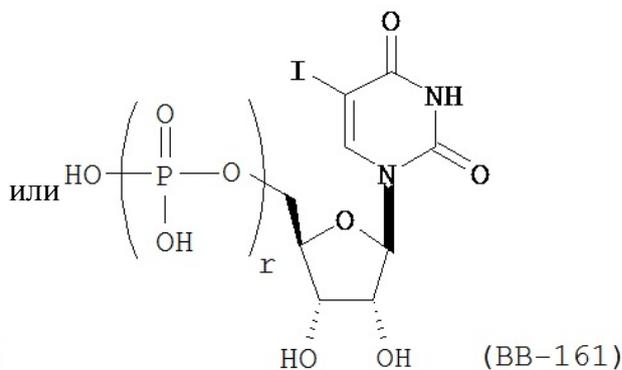
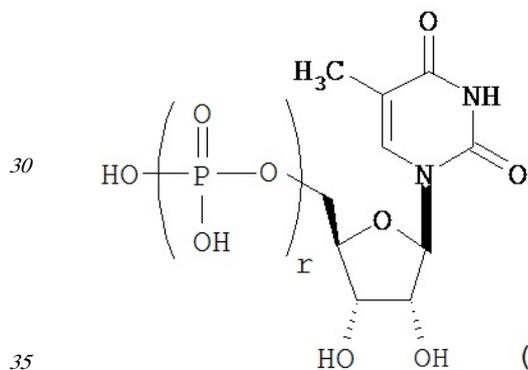


45



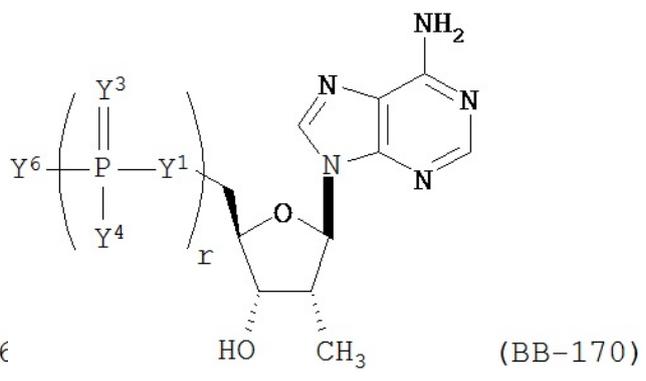
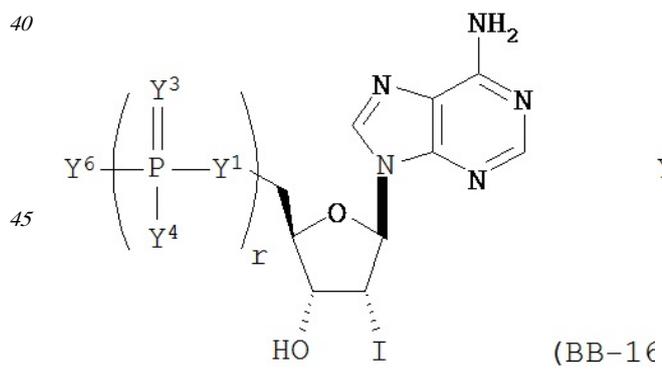
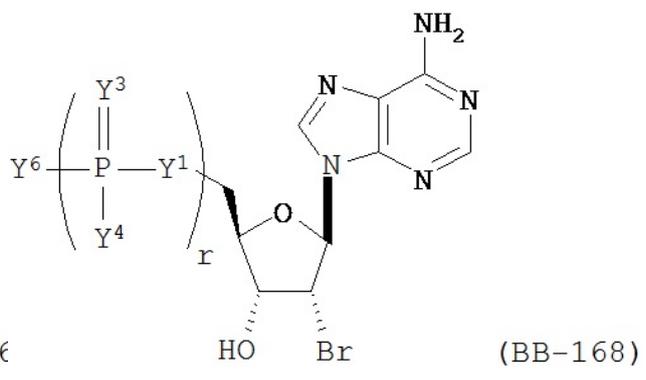
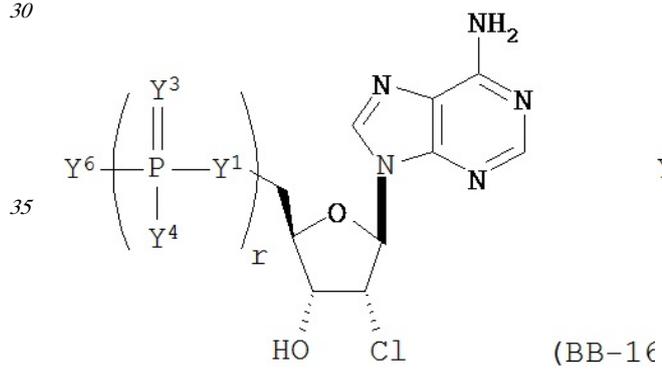
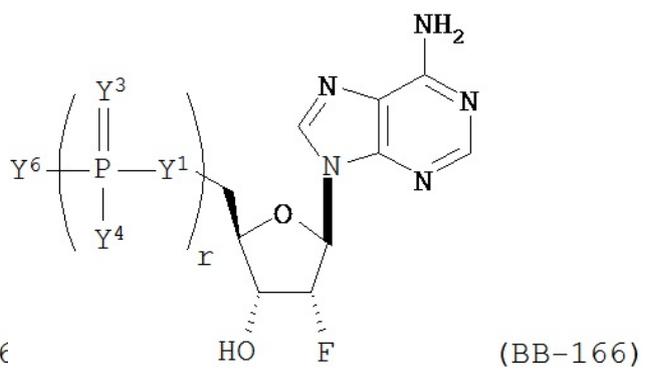
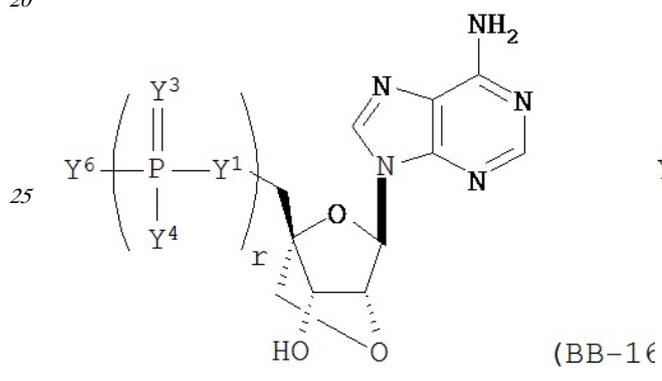
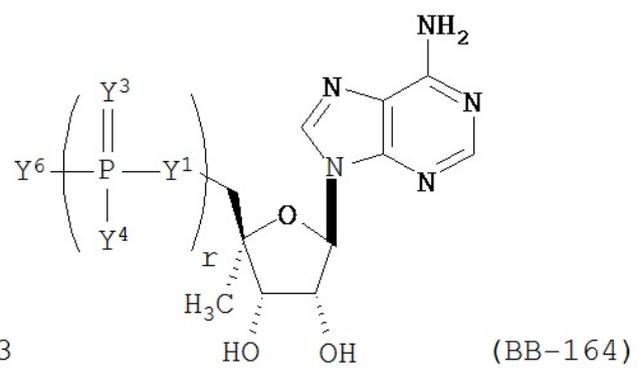
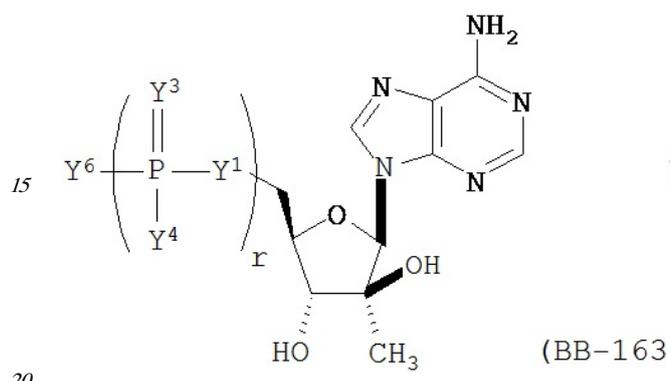
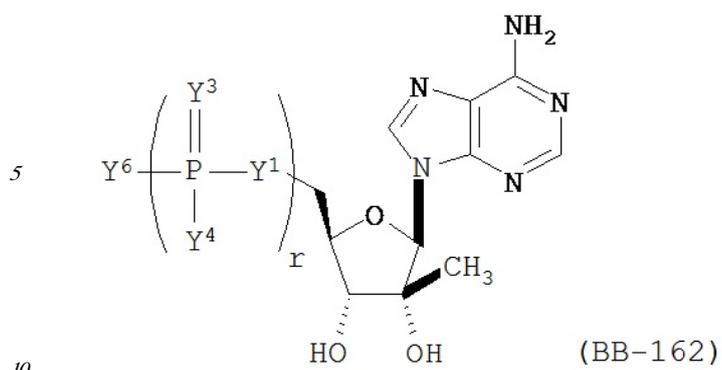


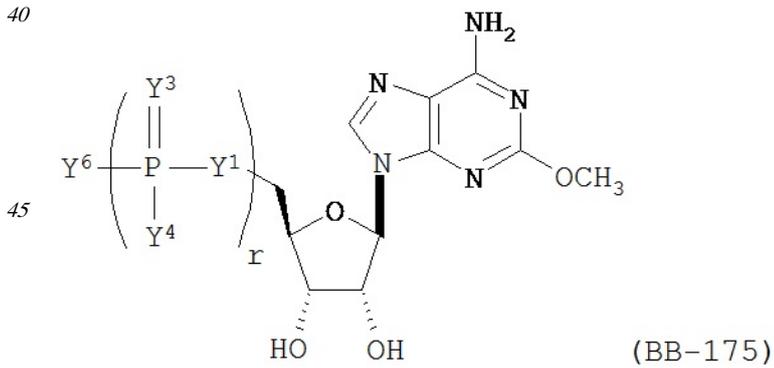
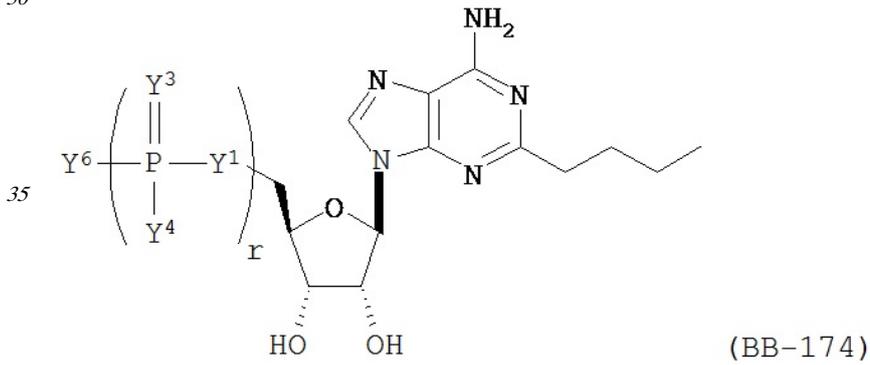
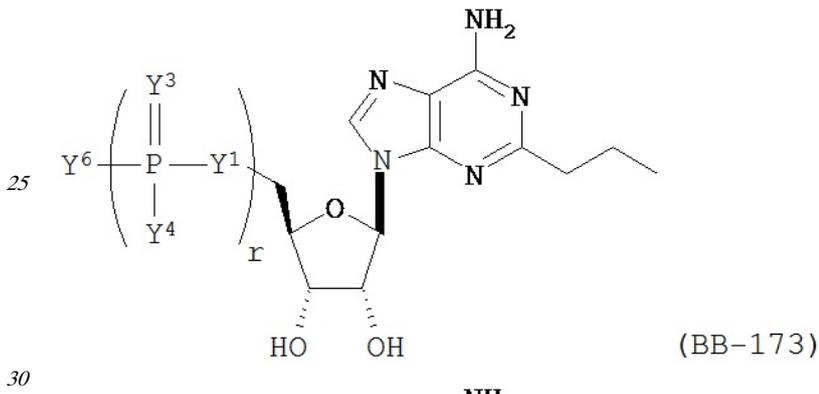
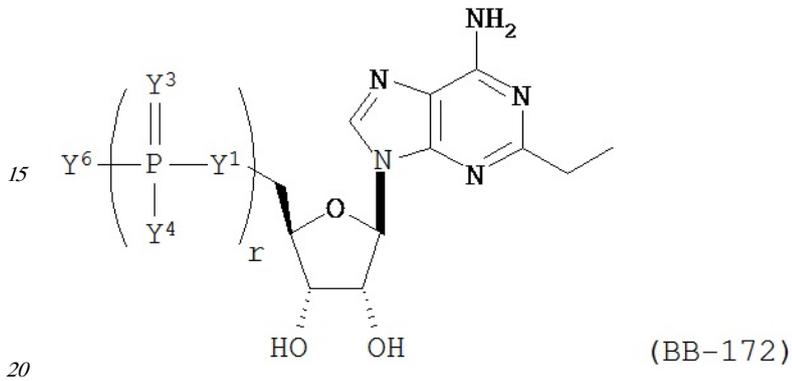
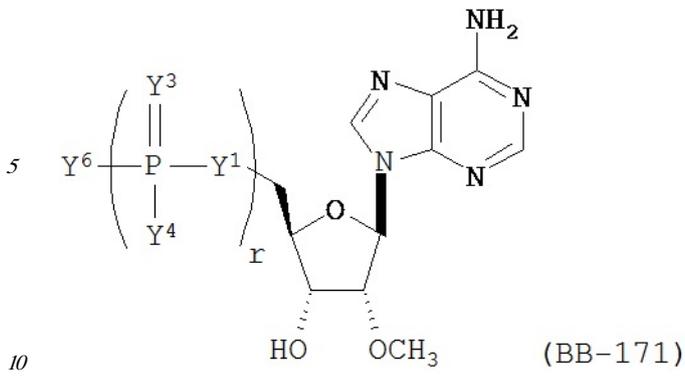
25 приемлемой соли или стереоизомера указанных соединений, где Y^1 , Y^3 , Y^4 , Y^6 и r являются такими, как раскрыто в настоящем документе (например, каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5, в том числе, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5)). Например, молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, может представлять собой:

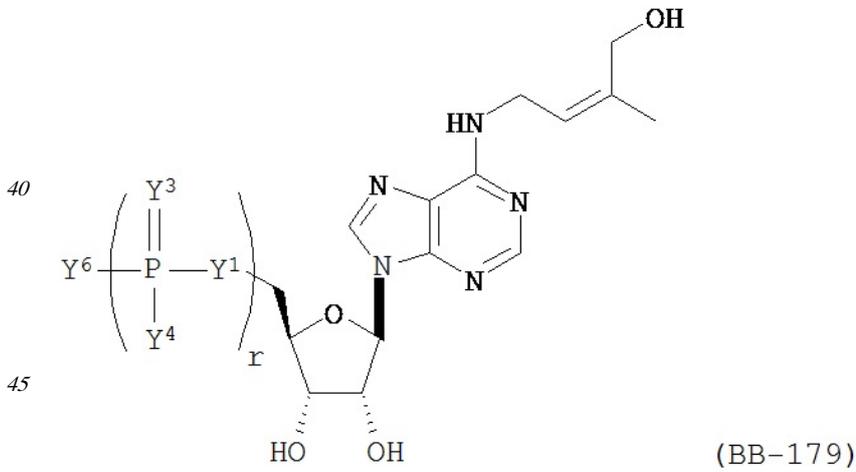
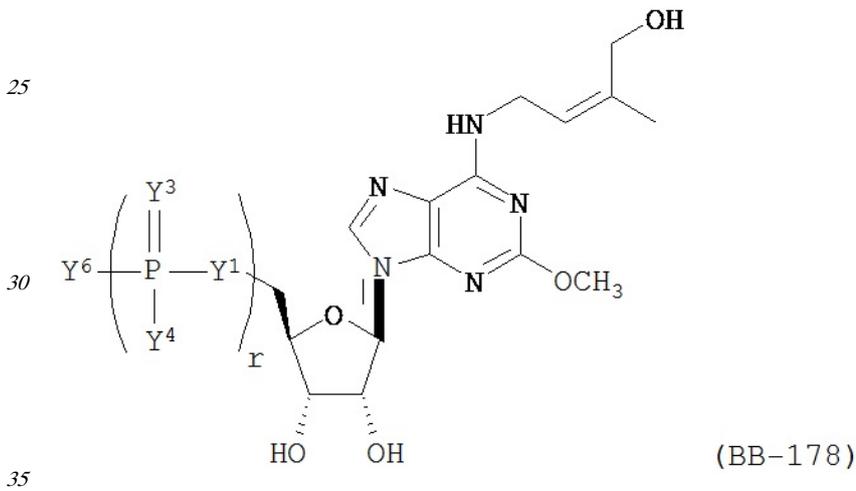
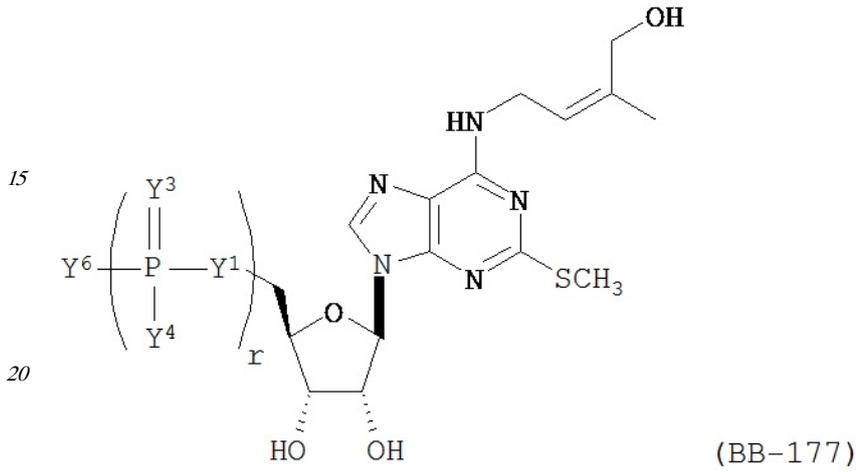
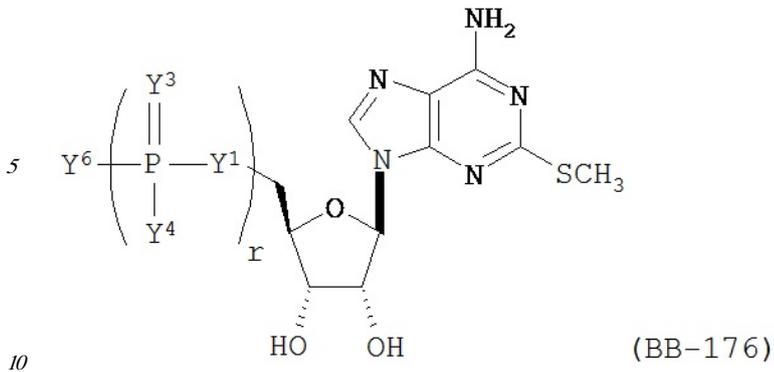


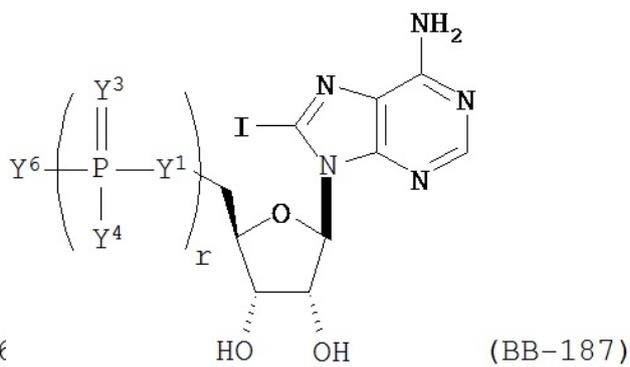
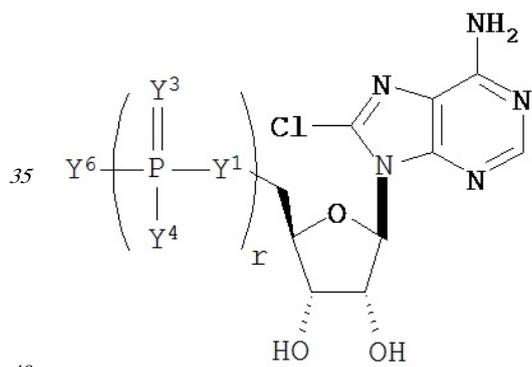
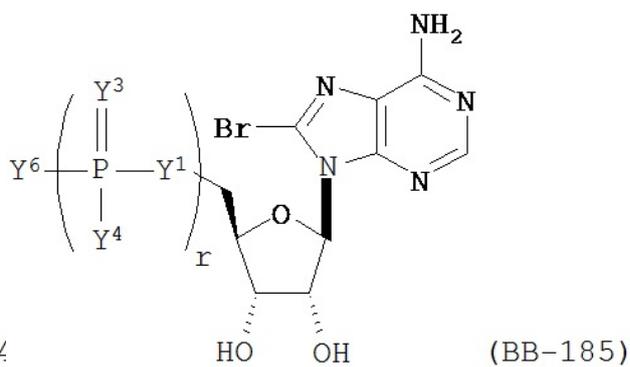
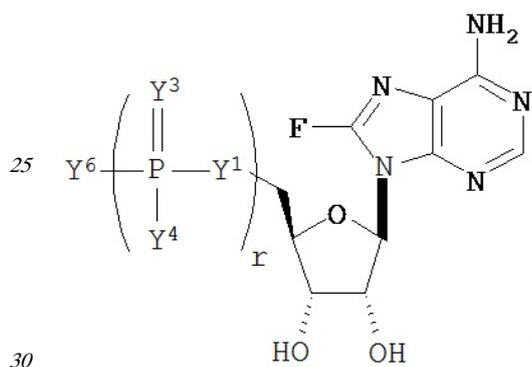
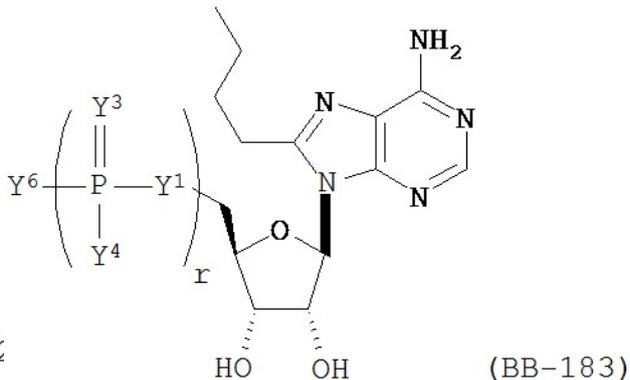
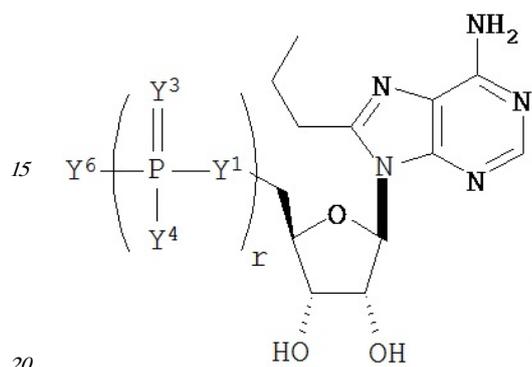
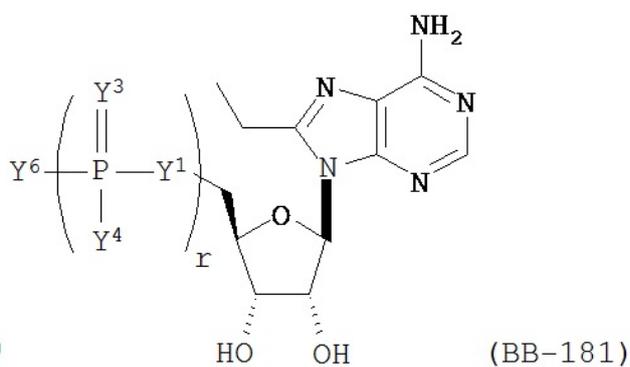
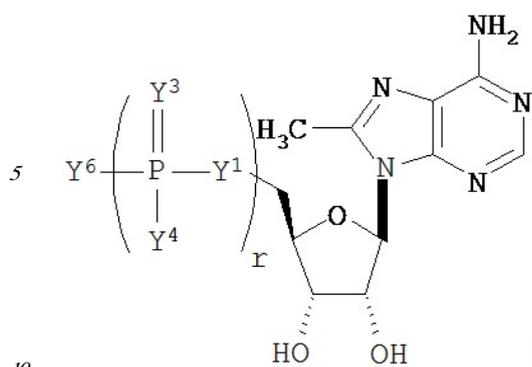
или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанных соединений, где каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5 (например, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5).

40 [00201] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представляет собой модифицированный аденозин (например, выбранный из группы, состоящей из:

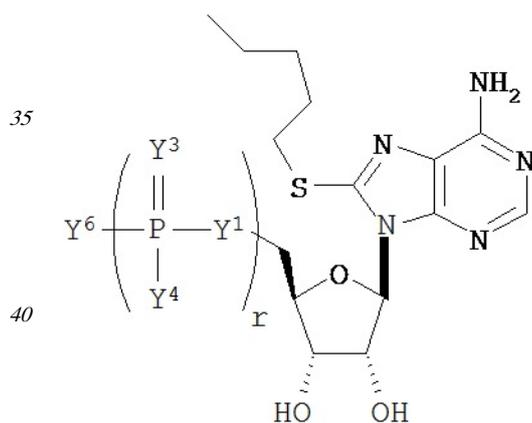
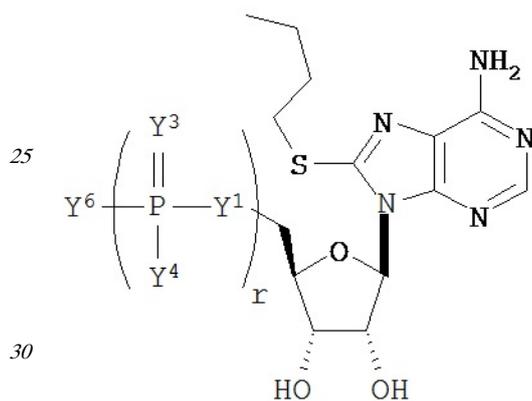
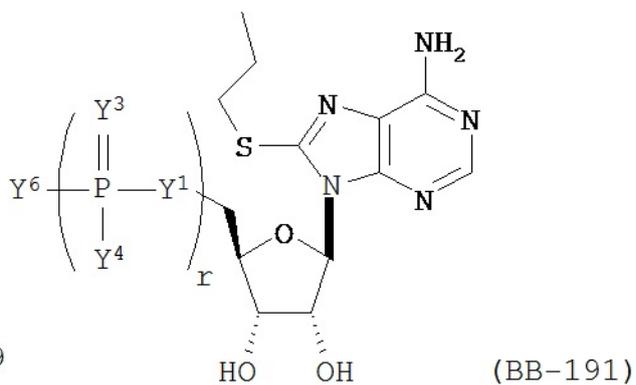
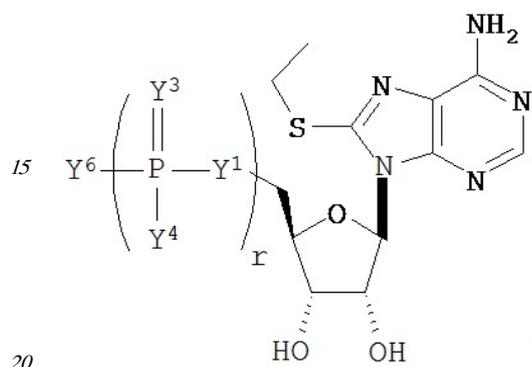
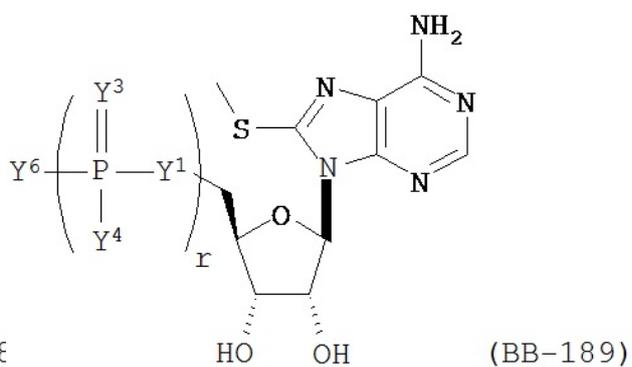
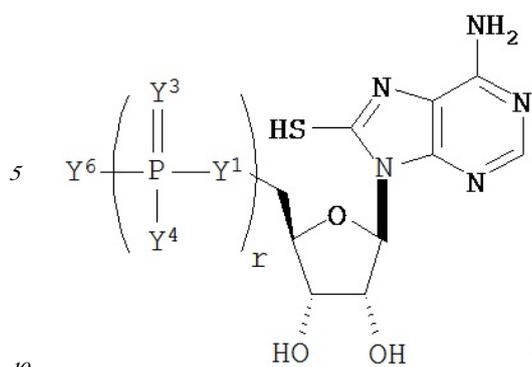




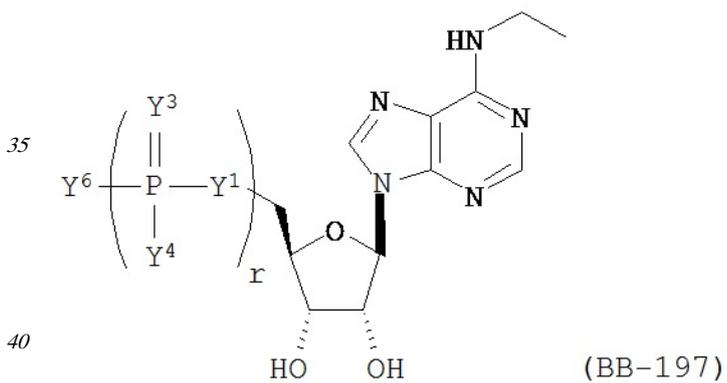
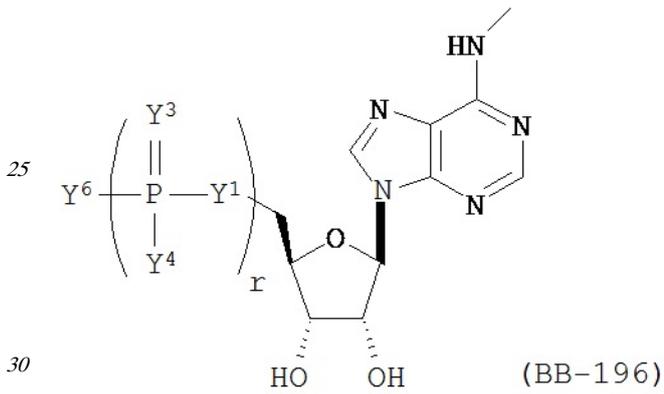
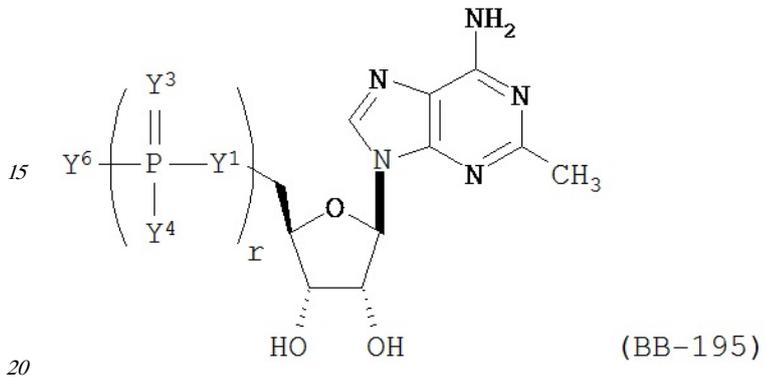
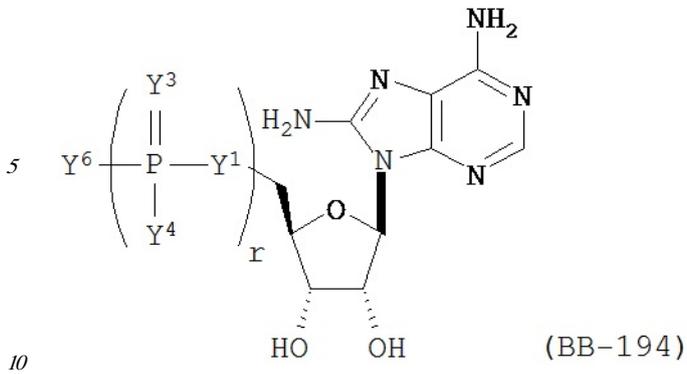




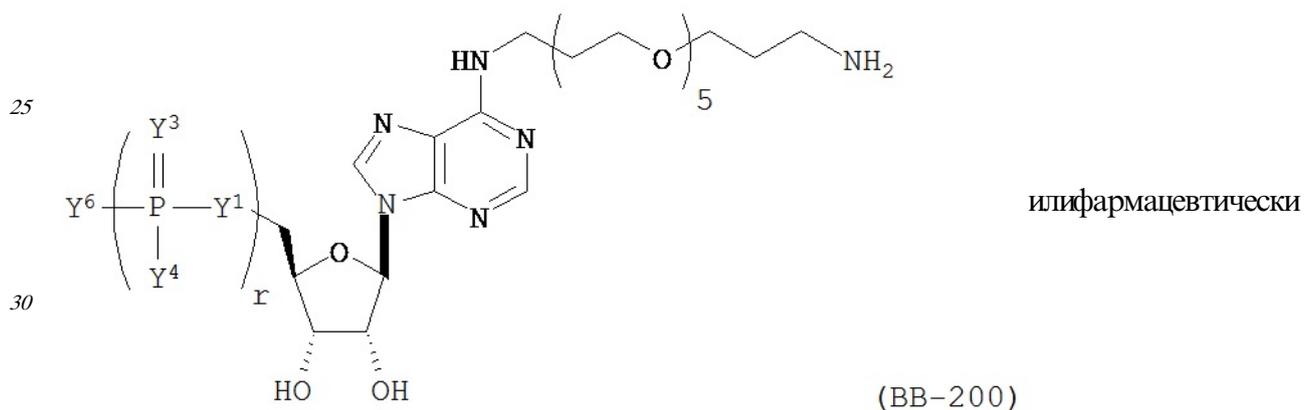
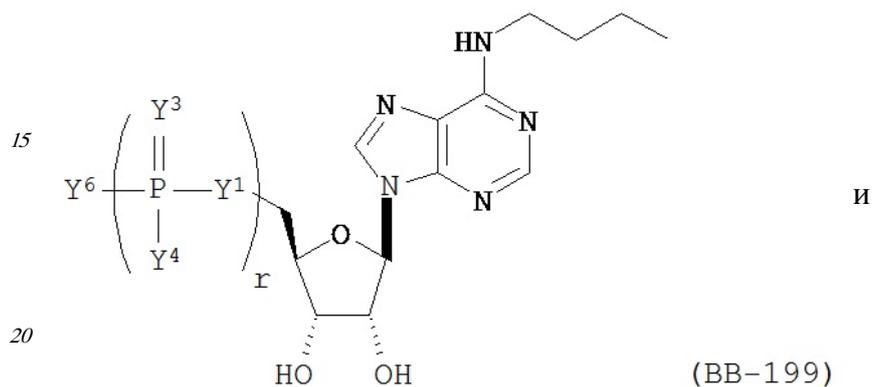
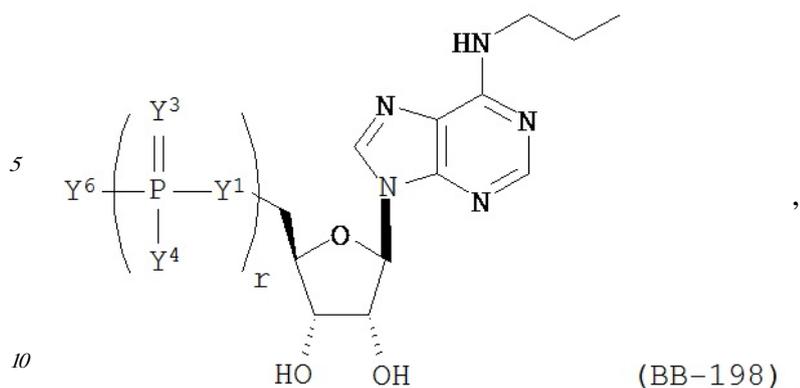
45



45



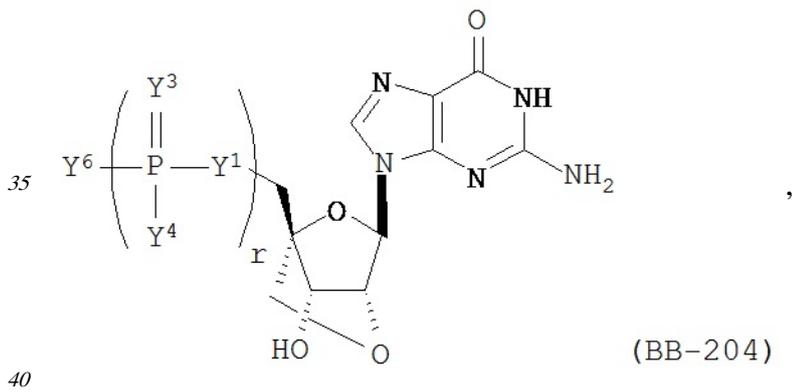
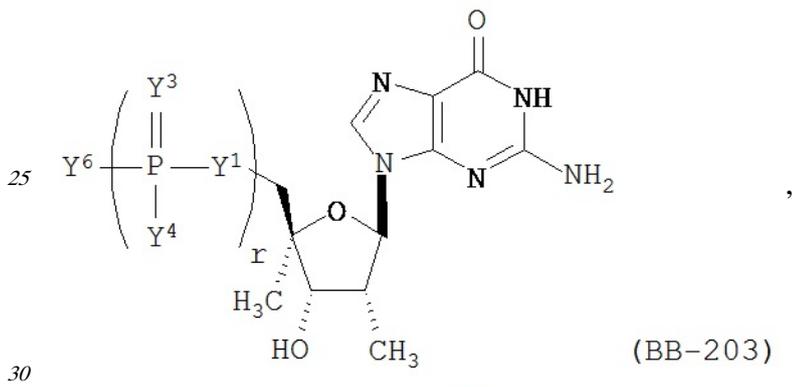
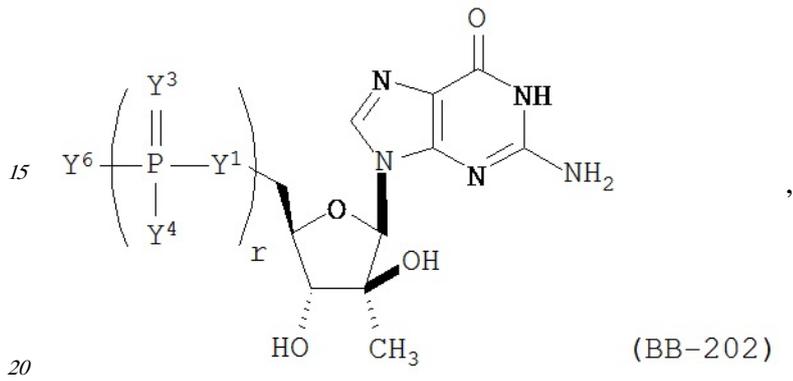
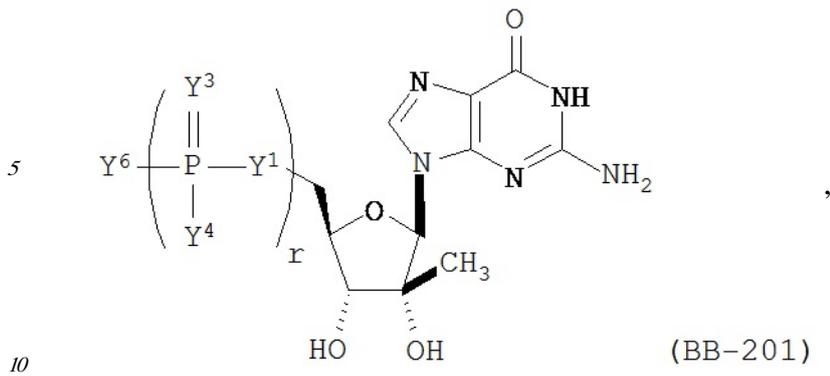
45



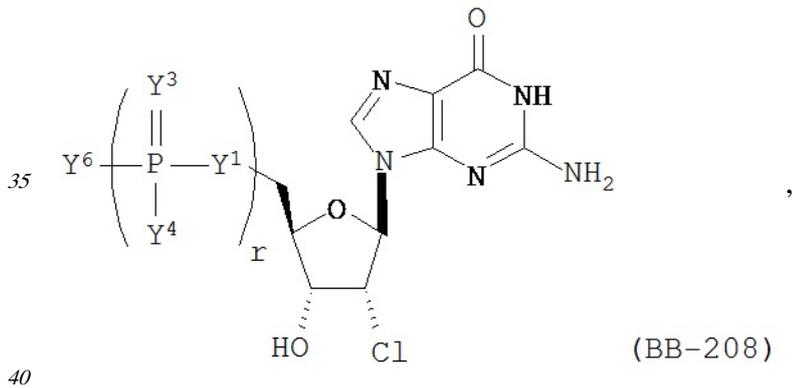
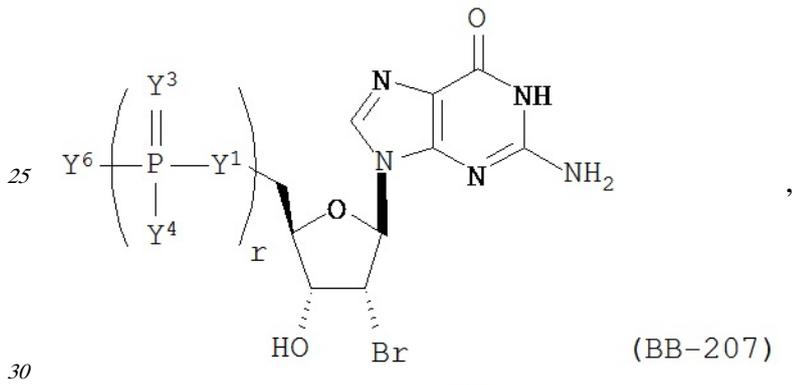
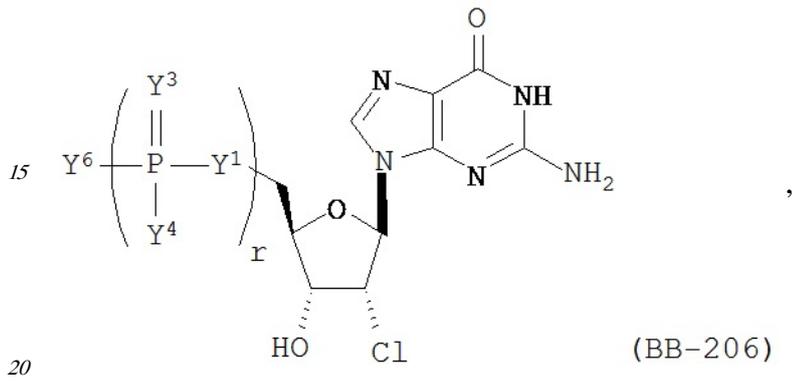
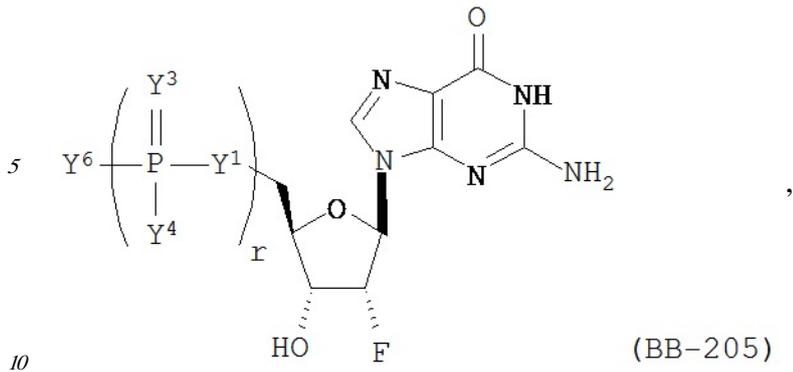
35 приемлемой соли или стереоизомера указанных соединений, где Y^1 , Y^3 , Y^4 , Y^6 и r являются такими, как раскрыто в настоящем документе (например, каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5, такому как от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5)).

[00202] В некоторых вариантах реализации молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, представляет собой модифицированный гуанозин (например, выбранный из группы,

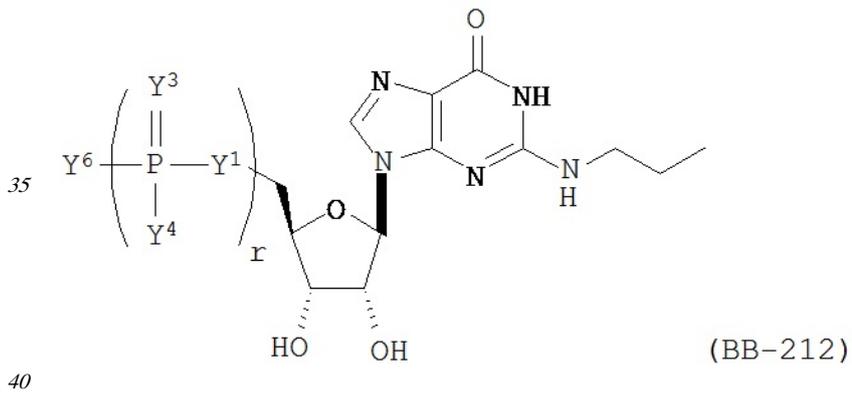
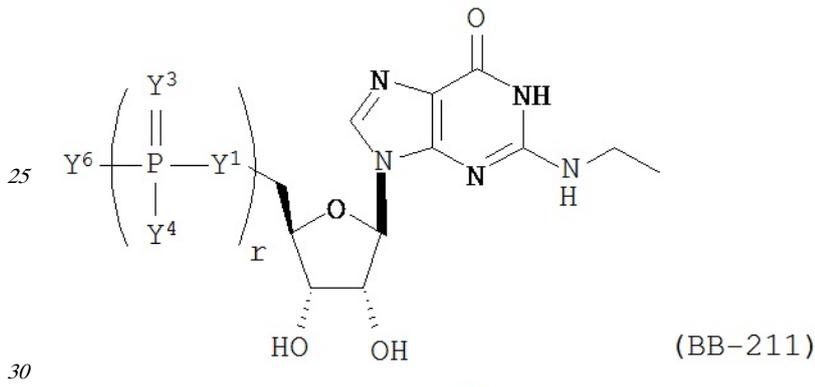
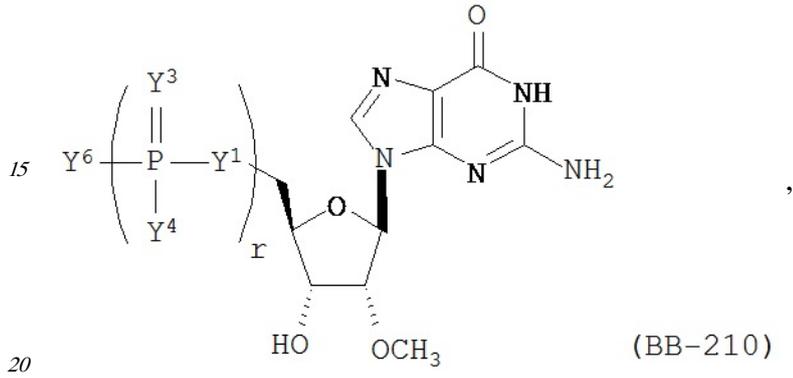
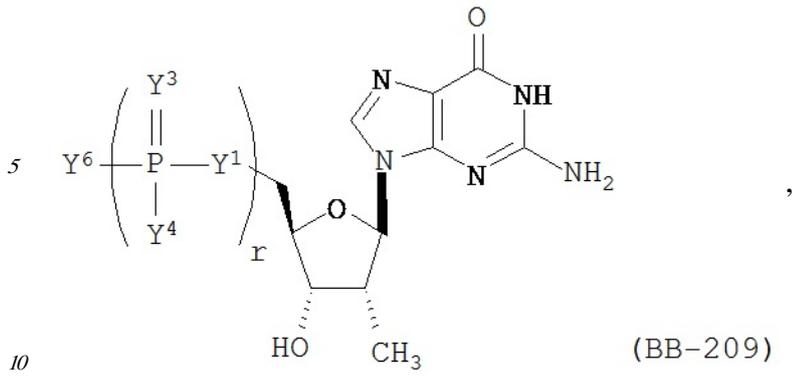
40 состоящей из:



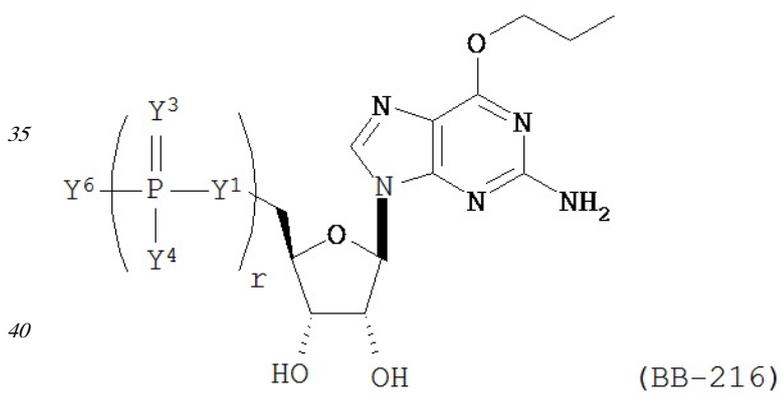
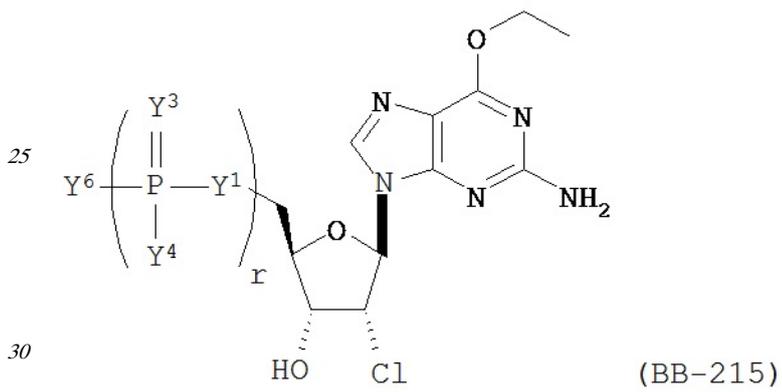
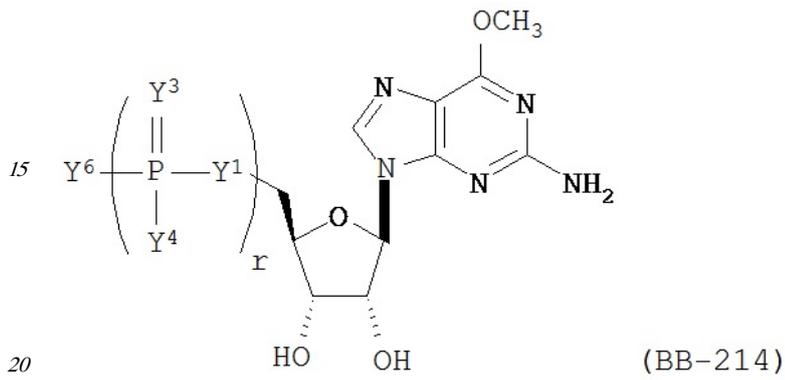
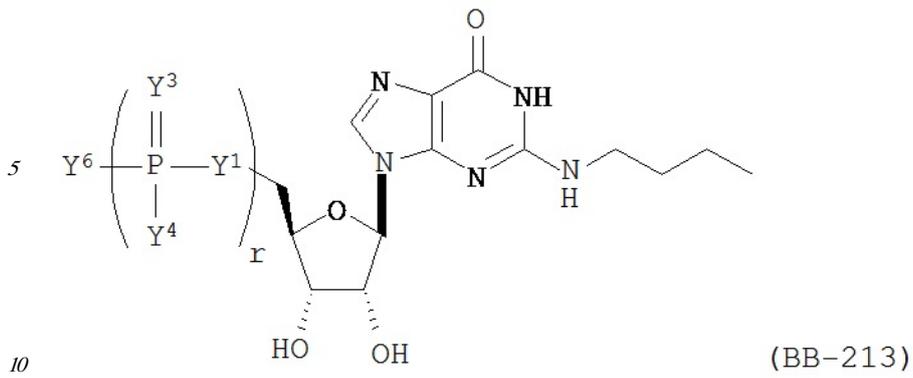
45



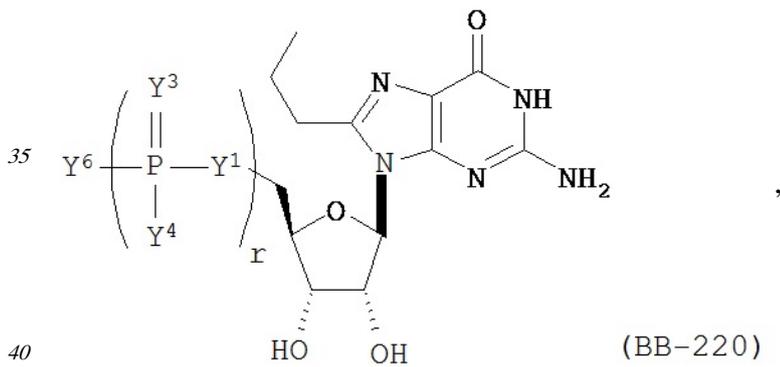
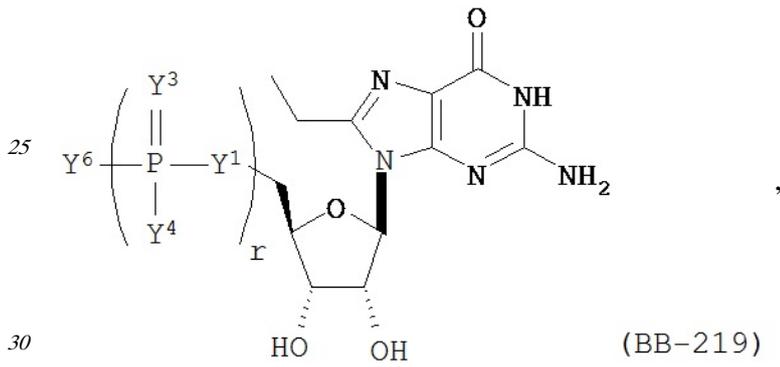
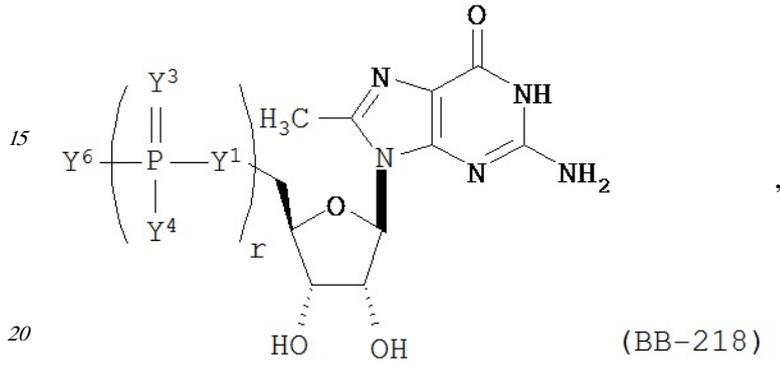
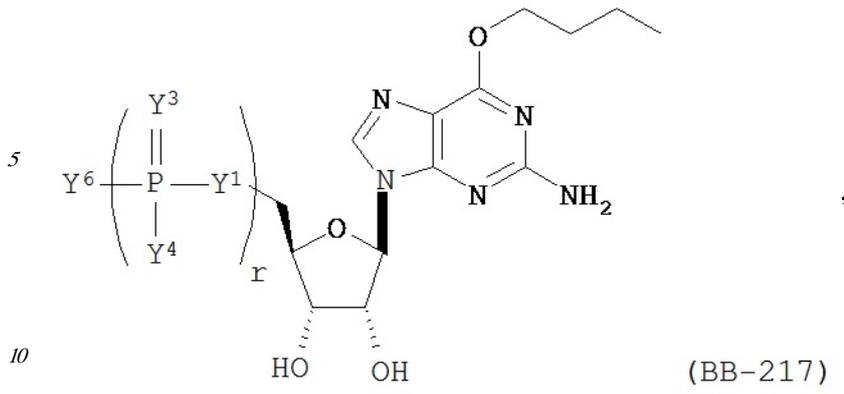
45



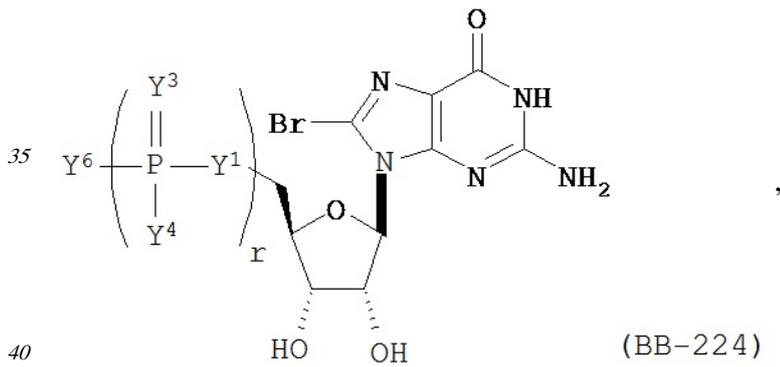
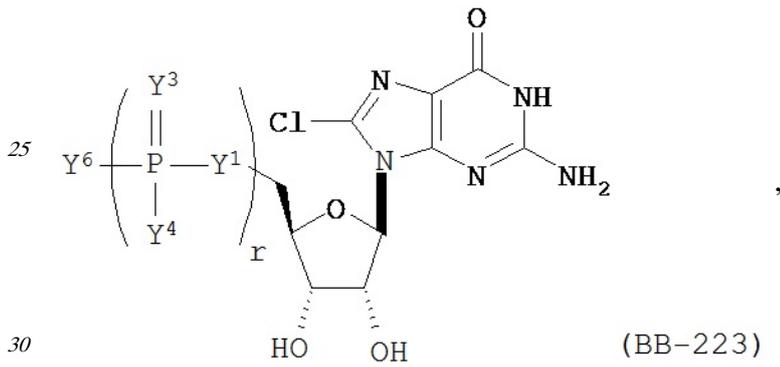
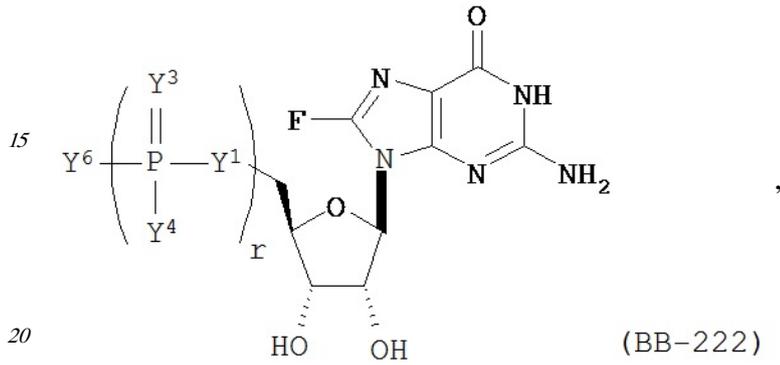
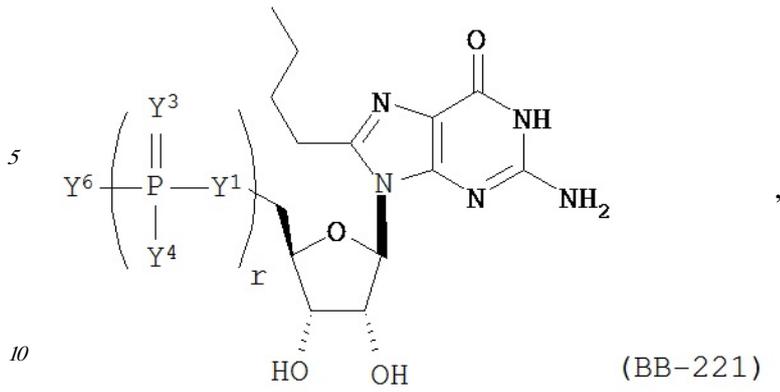
45



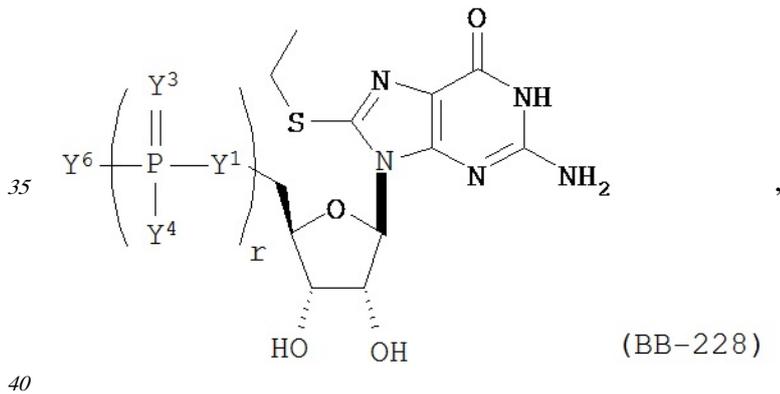
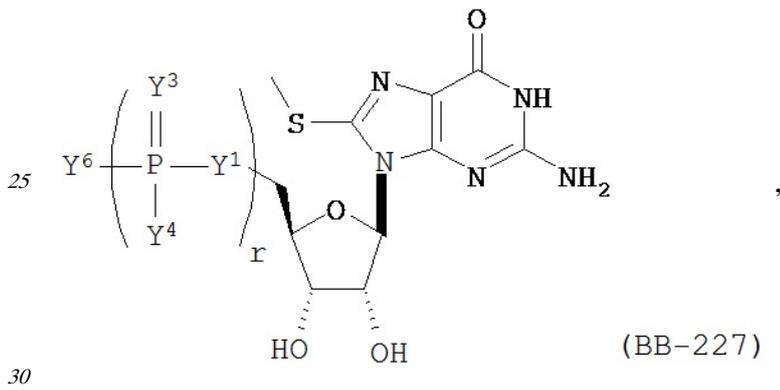
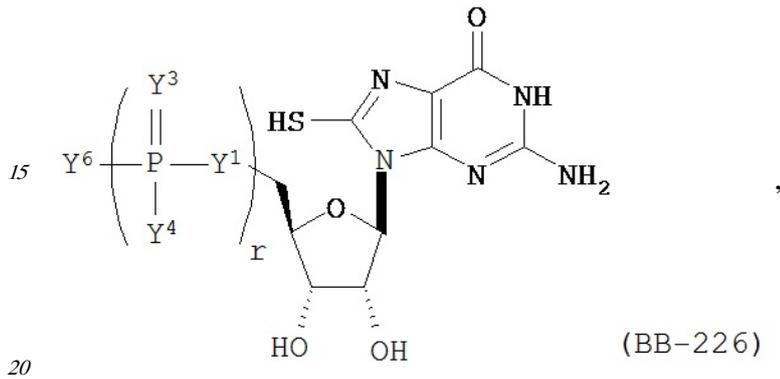
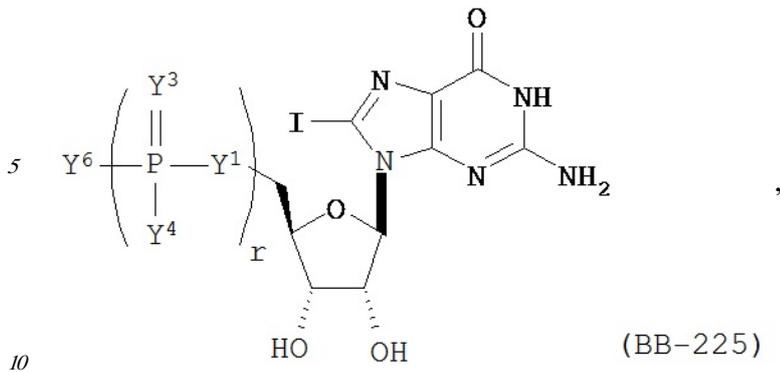
45



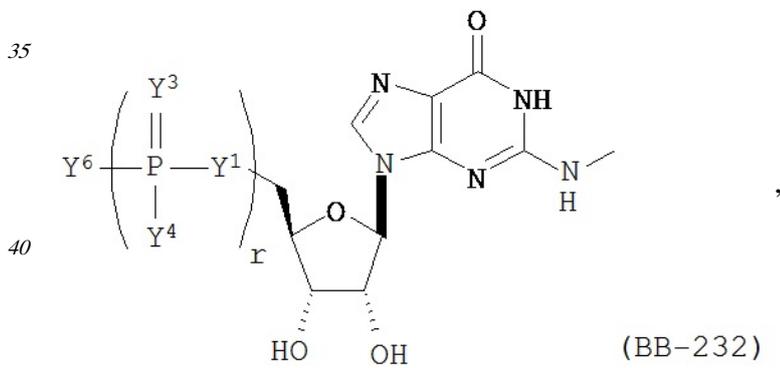
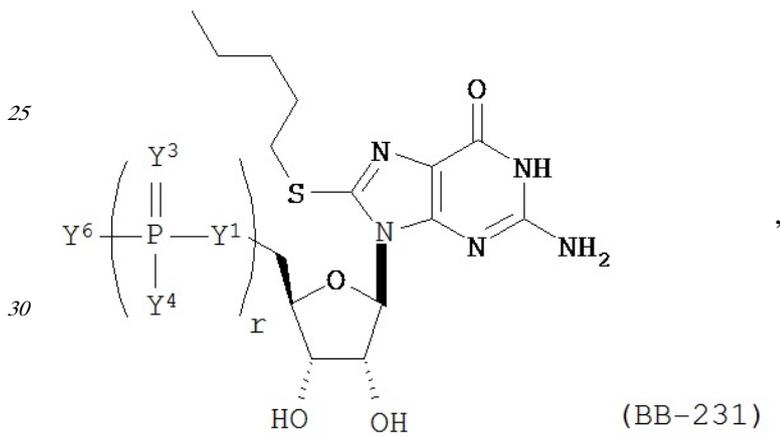
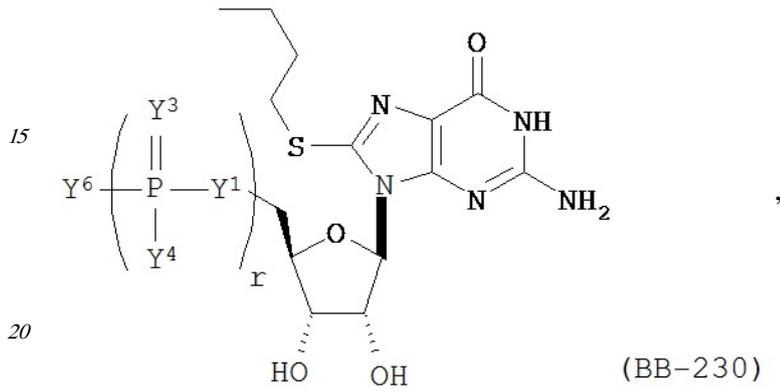
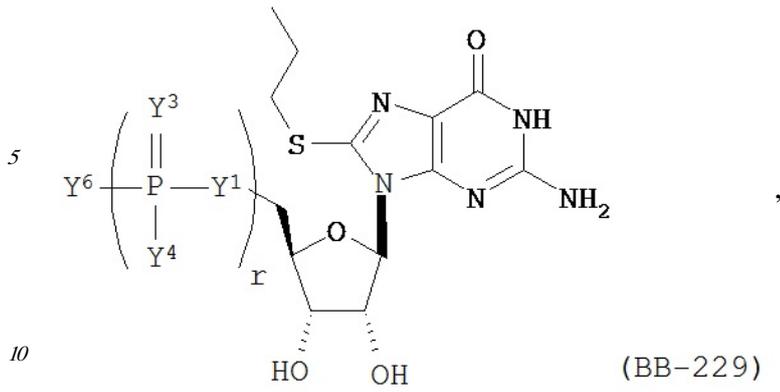
45



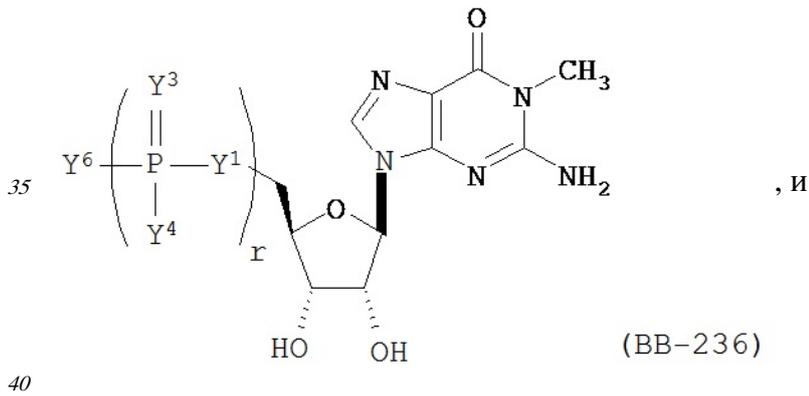
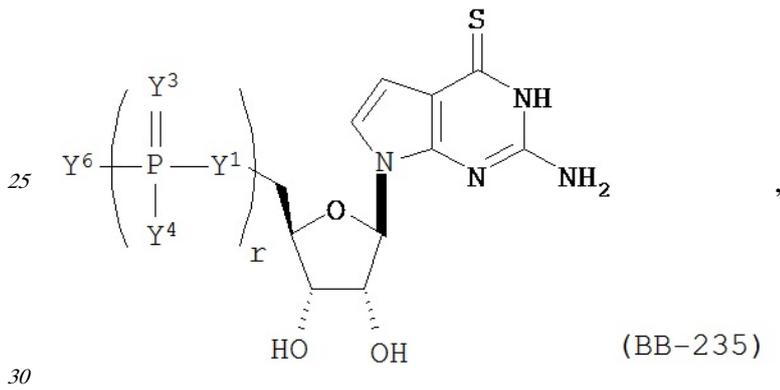
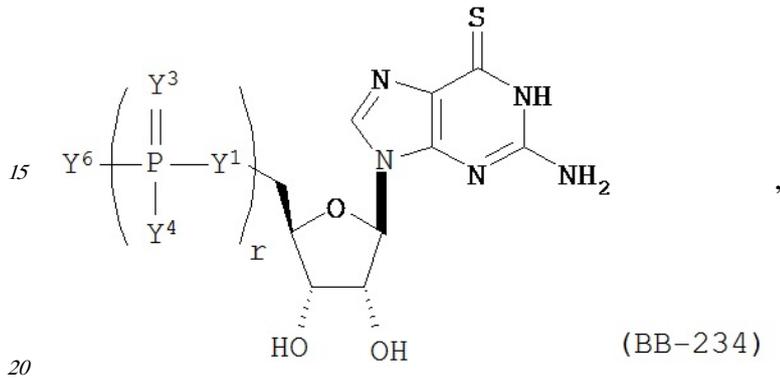
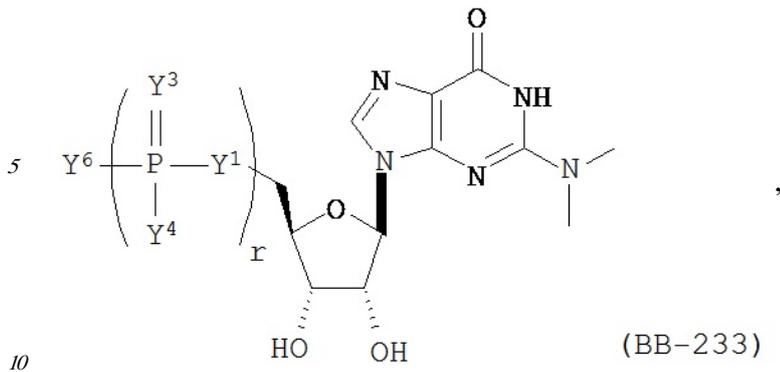
45

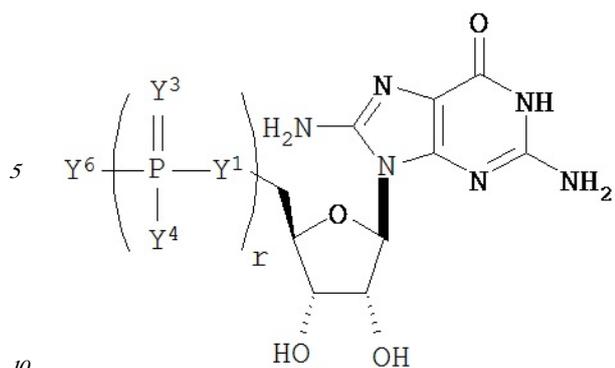


45



45



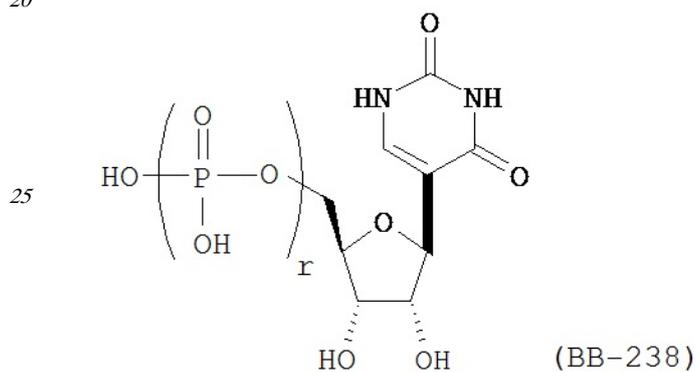


или фармацевтически приемлемой

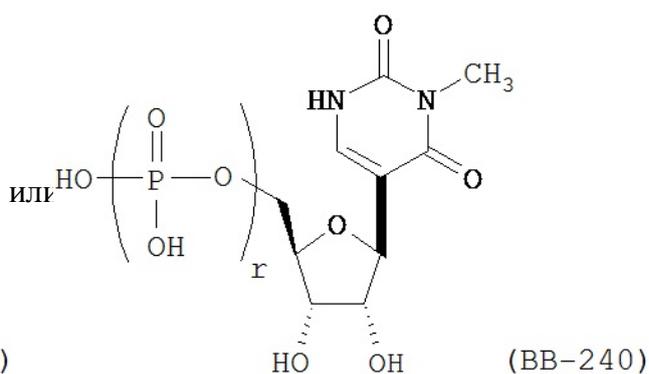
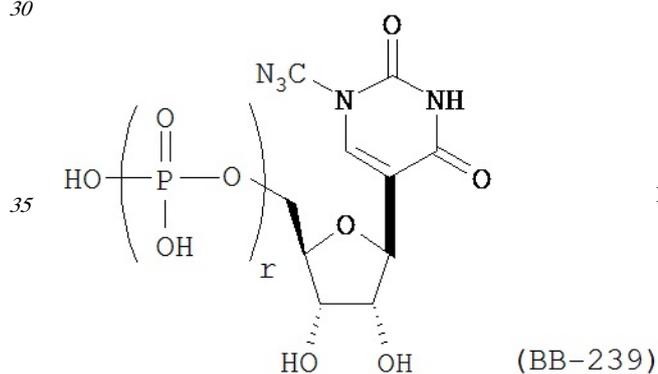
соли или стереоизомера указанных соединений, где Y^1 , Y^3 , Y^4 , Y^6 и r являются такими, как раскрыто в настоящем документе (например, каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5, такому как от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5)).

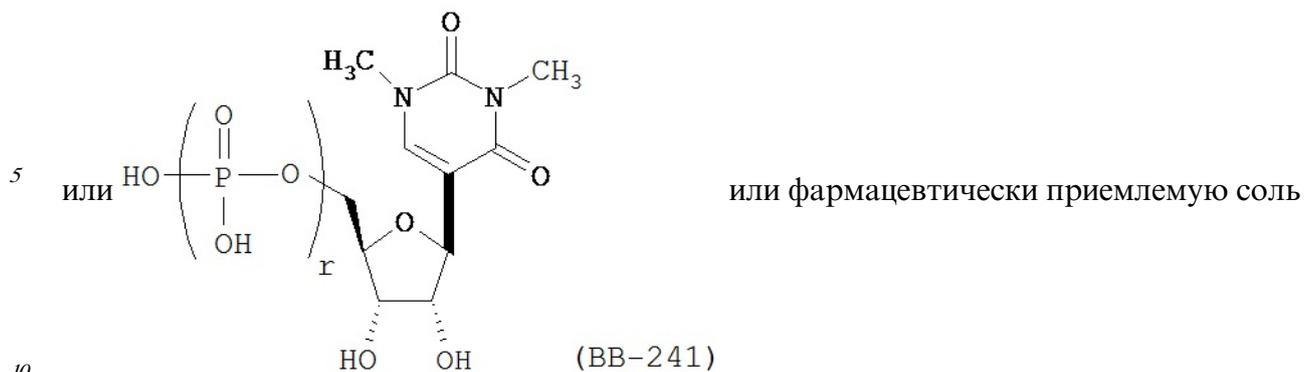
15 [00203] В некоторых вариантах реализации химическая модификация может включать замену группы C в положении $C-5$ кольца (например, для пиримидинового нуклеозида, такого как цитозин или урацил) N (например, замена группы $>CH$ в положении $C-5$ группой $>NR^{N1}$, где R^{N1} представляет собой H или необязательно замещенный алкил). Например, молекула мРНК, которая может быть введена в молекулу

20 модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, может представлять собой:



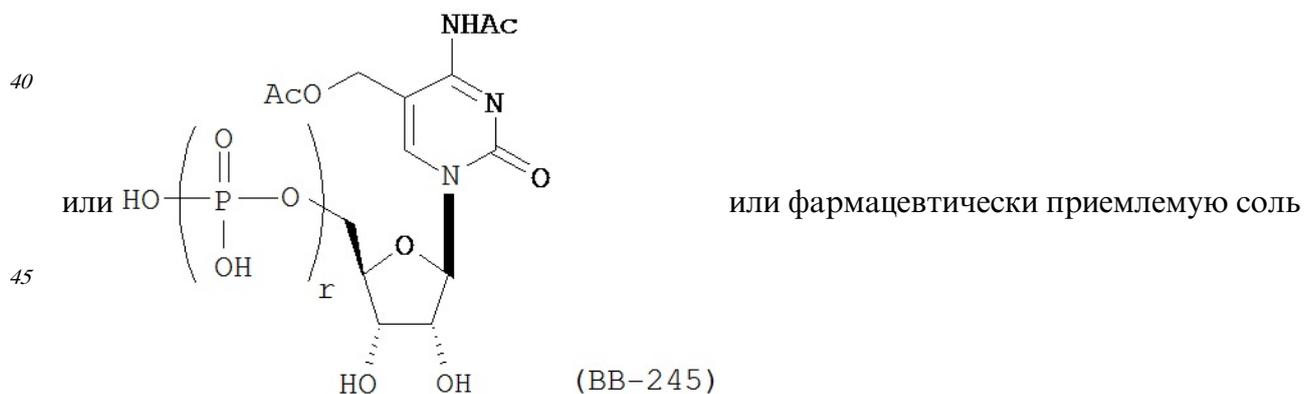
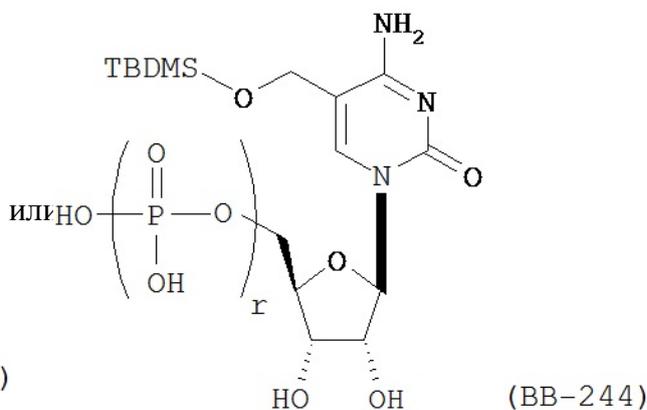
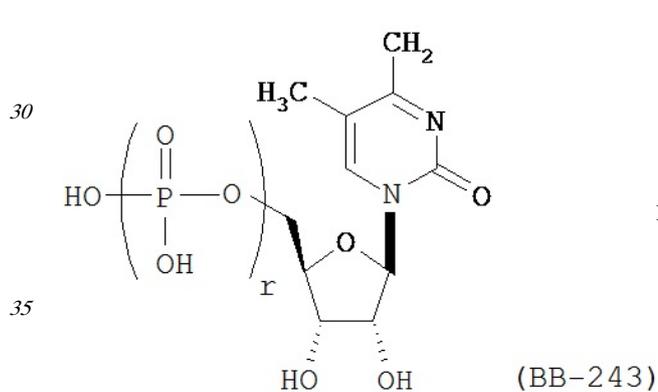
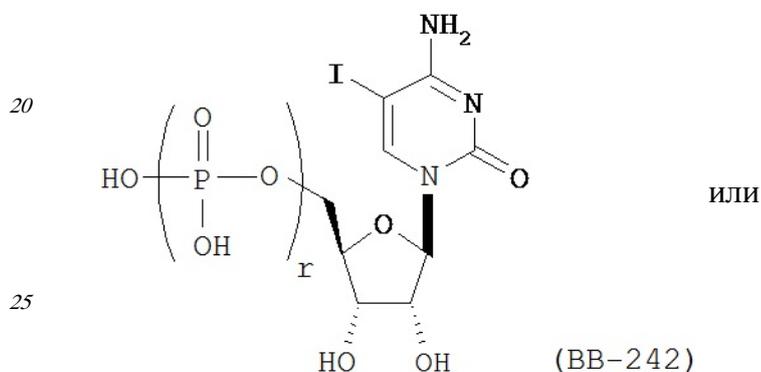
или





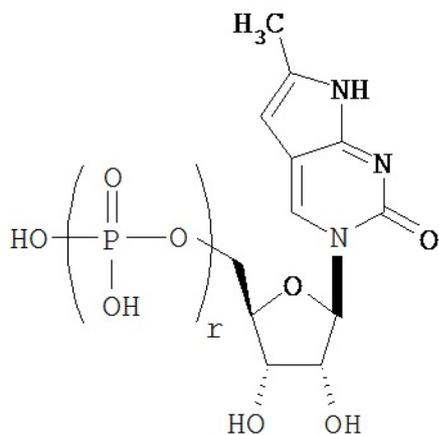
или стереоизомер указанных соединений, где каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5 (например, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5).

[00204] В другом варианте реализации химическая модификация может включать замену водорода в положении С-5 цитозина галогеном (например, Br, Cl, F или I) или необязательно замещенным алкилом (например, метилом). Например, молекула мРНК, которая может быть введена в модифицированную нуклеиновую кислоту или мРНК, может представлять собой:



или стереоизомер указанных соединений, где каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5 (например, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5).

[00205] Еще в одном варианте реализации химическая модификация может включать конденсированное кольцо, которое образуют NH_2 в положении С-4 и атом углерода в положении С-5. Например, молекула строительного блока, которая может быть введена в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, может представлять собой:



или фармацевтически приемлемую соль или

стереоизомер указанных соединений, где каждое r независимо равно целому числу от 0 до 5 (например, от 0 до 3, от 1 до 3 или от 1 до 5).

Модификации сахара

[00206] Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды (например, молекулы строительных блоков), которые могут быть введены в модифицированную нуклеиновую кислоту или мРНК (например, РНК или мРНК, как раскрыто в настоящем документе), могут быть модифицированы при остатке сахара рибонуклеиновой кислоты. Например, 2' гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована или заменена множеством различных заместителей. Примеры замещения в положении 2' включают, без ограничений, Н, галоген, необязательно замещенный C_{1-6} алкил; необязательно замещенный C_{1-6} алкокси; необязательно замещенный C_{6-10} арилокси; необязательно замещенный C_{3-8} циклоалкил; необязательно замещенный C_{6-10} арилокси; необязательно замещенный C_{6-10} арил- C_{1-6} алкокси, необязательно замещенный C_{1-12} (гетероциклил)окси; сахар (например, рибозу, пентозу или любой, раскрытый в настоящем документе); полиэтиленгликоль (ПЭГ), $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}$, где R представляет собой Н или необязательно замещенный алкил, и n равно целому числу от 0 до 20 (например, от 0 до 4, от 0 до 8, от 0 до 10, от 0 до 16, от 1 до 4, от 1 до 8, от 1 до 10, от 1 до 16, от 1 до 20, от 2 до 4, от 2 до 8, от 2 до 10, от 2 до 16, от 2 до 20, от 4 до 8, от 4 до 10, от 4 до 16 и от 4 до 20); циклические ("замкнутые") нуклеиновые кислоты (ЦНК), где 2'-гидроксил соединен C_{1-6} алкиленовым или C_{1-6} гетероалкиленовым мостиком с 4'-углеродом того же остатка рибозного сахара, при этом, примеры мостиков включают метилен, пропилен, эфирные или аминные мостики; аминоалкил, как определено в настоящем документе; аминоалкокси, как определено в настоящем документе; amino, как определено в настоящем документе; и аминокислоту, как определено в настоящем документе.

[00207] В общем, РНК содержит сахарную группу рибозы, которая представляет собой 5-членное кислородсодержащее кольцо. В качестве неограничивающего примера, модифицированные нуклеотиды содержат замену кислорода в рибозе (например, S, Se

или алкиленом, таким как метилен или этилен); добавление двойной связи (например, для замены рибозы циклопентенилом или циклогексенилом); сужение кольца рибозы (например, с образованием 4-членного кольца циклобутана или оксетана); расширение кольца рибозы (например, с образованием 6- или 7-членного кольца, содержащего дополнительный атом углерода или гетероатом, например, как в ангидрогекситоле, алтритоле, манните, циклогексаниле, циклогексениле и морфолино, который также содержит фосфорамидатный скелет); полициклические формы (например, трицикло; и формы "с раскрытым циклом", такие как гликольнуклеиновая кислота (ГНК) (например, R-ГНК или S-ГНК, где рибоза заменена фрагментами гликоля, присоединенными к фосфодиэфирным связям), треозонуклеиновая кислота (ТНК, где рибоза заменена α -L-треофуранозил-(3'→2')) и пептиднуклеиновая кислота (ПНК, где 2-амино-этил-глициновые связи заменяют рибозу и фосфодиэфирный скелет). Сахарная группа также может содержать один или более атомов углерода с противоположной стереохимической конфигурацией, по сравнению с соответствующим атомом углерода в рибозе. Таким образом, молекула модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК может содержать нуклеотиды, которые содержат, например, арабинозу, в качестве сахара.

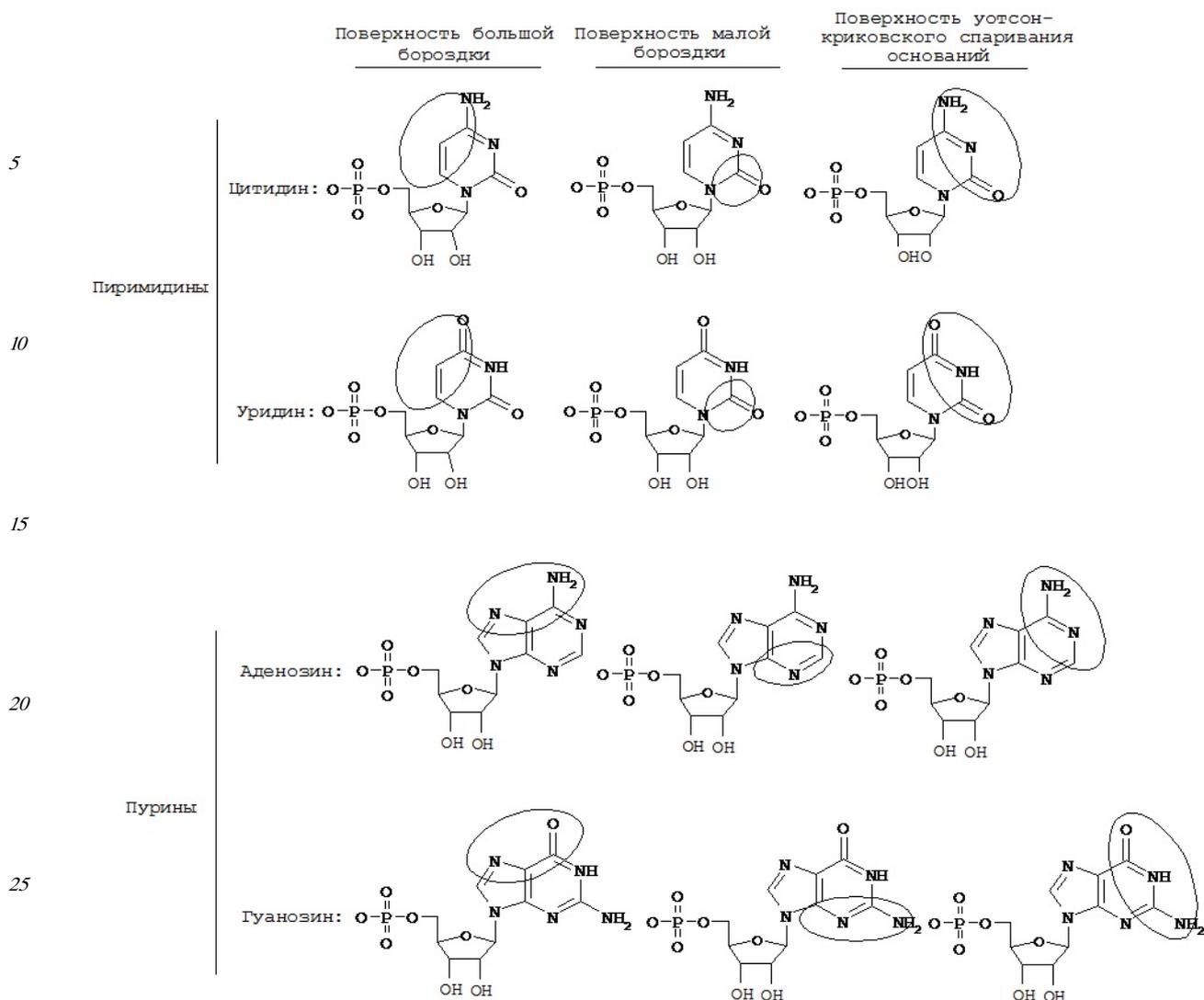
Модификации нуклеинового основания

[00208] В настоящем документе раскрыты модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды. Как раскрыто в настоящем документе "нуклеозид" определен как соединение, содержащее молекулу сахара (например, пентозу или рибозу) или ее производное в сочетании с органическим основанием (например, пуриновым или пиримидиновым) или его производным. Как раскрыто в настоящем документе, "нуклеотид" определен как нуклеозид, содержащий фосфатную группу.

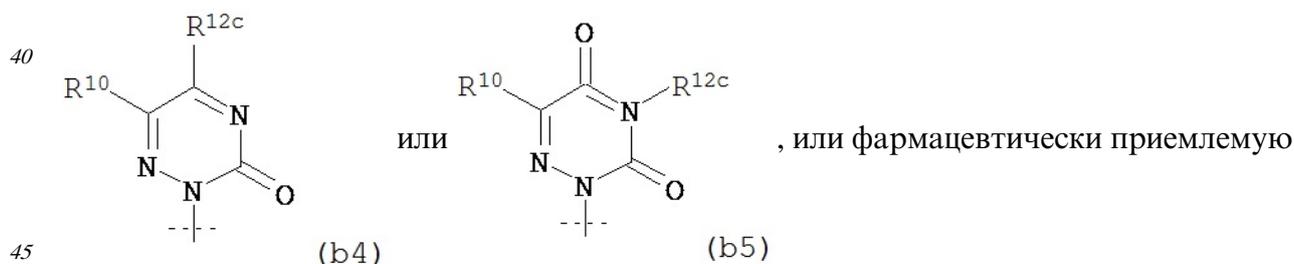
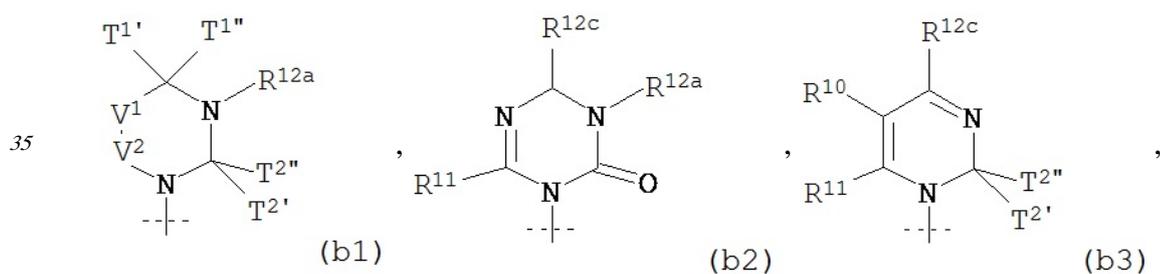
Модифицированные нуклеотиды (например, модифицированная мРНК) могут быть синтезированы любым пригодным способом, как раскрыто в настоящем документе (например, химическим, ферментным или рекомбинантным для введения одного или более модифицированных или неприродных нуклеозидов).

[00209] Спаривание модифицированных нуклеотидных оснований охватывает не только стандартные пары оснований аденозин-тимин, аденозин-урацил или гуанозин-цитозин, но также пары оснований, образованные между нуклеотидами и/или модифицированными нуклеотидами, содержащими нестандартные или модифицированные основания, где реорганизация доноров водородной связи и акцептором водородной связи позволяет образование водородных связей между нестандартным основанием и стандартным основанием или между двумя комплементарными структурами нестандартных оснований. Одним из примеров такого спаривания нестандартных оснований является спаривание оснований между модифицированными нуклеотидами инозина и аденина, цитозина или урацила.

[00210] Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут содержать модифицированное нуклеиновое основание. Примеры нуклеиновых оснований, найденных в РНК, включают, без ограничений, аденин, гуанин, цитозин и урацил. Примеры нуклеиновых оснований, найденных в ДНК, включают, без ограничений, аденин, гуанин, цитозин и тимин. Указанные нуклеиновые основания могут быть модифицированы или полностью заменены с получением молекул модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК с улучшенными свойствами, например, устойчивостью к нуклеазам посредством разрушения связывания с основным партнером по взаимодействию бороздок. В Табл. 1 ниже приведены химические «поверхности» каждого из канонических нуклеотидов. Круги обозначают атомы, из которых состоят соответствующие химические участки.



[00211] В некоторых вариантах реализации В представляет собой модифицированный урацил. В качестве примера, модифицированный урацил включает соединения Формул (b1)-(b5):



соль или стереоизомер указанных соединений, где

[00212] представляет собой одинарную или двойную связь;

[00213] каждый из $T^{1'}$, $T^{1''}$, $T^{2'}$ и $T^{2''}$ независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси или необязательно замещенный тиаалкокси, или комбинация $T^{1'}$ и $T^{1''}$ или комбинация $T^{2'}$ и $T^{2''}$ вместе (например, как в T^2) образуют O (оксо), S (тио) или Se (селено);

[00214] каждый из V^1 и V^2 независимо представляет собой O, S, $N(R^{Vb})_{nv}$ или $C(R^{Vb})_{nv}$, где nv равно целому числу от 0 до 2, и каждый независимо представляет собой H, галоген, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный галогеналкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный гидроксикалкил, необязательно замещенный гидроксикалкенил, необязательно замещенный гидроксикалкинил, необязательно замещенный аминокалкил (например, замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе, например, трифторацетил), необязательно замещенный аминокалкенил, необязательно замещенный аминокалкинил, необязательно замещенный ациламиникалкил (например, замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе, например, трифторацетил), необязательно замещенный алкоксикарбоникалкил, необязательно замещенный алкоксикарбоникалкенил, необязательно замещенный алкоксикарбоникалкинил или необязательно замещенный алкоксикарбоникалкокси (например, необязательно замещенный любым заместителем, раскрытым в настоящем документе, таким как заместители, выбранные из (1)-(21), для алкила);

[00215] R^{10} представляет собой H, галоген, необязательно замещенную аминокислоту, гидрокси, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный аминокалкил, необязательно замещенный гидроксикалкил, необязательно замещенный гидроксикалкенил, необязательно замещенный гидроксикалкинил, необязательно замещенный аминокалкенил, необязательно замещенный аминокалкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкоксикарбоникалкил, необязательно замещенный алкоксикарбоникалкенил, необязательно замещенный алкоксикарбоникалкинил, необязательно замещенный алкоксикарбоникалкокси, необязательно замещенный карбоксиалкокси, необязательно замещенный карбоксиалкил или необязательно замещенный карбамоилалкил;

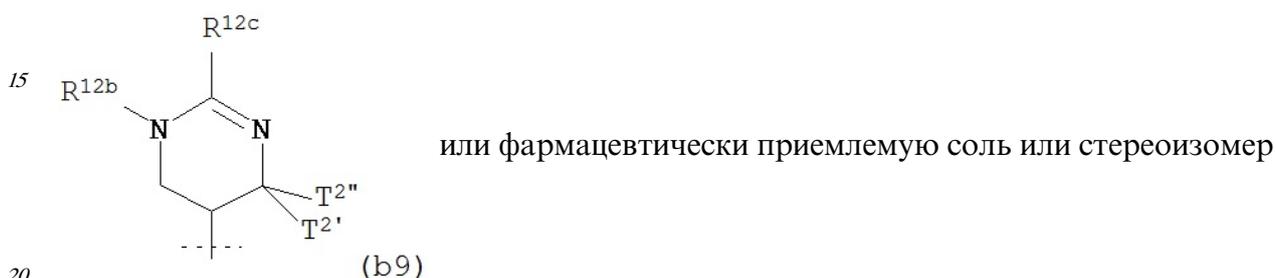
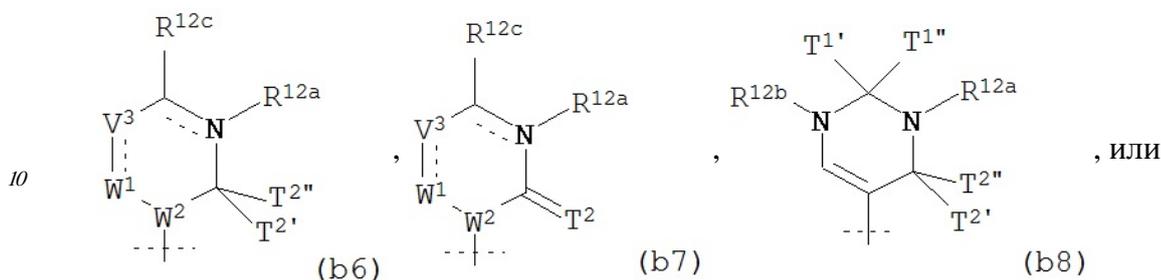
[00216] R^{11} представляет собой H или необязательно замещенный алкил;

[00217] R^{12a} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный гидроксикалкил, необязательно замещенный гидроксикалкенил, необязательно замещенный гидроксикалкинил, необязательно замещенный аминокалкил, необязательно замещенный аминокалкенил или необязательно замещенный аминокалкинил, необязательно замещенный карбоксиалкил (например, необязательно замещенный гидрокси), необязательно замещенный карбоксиалкокси, необязательно замещенный карбоксиаминокалкил или необязательно замещенный карбамоилалкил;

[00218] R^{12c} представляет собой H, галоген, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный тиаалкокси, необязательно замещенный амина, необязательно замещенный гидроксикалкил,

необязательно замещенный гидроксикалкенил, необязательно замещенный гидроксикалкил, необязательно замещенный аминоалкил, необязательно замещенный аминоалкенил или необязательно замещенный аминоалкинил.

[00219] Другие примеры модифицированного урацила включают соединения Формул (b6)-(b9):



указанных соединений, где

[00220] --- представляет собой одинарную или двойную связь;

[00221] каждый из $T^{1'}$, $T^{1''}$, $T^{2'}$ и $T^{2''}$ независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси или необязательно замещенный тиоалкокси, или комбинация $T^{1'}$ и $T^{1''}$ вместе (например, как в $T^{1'}$) или комбинация $T^{2'}$ и $T^{2''}$ вместе (например, как в $T^{2'}$) образуют O (оксо), S (тио) или Se (селено), или каждый из $T^{1'}$ и $T^{2'}$ независимо представляет собой O (оксо), S (тио) или Se (селено);

[00222] каждый из W^1 и W^2 независимо представляет собой $N(R^{Wa})_{pw}$ или $C(R^{Wa})_{pw}$, где pw равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^{Wa} независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный алкокси;

[00223] каждый V^3 независимо представляет собой O, S, $N(R^{Va})_{pv}$ или $C(R^{Va})_{pv}$, где pv равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^{Va} независимо представляет собой H, галоген, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный гидроксикалкенил, необязательно замещенный гидроксикалкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный алкгетероцикл, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси или необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкил (например, замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе, например, трифторацетил или сульфоалкил), необязательно замещенный аминоалкенил, необязательно замещенный аминоалкинил, необязательно замещенный ациламиноалкил (например, замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе, например, трифторацетил), необязательно замещенный алкоксикарбонилалкил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкенил,

необязательно замещенный алкоксикарбонилалкинил, необязательно замещенный алкоксикарбонилацил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкокси, необязательно замещенный карбоксиалкил (например, необязательно замещенный гидроксид и/или О-защитной группой), необязательно замещенный карбоксиалкокси, необязательно замещенный карбоксиаминоалкил или необязательно замещенный карбамоилалкил (например, необязательно замещенный любым заместителем, раскрытым в настоящем документе, таким как выбранные из (1)-(21), для алкила), и где R^{Va} и R^{12c} , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, могут образовывать необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероцикл (например, 5- или 6-членное кольцо);

[00224] R^{12a} представляет собой Н, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный гидроксид, необязательно замещенный гидроксидалкил, необязательно замещенный гидроксидалкинил, необязательно замещенный гидроксидалкинил, необязательно замещенный аминокислотный алкил, необязательно замещенный аминокислотный алкинил, необязательно замещенный карбоксиалкил (например, необязательно замещенный гидроксид и/или О-защитной группой), необязательно замещенный карбоксиалкокси, необязательно замещенный карбоксиаминоалкил, необязательно замещенный карбамоилалкил или отсутствует;

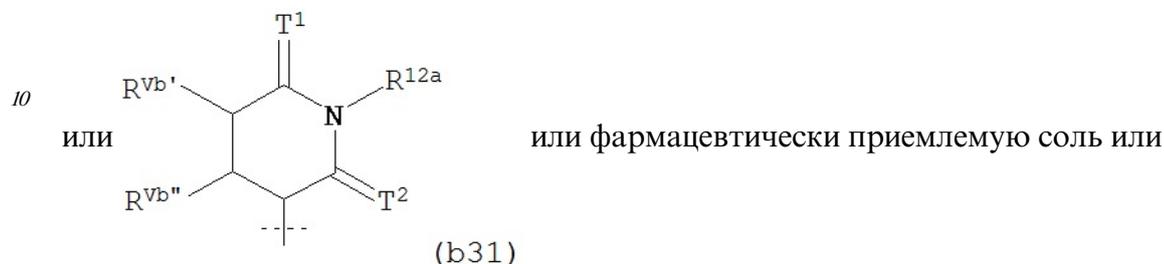
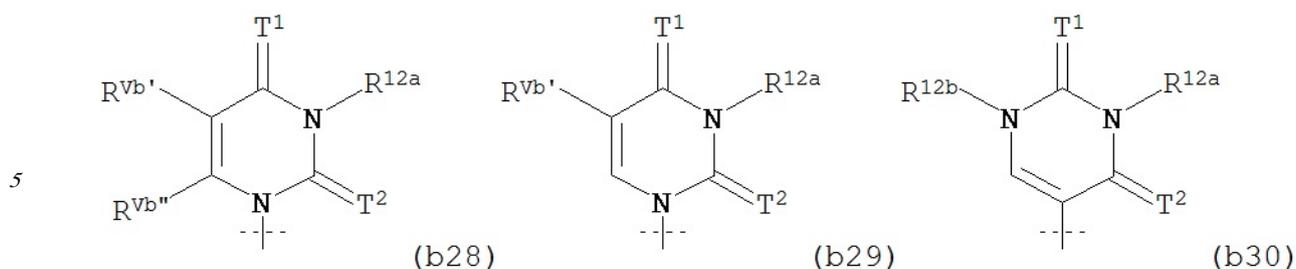
[00225] R^{12b} представляет собой Н, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гидроксид, необязательно замещенный гидроксидалкил, необязательно замещенный гидроксидалкинил, необязательно замещенный гидроксидалкинил, необязательно замещенный аминокислотный алкил, необязательно замещенный аминокислотный алкинил, необязательно замещенный алкиларил, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный алкилгетероцикл, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкоксикарбонилацил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкокси, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкинил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкокси, необязательно замещенный карбоксиалкил (например, необязательно замещенный гидроксид и/или О-защитной группой), необязательно замещенный карбоксиалкокси, необязательно замещенный карбоксиаминоалкил или необязательно замещенный карбамоилалкил,

[00226] где комбинация R^{12b} и $T^{1'}$ или комбинация R^{12b} и R^{12c} могут быть объединены с образованием необязательно замещенного гетероцикла; и

[00227] R^{12c} представляет собой Н, галоген, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный тиоалкокси, необязательно замещенный амина, необязательно замещенный аминокислотный алкил, необязательно замещенный аминокислотный алкинил или необязательно замещенный аминокислотный алкинил.

[00228] Другие примеры модифицированного урацила включают соединения Формул (b28)-(b31):

45



15 стереоизомер указанных соединений, где

[00229] каждый из T^1 и T^2 независимо представляет собой O (оксо), S (тио) или Se (селено);

[00230] каждый $R^{Vb'}$ и $R^{Vb''}$ независимо представляет собой H, галоген, необязательно
 20 замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкил, необязательно
 замещенный галогеналкил, необязательно замещенный гидроксиалкил, необязательно
 замещенный гидроксиалкенил, необязательно замещенный гидроксиалкинил,
 необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно
 25 замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно
 замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкил (например,
 замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе,
 например, трифторацетил или сульфоалкил), необязательно замещенный аминоалкенил,
 необязательно замещенный аминоалкинил, необязательно замещенный ациламиноалкил
 (например, замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем
 30 документе, например, трифторацетил), необязательно замещенный
 алкоксикарбонилалкил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкенил,
 необязательно замещенный алкоксикарбонилалкинил, необязательно замещенный
 алкоксикарбонилацил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкокси,
 необязательно замещенный карбоксиалкил (например, необязательно замещенный
 35 гидрокси и/или O-защитной группой), необязательно замещенный карбоксиалкокси,
 необязательно замещенный карбоксиаминоалкил или необязательно замещенный
 карбамоилалкил (например, необязательно замещенный любым заместителем,
 раскрытым в настоящем документе, таким как выбранные из (1)-(21), для алкила)
 (например, $R^{Vb'}$ представляет собой необязательно замещенный алкил, необязательно
 40 замещенный алкенил или необязательно замещенный аминоалкил, например,
 замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе,
 например, трифторацетил или сульфоалкил);

[00231] R^{12a} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно
 45 замещенный карбоксиаминоалкил, необязательно замещенный аминоалкил (например,
 замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе,
 например, трифторацетил или сульфоалкил), необязательно замещенный аминоалкенил
 или необязательно замещенный аминоалкинил; и

[00232] R^{12b} представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно

замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гидроксилалкил, необязательно замещенный гидроксилалкенил, необязательно замещенный гидроксилалкинил, необязательно замещенный аминоксилалкил, необязательно замещенный аминоксилалкенил, необязательно замещенный аминоксилалкинил (например, например, замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе, например, трифторацетил или сульфоалкил),

[00233] необязательно замещенный алкоксикарбонилалкил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкокси, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкенил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкинил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкокси, необязательно замещенный карбоксилалкокси, необязательно замещенный карбоксилалкил или необязательно замещенный карбамоилалкил.

[00234] В конкретных вариантах реализации T^1 представляет собой O (оксо) и T^2 представляет собой S (тио) или Se (селено). В других вариантах реализации T^1 представляет собой S (тио) и T^2 представляет собой O (оксо) или Se (селено). В некоторых вариантах реализации $R^{Vb'}$ представляет собой H, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный алкокси.

[00235] В других вариантах реализации каждый R^{12a} и R^{12b} независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил или необязательно замещенный гидроксилалкил. В конкретных вариантах реализации R^{12a} представляет собой H. В других вариантах реализации R^{12a} и R^{12b} оба представляют собой H.

[00236] В некоторых вариантах реализации каждый $R^{Vb'}$ в R^{12b} независимо представляет собой необязательно замещенный аминоксилалкил (например, замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе, например, трифторацетил или сульфоалкил), необязательно замещенный аминоксилалкенил, необязательно замещенный аминоксилалкинил или необязательно замещенный ациламиноалкил (например, замещенный N-защитной группой, такой как любая, раскрытая в настоящем документе, например, трифторацетил). В некоторых вариантах реализации аминоксилалкил и/или алкил в необязательно замещенном аминоксилалкиле замещен одним или более из необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного сульфоалкила, необязательно замещенного карбокси (например, замещенного O-защитной группой), необязательно замещенного гидрокси (например, замещенного O-защитной группой), необязательно замещенного карбоксилалкила (например, замещенного O-защитной группой), необязательно замещенного алкоксикарбонилалкила (например, замещенного O-защитной группой) или N-защитной группой. В некоторых вариантах реализации необязательно замещенный аминоксилалкил замещен необязательно замещенным сульфоалкилом или необязательно замещенным алкенилом. В конкретных вариантах реализации R^{12a} и $R^{Vb''}$ оба представляют собой H. В конкретных вариантах реализации T^1 представляет собой O (оксо), и T^2 представляет собой S (тио) или Se (селено).

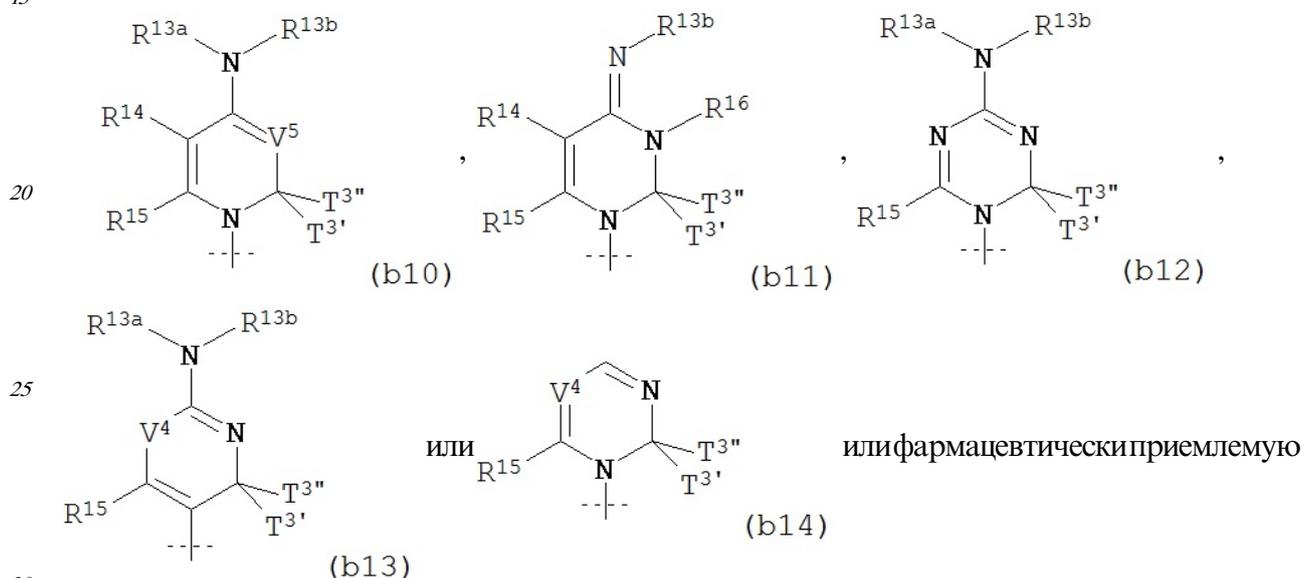
[00237] В некоторых вариантах реализации $R^{Vb'}$ представляет собой необязательно замещенный алкоксикарбонилалкил или необязательно замещенный карбамоилалкил.

[00238] В конкретных вариантах реализации необязательный заместитель для R^{12a} ,

R^{12b} , R^{12c} или R^{Va} представляет собой группу полиэтиленгликоля (например, $-(CH_2)_{s2}$ $(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или C_{1-}

20алкил); или группу amino-полиэтиленгликоля (например, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил).

[00239] В некоторых вариантах реализации В представляет собой модифицированный цитозин. В качестве примера, модифицированный цитозин включает соединения (b10)
 -(b14):



соль или стереоизомер указанных соединений, где

[00240] каждый из $T^{3'}$ и $T^{3''}$ независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси или необязательно замещенный тиаалкокси, или комбинация $T^{3'}$ и $T^{3''}$ вместе (например, как в T^3) образует O (оксо), S (тио) или Se (селено);

[00241] каждый V^4 независимо представляет собой O, S, $N(R^{Vc})_{nv}$ или $C(R^{Vc})_{nv}$, где nv равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^{Vc} независимо представляет собой H, галоген, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный алкгетероцикл или необязательно замещенный алкинилокси (например, необязательно замещенный любым заместителем, раскрытым в настоящем документе, таким как выбранные из (1)-(21), для алкила), где комбинация R_{13b} и R_{Vc} вместе может образовывать необязательно замещенный гетероцикл;

[00242] каждый V^5 независимо представляет собой $N(R^{Vd})_{nv}$ или $C(R^{Vd})_{nv}$, где nv

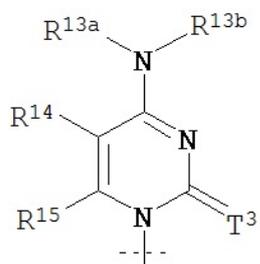
равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^{Vd} независимо представляет собой H, галоген, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный алкгетероцикл или необязательно замещенный алкинилокси (например, необязательно замещенный любым заместителем, раскрытым в настоящем документе, таким как выбранные из (1)-(21), для алкила) (например, V^5 представляет собой -CH или N);

[00243] каждый из R^{13a} и R^{13b} независимо представляет собой H, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенный ацилоксиалкил, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный алкокси, где комбинация R^{13b} и R^{14} вместе может образовывать необязательно замещенный гетероцикл;

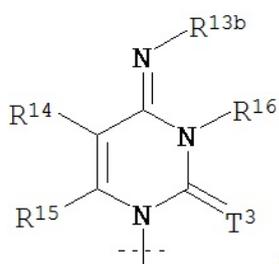
[00244] каждый R^{14} независимо представляет собой H, галоген, гидрокси, тиол, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный галогеналкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гидроксиалкил (например, замещенный O-защитной группой), необязательно замещенный гидроксиалкенил, необязательно замещенный гидроксиалкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный ацилоксиалкил, необязательно замещенный амина (например, -NHR, где R представляет собой H, алкил, арил или фосфорил), азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный алкгетероцикл, необязательно замещенный аминоалкил, необязательно замещенный аминоалкенил или необязательно замещенный аминоалкил; и

[00245] каждый из R^{15} и R^{16} независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил или необязательно замещенный алкинил.

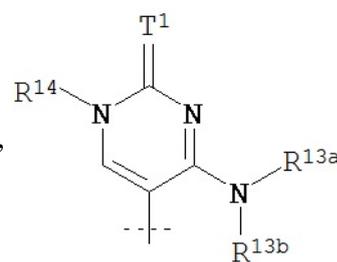
[00246] Другие примеры модифицированного цитозина включают соединения Формул (b32)-(b35):



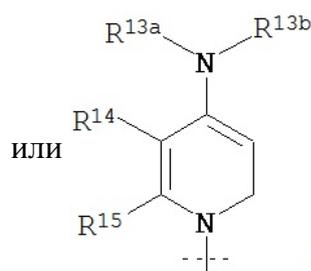
(b32)



(b33)



(b34)



(b35)

или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер

указанных соединений, где

[00247] каждый из T^1 и T^3 независимо представляет собой O (оксо), S (тио) или Se (селено);

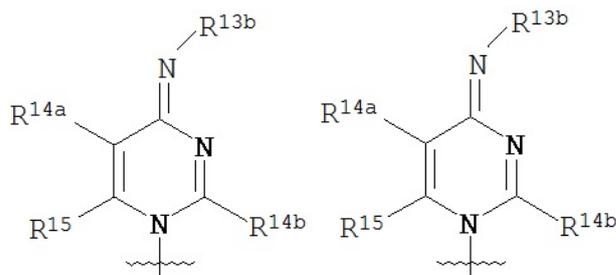
[00248] каждый из R^{13a} и R^{13b} независимо представляет собой H, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенный ацилоксиалкил, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный алкокси, где комбинация R^{13b} и R^{14} вместе может образовывать необязательно замещенный гетероцикл; и

[00249] каждый R^{14} независимо представляет собой H, галоген, гидроксильная группа, тиол, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный галогеналкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гидроксиалкил (например, замещенный O-защитной группой), необязательно замещенный гидроксиалкенил, необязательно замещенный гидроксиалкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси, необязательно замещенный ацилоксиалкил, необязательно замещенный амино (например, -NHR, где R представляет собой H, алкил, арил или фосфорил), азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный алкгетероцикл, необязательно замещенный аминоалкил (например, гидроксиалкил, алкил, алкенил или алкинил), необязательно замещенный аминоалкенил или необязательно замещенный аминоалкинил; и

[00250] каждый из R^{15} и R^{16} независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил или необязательно замещенный алкинил (например, R^{15} представляет собой H, и R^{16} представляет собой H или необязательно замещенный алкил).

[00251] В некоторых вариантах реализации R^{15} представляет собой H, и R^{16} представляет собой H или необязательно замещенный алкил. В конкретных вариантах реализации R^{14} представляет собой H, ацил или гидроксиалкил. В некоторых вариантах реализации R^{14} представляет собой галоген. В некоторых вариантах реализации R^{14} и R^{15} оба представляют собой H. В некоторых вариантах реализации R^{15} и R^{16} оба представляют собой H. В некоторых вариантах реализации каждый из R^{14} и R^{15} и R^{16} представляет собой H. В дополнительных вариантах реализации каждый из R^{13a} и R^{13b} независимо представляет собой H или необязательно замещенный алкил.

[00252] Другие неограничивающие примеры модифицированного цитозина включают соединения Формулы (b36):



(b36)

или фармацевтически приемлемую

соль или стереоизомер указанных соединений, где

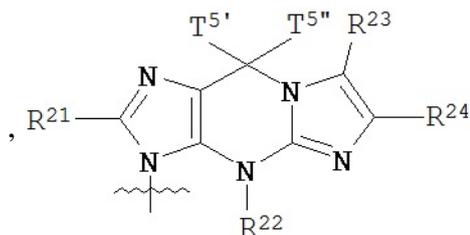
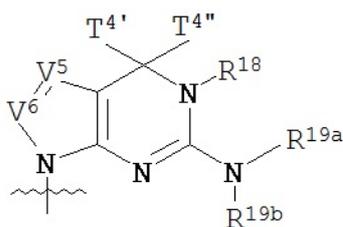
[00253] каждый R^{13b} независимо представляет собой H, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенный ацилоксиалкил, необязательно замещенный алкил
5 или необязательно замещенный алкокси, где комбинация R^{13b} и R^{14b} вместе может образовывать необязательно замещенный гетероциклический;

[00254] каждый R^{14a} и R^{14b} независимо представляет собой H, галоген, гидроксильный, тиол, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенную аминокислоту,
10 необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный галогеналкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гидроксиалкил (например, замещенный O-защитной группой), необязательно замещенный гидроксиалкенил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси, необязательно замещенный алкинилокси, необязательно замещенный аминоалкокси, необязательно замещенный алкоксиалкокси,
15 необязательно замещенный ацилоксиалкил, необязательно замещенный амино (например, -NHR, где R представляет собой H, алкил, арил, фосфорил, необязательно замещенный аминоалкил или необязательно замещенный карбоксиаминоалкил), азидо, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероциклический, необязательно замещенный алкгетероциклический, необязательно замещенный аминоалкил,
20 необязательно замещенный аминоалкенил или необязательно замещенный аминоалкинил; и

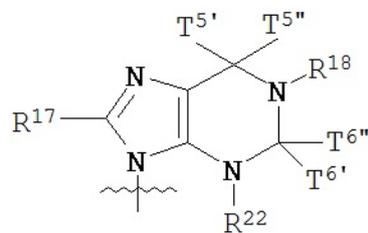
[00255] каждый из R^{15} независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил или необязательно замещенный алкинил.

[00256] В конкретных вариантах реализации R^{14b} представляет собой необязательно замещенную аминокислоту (например, необязательно замещенный лизин). В некоторых вариантах реализации R^{14a} представляет собой H.

[00257] В некоторых вариантах реализации В представляет собой модифицированный гуанин. В качестве примера, модифицированные гуанины включают соединения Формул (b15)-(b17):



или

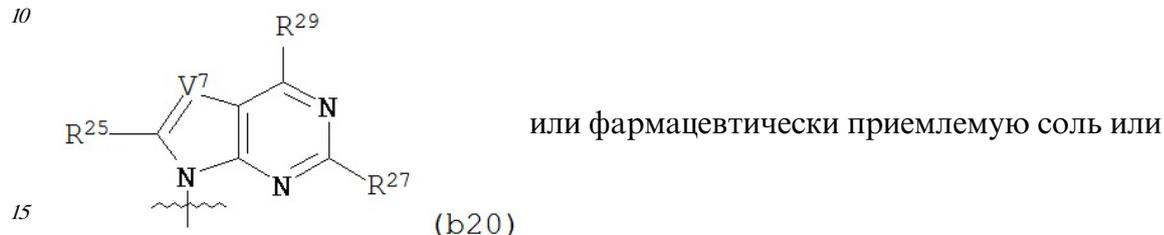
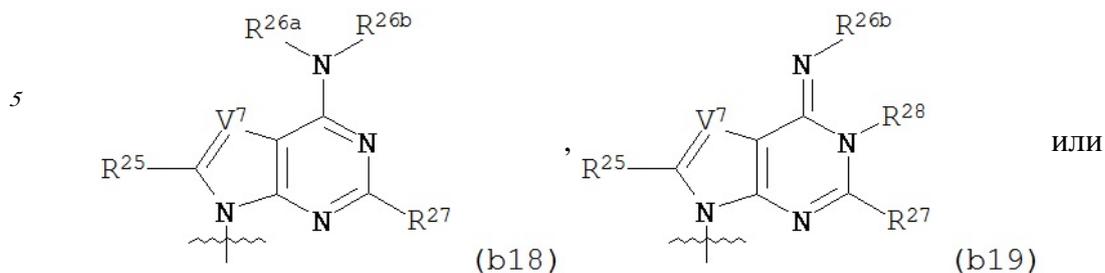


, фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер

указанных соединений, где

[00258] каждый из $T^{4'}$, $T^{4''}$, $T^{5'}$, $T^{5''}$, $T^{6'}$ и $T^{6''}$ независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный алкокси, и где комбинация $T^{4'}$ и $T^{4''}$ (например, как в $T^{4'}$) или комбинация $T^{5'}$ и $T^{5''}$ (например, как в

аденин. В качестве примера, модифицированный аденин включает соединения Формул (b18)-(b20):



стереоизомер указанных соединений, где

[00266] каждый V^7 независимо представляет собой O, S, $N(R^{Ve})_{nv}$ или $C(R^{Ve})_{nv}$, где

10 nv равно целому числу от 0 до 2, и каждый R^{Ve} независимо представляет собой H, галоген, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкенилокси или необязательно замещенный алкинилокси (например, необязательно замещенный любым заместителем, раскрытым в настоящем документе, таким как выбранные из (1)-(21), для алкила);

25 [00267] каждый R^{25} независимо представляет собой H, галоген, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный тиоалкокси или необязательно замещенный amino;

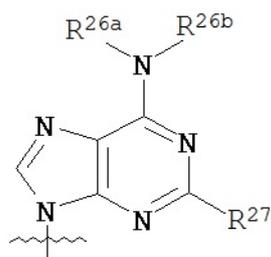
30 [00268] каждый из R^{26a} и R^{26b} независимо представляет собой H, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный карбамоилалкил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гидроксиалкил, необязательно замещенный гидроксиалкенил, необязательно замещенный гидроксиалкинил, необязательно замещенный алкокси или группу полиэтиленгликоля (например, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил); или группу amino-полиэтиленгликоля (например, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил);

45 [00269] каждый R^{27} независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный тиоалкокси или необязательно замещенный amino;

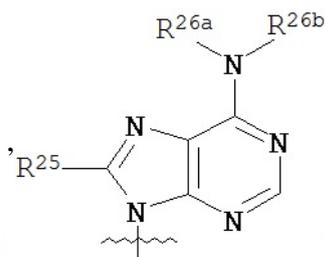
[00270] каждый R^{28} независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил или необязательно замещенный алкинил;
и

[00271] каждый R^{29} независимо представляет собой H, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный карбамоилалкил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гидроксиалкил, необязательно замещенный гидроксиалкенил, необязательно замещенный алкокси или необязательно замещенный amino.

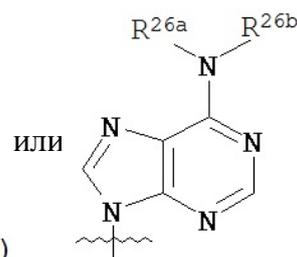
[00272] В качестве примера, модифицированный аденин включает соединения Формул (b41)-(b43):



(b41)



(b42)



(b43)

или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер указанных соединений, где

[00273] каждый R^{25} независимо представляет собой H, галоген, тиол, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный тиоалкокси или необязательно замещенный amino;

[00274] каждый из R^{26a} и R^{26b} независимо представляет собой H, необязательно замещенный ацил, необязательно замещенную аминокислоту, необязательно замещенный карбамоилалкил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гидроксиалкил, необязательно замещенный гидроксиалкенил, необязательно замещенный гидроксиалкинил, необязательно замещенный алкокси или группу полиэтиленгликоля (например, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил); или группу amino-полиэтиленгликоля

(например, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил);

и

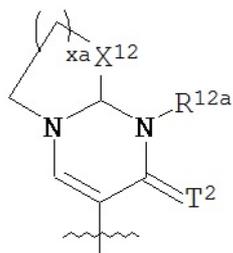
[00275] каждый R^{27} независимо представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный тиоалкокси или необязательно замещенный amino.

[00276] В некоторых вариантах реализации R^{26a} представляет собой H, и R^{26b} представляет собой необязательно замещенный алкил. В некоторых вариантах реализации каждый из R^{26a} и R^{26b} независимо представляет собой необязательно

замещенный алкил. В конкретных вариантах реализации R^{27} представляет собой
необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси или
необязательно замещенный тиоалкокси. В других вариантах реализации R^{25} представляет
5 собой необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси или
необязательно замещенный тиоалкокси.

[00277] В конкретных вариантах реализации необязательный заместитель для R^{26a} ,
 R^{26b} или R^{29} представляет собой группу полиэтиленгликоля (например, $-(CH_2)_{s2}$
10 $(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или
от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0
до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или C_{1-}
20 алкил); или группу amino-полиэтиленгликоля (например, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}$
 $(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4),
каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0
до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой
водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил).

[00278] В некоторых вариантах реализации В может быть представлен Формулой
20 (b21):

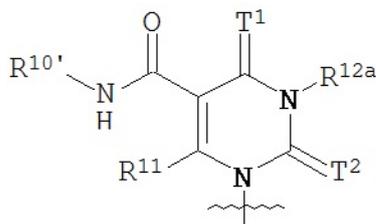


, где X^{12} независимо представляет собой O, S, необязательно

(b21)

замещенный алкилен (например, метилен) или необязательно замещенный
30 гетероалкилен, x_a равно целому числу от 0 до 3, а R^{12a} и T^2 являются такими, как
раскрыто в настоящем документе.

[00279] В некоторых вариантах реализации В может быть представлен Формулой
(b22):



, где $R^{10'}$ независимо представляет собой

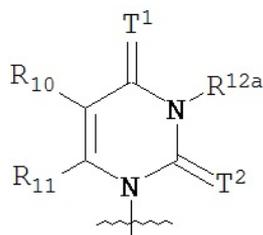
(b22)

необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно
замещенный алкинил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный
гетероцикл, необязательно замещенный аминоалкил, необязательно замещенный
аминоалкенил, необязательно замещенный аминоалкинил, необязательно замещенный
45 алкокси, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкил, необязательно замещенный
алкоксикарбонилалкенил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкинил,
необязательно замещенный алкоксикарбонилалкокси, необязательно замещенный
карбоксиялкокси, необязательно замещенный карбоксиялкил или необязательно

замещенный карбамоилалкил и R^{11} , R^{12a} , T^1 и T^2 являются такими, как раскрыто в настоящем документе.

[00280] В некоторых вариантах реализации В может быть представлен Формулой (b23):

5



, где R^{10} представляет собой необязательно замещенный

10

(b23)

гетероцикл (например, необязательно замещенный фурил, необязательно замещенный тиенил или необязательно замещенный пирролил), необязательно замещенный арил (например, необязательно замещенный фенил или необязательно замещенный нафтил)

15

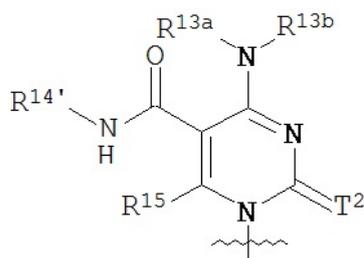
или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе (например, для R^{10}); и где R^{11} (например, H или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе), R^{12a}

(например, H или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе), T^1 (например, оксо или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе) и T^2 (например, оксо или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе) являются такими, как раскрыто в настоящем документе.

20

[00281] В некоторых вариантах реализации В может быть представлен Формулой (b24):

25



, где $R^{14'}$ независимо представляет собой

30

(b24)

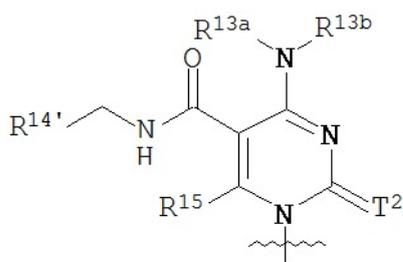
необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный алкарин, необязательно замещенный алкгетероцикл, необязательно замещенный аминокил, необязательно замещенный аминокенил, необязательно замещенный аминокинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкенил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкинил, необязательно замещенный алкоксикарбонилалкокси, необязательно замещенный карбоксиалкокси, необязательно замещенный карбоксиалкил или необязательно замещенный карбамоилалкил, и R^{13a} , R^{13b} , R^{15} и T^2 являются такими, как раскрыто в настоящем документе.

35

40

[00282] В некоторых вариантах реализации В может быть представлен Формулой (b25):

45

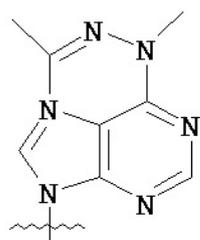


, где R^{14'} представляет собой необязательно

(b25)

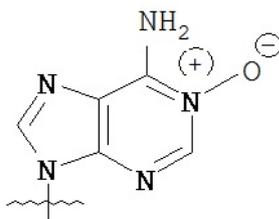
замещенный гетероцикл (например, необязательно замещенный фурил, необязательно замещенный тиенил или необязательно замещенный пирролил), необязательно замещенный арил (например, необязательно замещенный фенил или необязательно замещенный нафтил) или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе (например, для R¹⁴ или R^{14'}); и где R^{13a} (например, H или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе), R^{13b} (например, H или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе), R¹⁵ (например, H или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе) и T³ (например, оксо или любой заместитель, раскрытый в настоящем документе) являются такими, как раскрыто в настоящем документе.

[00283] В некоторых вариантах реализации В представляет собой нуклеиновое основание, выбранное из группы, состоящей из: цитозина, гуанина, аденина и урацила. В некоторых вариантах реализации В может представлять собой:



(b26)

или



(b27)

[00284] В некоторых вариантах реализации модифицированное нуклеиновое основание представляет собой модифицированный урацил. В качестве примера, нуклеиновые основания и нуклеозиды, содержащие модифицированный урацил, включают псевдоуридин (ψ), пиридин-4-он рибонуклеозид, 5-аза-уридин, 6-аза-уридин, 2-тио-5-аза-уридин, 2-тио-уридин (s^2U), 4-тио-уридин (s^4U), 4-тио-псевдоуридин, 2-тио-псевдоуридин, 5-гидрокси-уридин (ho^5U), 5-аминоаллил-уридин, 5-галоген-уридин (например, 5-йод-уридин или 5-бром-уридин), 3-метил-уридин (m^3U), 5-метокси-уридин (mo^5U), уридин 5-оксиуксусную кислоту (cmo^5U), уридин 5-оксиуксусной кислоты метиловый эфир (cmo^5U), 5-карбоксиметил-уридин (cm^5U), 1-карбоксиметил-псевдоуридин, 5-карбоксигидроксиметил-уридин (chm^5U), 5-карбоксигидроксиметил-уридина метиловый эфир ($mchm^5U$), 5-метоксикарбонилметил-уридин (mcn^5U), 5-метоксикарбонилметил-2-тио-уридин (mcm^5s^2U), 5-аминометил-2-тио-уридин (nm^5s^2U), 5-метиламинометил-уридин (mnm^5U), 5-метиламинометил-2-тио-уридин (mnm^5s^2U), 5-метиламинометил-2-селено-уридин (mnm^5se^2U), 5-карбамоилметил-уридин (ncm^5U), 5-карбоксиметиламинометил-уридин ($cmnm^5U$), 5-карбоксиметиламинометил-2-тио-уридин ($cmnm^5s^2U$), 5-пропинил-уридин, 1-пропинил-псевдоуридин, 5-тауринометил-

уридин (tm^3U), 1-тауринометил-псевдоуридин, 5-тауринометил-2-тио-уридин ($\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$), 1-тауринометил-4-тио-псевдоуридин, 5-метил-уридин (m^5U , т.е., содержащий нуклеиновое основание дезокситимин), 1-метил-псевдоуридин ($\text{m}^1\psi$), 5-метил-2-тио-уридин ($\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$),
 5 1-метил-4-тио-псевдоуридин ($\text{m}^1\text{s}^4\psi$), 4-тио-1-метил-псевдоуридин, 3-метил-псевдоуридин ($\text{m}^3\psi$), 2-тио-1-метил-псевдоуридин, 1-метил-1-дезаза-псевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-дезаза-псевдоуридин, дигидроуридин (D), дигидропсевдоуридин, 5,6-дигидроуридин, 5-метил-дигидроуридин (m^3D), 2-тио-дигидроуридин, 2-тио-дигидропсевдоуридин, 2-метокси-уридин, 2-метокси-4-тио-уридин, 4-метокси-псевдоуридин, 4-метокси-2-тио-псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин, 3-(3-амино-3-карбоксивинил)уридин (acr^3U), 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксивинил)псевдоуридин ($\text{acr}^3\psi$), 5-(изопентениламинометил)уридин (inm^5U), 5-(изопентениламинометил)-2-тио-уридин ($\text{inm}^5\text{s}^2\text{U}$), α -тио-уридин, 2'-
 15 O-метил-уридин (Um), 5,2'-O-диметил-уридин (m^5Um), 2'-O-метил-псевдоуридин (ψm), 2-тио-2'-O-метил-уридин (s^2Um), 5-метоксикарбонилметил-2'-O-метил-уридин (mcm^5Um), 5-карбамоилметил-2'-O-метил-уридин (ncm^5Um), 5-карбоксиметиламинометил-2'-O-метил-уридин (cmnm^5Um), 3,2'-O-диметил-уридин (m^3Um), 5-(изопентениламинометил)-
 20 2'-O-метил-уридин (inm^5Um), 1-тио-уридин, дезокситимидин, 2'-F-ара-уридин, 2'-F-уридин, 2'-ОН-ара-уридин, 5-(2-карбометоксивинил)уридин и 5-[3-(1-E-пропениламино)уридин.

[00285] В некоторых вариантах реализации модифицированное нуклеиновое основание представляет собой модифицированный цитозин. В качестве примера, нуклеиновые
 25 основания и нуклеозиды, содержащие модифицированный цитозин, включают 5-азацитидин, 6-аза-цитидин, псевдоизоцитидин, 3-метил-цитидин (m^3C), N4-ацетил-цитидин (ac^4C), 5-формил-цитидин (f^5C), N4-метил-цитидин (m^4C), 5-метил-цитидин (m^5C), 5-галоген-цитидин (например, 5-йод-цитидин), 5-гидроксиметил-цитидин (hm^5C), 1-метил-псевдоизоцитидин, пирроло-цитидин, пирроло-псевдоизоцитидин, 2-тио-цитидин (s^2C), 2-тио-5-метил-цитидин, 4-тио-псевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-псевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-дезаза-псевдоизоцитидин, 1-метил-1-дезаза-псевдоизоцитидин, зебуларин, 5-аза-зебуларин, 5-метил-зебуларин, 5-аза-2-тио-зебуларин, 2-тио-зебуларин, 2-метоксицитидин, 2-метокси-5-метил-цитидин, 4-метокси-псевдоизоцитидин, 4-метокси-1-метил-псевдоизоцитидин, лизидин (k_2C), α -тио-цитидин, 2'-O-метил-цитадин (Cm), 5,2'-O-
 30 диметил-цитидин (m^5Cm), N4-ацетил-2'-O-метил-цитидин (ac^4Cm), N4,2'-O-диметил-цитидин (m^4Cm), 5-формил-2'-O-метил-цитидин (f^5Cm), N4,N4,2'-O-триметил-цитидин (m^4_2Cm), 1-тио-цитидин, 2'-F-ара-цитидин, 2'-F-цитидин и 2'-ОН-ара-цитидин.

[00286] В некоторых вариантах реализации модифицированное нуклеиновое основание представляет собой модифицированный аденин. В качестве примера, нуклеиновые
 45 основания и нуклеозиды, содержащие модифицированный аденин, включают 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, 2-амино-6-галоген-пурин (например, 2-амино-6-хлор-пурин), 6-галоген-пурин (например, 6-хлор-пурин), 2-амино-6-метил-пурин, 8-азидо-аденозин, 7-дезаза-аденин, 7-дезаза-8-аза-аденин, 7-дезаза-2-аминопурин, 7-дезаза-8-аза-2-аминопурин, 7-дезаза-2,6-диаминопурин, 7-дезаза-8-аза-2,6-диаминопурин, 1-метил-аденозин

(m¹A), 2-метил-аденин (m²A), N6-метил-аденозин (m⁶A), 2-метилтио-N6-метил-аденозин (ms²m⁶A), N6-изопентенил-аденозин (i⁶A), 2-метилтио-N6-изопентенил-аденозин (ms²i⁶A), N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин (io⁶A), 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин (ms²io⁶A), N6-глицинилкарбамоил-аденозин (g⁶A), N6-треонилкарбамоил-аденозин (t⁶A), N6-метил-N6-треонилкарбамоил-аденозин (m⁶t⁶A), 2-метилтио-N6-треонилкарбамоил-аденозин (ms²g⁶A), N6,N6-диметил-аденозин (m⁶₂A), N6-гидроксинорвалилкарбамоил-аденозин (hn⁶A), 2-метилтио-N6-гидроксинорвалилкарбамоил-аденозин (ms²hn⁶A), N6-ацетил-аденозин (ac⁶A), 7-метил-аденин, 2-метилтио-аденин, 2-метокси-аденин, α-тио-аденозин, 2'-О-метил-аденозин (Am), N6,2'-О-диметил-аденозин (m⁶Am), N6,N6,2'-О-триметил-аденозин (m⁶₂Am), 1,2'-О-диметил-аденозин (m¹Am), 2'-О-рибозиладенозин (фосфат) (Ar(p)), 2-амино-N6-метил-пурин, 1-тио-аденозин, 8-азидо-аденозин, 2'-F-ара-аденозин, 2'-F-аденозин, 2'-ОН-ара-аденозин и N6-(19-амино-пентаоксанадецил)-аденозин.

[00287] В некоторых вариантах реализации модифицированное нуклеиновое основание представляет собой модифицированный гуанин. В качестве примера, нуклеиновые основания и нуклеозиды, содержащие модифицированный гуанин, включают инозин (I), 1-метил-инозин (m¹I), виозин (imG), метилвиозин (mimG), 4-дезметил-виозин (imG-14) изовиозин (imG2), вибутозин (yW), пероксивибутозин (o₂yW), гидроксивибутозин (OHyW), немодифицированный гидроксивибутозин (OHyW*), 7-дезаза-гуанозин, квеуозин (Q), эпоксиквеуозин (oQ), галактозил-квеуозин (galQ), маннозил-квеуозин (manQ), 7-циано-7-дезаза-гуанозин (preQ₀), 7-аминометил-7-дезаза-гуанозин (preQ₁), археозин (G⁺), 7-дезаза-8-аза-гуанозин, 6-тио-гуанозин, 6-тио-7-дезаза-гуанозин, 6-тио-7-дезаза-8-аза-гуанозин, 7-метил-гуанозин (m⁷G), 6-тио-7-метил-гуанозин, 7-метил-инозин, 6-метокси-гуанозин, 1-метил-гуанозин (m¹G), N2-метил-гуанозин (m²G), N2,N2-диметил-гуанозин (m²₂G), N2,7-диметил-гуанозин (m^{2,7}G), N2,N2,7-диметил-гуанозин (m^{2,2,7}G), 8-оксо-гуанозин, 7-метил-8-оксо-гуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N2-метил-6-тио-гуанозин, N2,N2-диметил-6-тио-гуанозин, α-тио-гуанозин, 2'-О-метил-гуанозин (Gm), N2-метил-2'-О-метил-гуанозин (m²Gm), N2,N2-диметил-2'-О-метил-гуанозин (m²₂Gm), 1-метил-2'-О-метил-гуанозин (m¹Gm), N2,7-диметил-2'-О-метил-гуанозин (m^{2,7}Gm), 2'-О-метил-инозин (Im), 1,2'-О-диметил-инозин (m¹Im), 2'-О-рибозилгуанозин (фосфат) (Gr(p)), 1-тио-гуанозин, Об-метил-гуанозин, 2'-F-ара-гуанозин и 2'-F-гуанозин.

[00288] Нуклеиновое основание в составе нуклеотида может быть независимо выбрано из пуринового, пиримидинового аналога пурина или пиримидина. Например, каждое из нуклеиновых оснований может быть независимо выбрано из аденина, цитозина, гуанина, урацила или гипоксантина. В другом варианте реализации нуклеиновое основание также может включать, например, природные и синтетические производные основания, в том числе, пиразоло[3,4-d]пиримидины, 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметил цитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-пропинил урацил и цитозин, 6-азо урацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген

(например, 8-бром), 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, конкретно 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, дезазагуанин, 7-дезазагуанин, 3-дезазагуанин, дезазааденин, 7-дезазааденин, 3-дезазааденин, пирозоло[3,4-d]пиримидин, имидазо[1,5-a]1,3,5 триазины, 9-дезазапурины, имидазо[4,5-d]пиразины, тиазоло[4,5-d]пиримидины, пиразин-2-оны, 1,2,4-триазин, пиридазин; и 1,3,5-триазин. Если нуклеотиды изображены с использованием сокращения А, G, C, T или U, каждая буква обозначает характерное основание и/или его производные, например, А включает аденин или аналоги аденина, например, 7-дезаза аденин).

Модификации межнуклеозидной связи

[00289] Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, которые могут быть введены в молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, могут содержать модифицированную межнуклеозидную связь (например, фосфатный скелет). Фосфатные группы скелета могут быть модифицированы заменой одного или более атомов кислорода различными заместителями. Кроме того, в модифицированных нуклеозидах и нуклеотидах все немодифицированные фосфатные группы могут быть заменены модифицированным фосфатом, как раскрыто в настоящем документе. Примеры модифицированных фосфатных групп включают, без ограничений, фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные эфиры, фосфонаты водорода, фосфорамидаты, фосфородиамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. В фосфородитиоатах оба атома кислорода, не образующие связи, заменены атомами серы. Фосфатный линкер также может быть модифицирован посредством замены атома кислорода, образующего связь, атомом азота (мостиковые фосфорамидаты), серы (мостиковые фосфоротиоаты) и углерода (мостиковые метилен-фосфонаты).

[00290] Раскрыт α -тиозамещенный фосфатный фрагмент для обеспечения стабильности полимеров РНК и ДНК посредством неприродных фосфоротиоатных связей в скелете. Фосфоротиоатным ДНК и РНК присуща устойчивость к действию нуклеаз и, следовательно, более длинный период полувыведения из клеточной среды. Ожидается, молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК, содержащие фосфоротиоатные связи, также будут уменьшать природный иммунный ответ посредством более слабого связывания/активации иммунных молекул природных клеток.

[00291] В конкретных вариантах реализации модифицированный нуклеозид включает альфа-тио-нуклеозид (например, 5'-О-(1-тиофосфат)-аденозин, 5'-О-(1-тиофосфат)-цитидин (α -тио-цитидин), 5'-О-(1-тиофосфат)-гуанозин, 5'-О-(1-тиофосфат)-уридин или 5'-О-(1-тиофосфат)-псевдоуридин).

Комбинации модифицированных сахаров, нуклеиновых оснований и межнуклеозидных связей

[00292] Модифицированные нуклеиновые кислоты и мРНК по изобретению могут содержать комбинацию изменений сахара, нуклеинового основания и/или межнуклеозидной связи. Указанные комбинации могут включать любую одну или более модификаций, раскрытых в настоящем документе. В качестве примера, любой из нуклеотидов, раскрытых в Формулах (Ia), (Ia-1)-(Ia-3), (Ib)-(If), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVf) и (IXa)-(IXg) настоящего документа, может быть объединен с любым из нуклеиновых оснований, раскрытых в настоящем документе (например, в Формулах (b1)-(b43) или любой другой, раскрытой в настоящем документе).

Синтез молекул модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК

[00293] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК для применения в соответствии с изобретением могут быть получены в соответствии с любой пригодной методикой, как раскрыто в настоящем документе. Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, используемые в синтезе молекул модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК, раскрытых в настоящем документе, могут быть получены из легко доступных исходных материалов с применением следующих общих способов и методик. В случаях, где приведены типичные или предпочтительные условия процесса (например, значения температуры реакции, длительности, молярные соотношения реагентов, растворители, давление, и т.д.), квалифицированный специалист сможет оптимизировать и разработать дополнительные условия способа. Оптимальные условия реакции могут варьировать для используемых конкретных реагентов или растворителя, и такие условия могут быть определены специалистом в данной области с помощью шаблонных методик оптимизации.

[00294] Протекание способов, раскрытых в настоящем документе, можно контролировать в соответствии с любым пригодным методом, известным из уровня техники. Например, образование продукта можно контролировать спектроскопическими средствами, такими как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ^1H или ^{13}C), ИК-спектроскопия, спектрофотометрия (например, в УФ-видимой области) или масс-спектрометрия, или хроматография, например, высокоэффективная жидкостная хроматографии (ВЭЖХ) или тонкослойная хроматография.

[00295] Получение молекул модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК по данному изобретению может включать введение и удаление защитных группы для различных химических групп. Необходимость во введении и удалении защитных групп, а также выбор пригодных защитных групп могут быть легко определены специалистом в данной области. Химия защитных групп описана, например, в Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991, которая включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00296] Реакции в способах, раскрытых в настоящем документе, могут быть проведены в подходящих растворителях, которые могут быть легко выбраны специалистом в области органического синтеза. Пригодными растворителями могут быть в значительной степени не реагирующие с исходными материалами (реагентами), промежуточными соединениями или продуктами при температурах, при которых проходят реакции, т.е., температурах, которые могут варьировать от температуры замерзания растворителя до температуры кипения растворителя. Конкретная реакция может быть проведена в одном растворителе или смеси более чем одного растворителя. В зависимости от конкретной стадии реакции, могут быть выбраны пригодные растворители для конкретной стадии реакции.

[00297] Разделение рацемических смесей модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов может быть осуществлено любым из многочисленных способов, известных из уровня техники. Пример способа включает фракционную перекристаллизацию с применением "хиральной разделяющей кислоты", которая представляет собой оптически активную, солеобразующую органическую кислоту. Пригодные разделяющие агенты для способов фракционной перекристаллизации представляют собой, например, оптически активные кислоты, такие как D- и L-формы винной кислоты, диацетилвинной кислоты, дибензоилвинной кислоты, манделовой кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты или различных оптически активных сульфокамфорных кислот. Кроме того, разделение рацемических смесей может быть осуществлено элюацией на колонке, заполненной оптически активным разделяющим агентом {например,

динитробензоилфенилглицином). Пригодные композиции растворителей для элюации могут быть определены специалистом в данной области.

[00298] Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды (например, молекулы строительных блоков) могут быть получены в соответствии с методами синтеза, раскрытыми в Ogata et al., J. Org. Chem. 74:2585-2588 (2009); Purmal et al., Nucl. Acids Res. 22(1): 72-78, (1994); Fukuhara et al., Biochemistry, 1(4): 563-568 (1962); и Xu et al., Tetrahedron, 48(9):1729-1740 (1992), каждая из которых включена в полном объеме посредством ссылки.

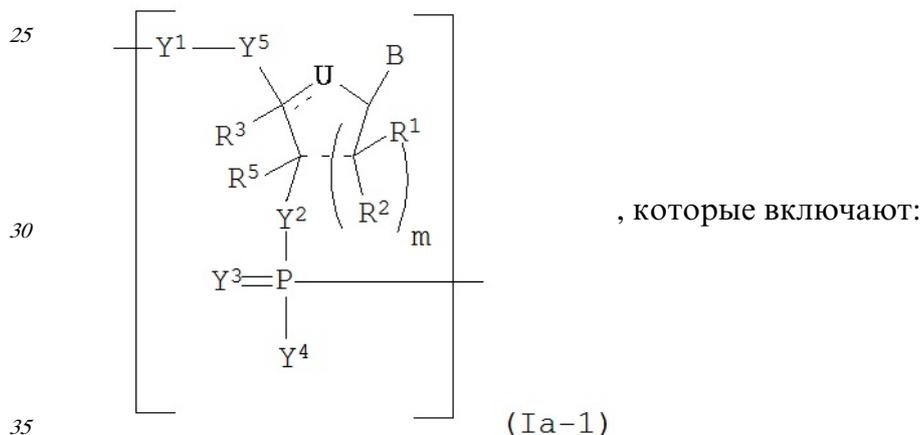
[00299] Модифицированная нуклеиновая кислота и мРНК по изобретению не обязательно должны быть однородно модифицированы по всей длине молекулы. Например, один или более или все типы нуклеотидов (например, пуриновые или пиримидиновые или любой один или более или все из А, G, U, C) могут быть или не быть однородно модифицированы в полинуклеотиде по изобретению или в указанном предварительно определенном участке его последовательности. В некоторых вариантах реализации модифицированы все нуклеотиды X в полинуклеотиде по изобретению (или в указанном участке его последовательности), причем X может представлять собой любой из нуклеотидов А, G, U, C или любую из комбинаций А+G, А+U, А+С, G+U, G+С, U+С, А+G+U, А+G+С, G+U+С или А+G+С.

[00300] Различные модификации Сахаров, модификации нуклеотидов и/или межнуклеозидных связей (например, в структурах скелета) могут присутствовать в различных положениях модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК. Среднему специалисту в данной области будет понятно, что аналоги нуклеотидов или другая модификация(и) могут находиться в любом положении(ях) модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, таким образом, что функция модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК по существу не снижается. Кроме того, модификация может представлять собой 5'- или 3'-концевую модификацию. Модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК может содержать от приблизительно 1% до приблизительно 100% модифицированных нуклеотидов, или любой процент в указанном интервале (например, от 1% до 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от 1% до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%., от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 100% и от 95% до 100%).

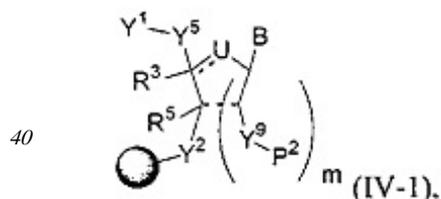
[00301] В некоторых вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК содержит модифицированный пиримидин (например, модифицированный урацил/уридин или модифицированный цитозин/цитидин). В некоторых вариантах реализации урацил или уридин в молекуле модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК может быть заменен от приблизительно 1% до приблизительно 100% модифицированного урацила или модифицированного уридина (например, от 1% до 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от 1% до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%., от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%,

от 70% до 100%, от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 100%. и от 95% до 100% модифицированного урацила или модифицированного уридина). Модифицированный урацил или уридин может быть заменен соединением с единственной уникальной структурой или множеством соединений различной структуры (например, 2, 3, 4 или более уникальных структур, как раскрыто в настоящем документе).
 В некоторых вариантах реализации цитозин или цитидин в молекуле модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК может быть заменен от приблизительно 1% до приблизительно 100% модифицированного цитозина или модифицированного цитидина (например, от 1% до 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от 1% до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%, от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 100% и от 95% до 100%) модифицированного цитозина или модифицированного цитидина). Модифицированный цитозин или цитидин могут быть заменены соединением с единственной уникальной структурой или множеством соединений различной структуры (например, 2, 3, 4 или более уникальных структур, как раскрыто в настоящем документе).

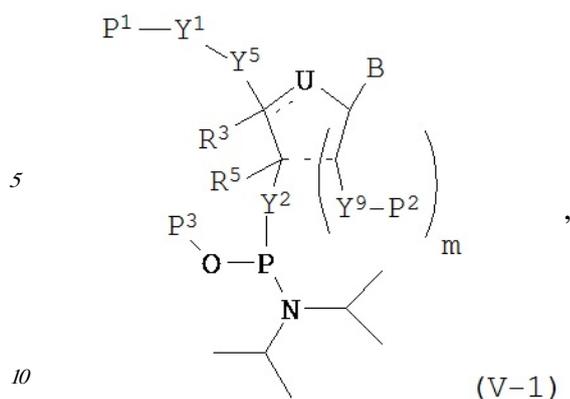
[00302] В некоторых вариантах реализации настоящий документ раскрывает способы синтеза модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, в том числе, в связанных нуклеозидов Формулы (Ia-1):



[00303] а) реакцию нуклеотида Формулы (IV-1):



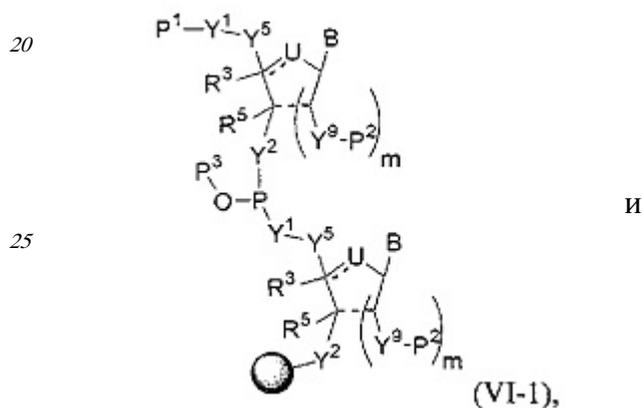
[00304] с фосфорамидитным соединением Формулы (V-1):



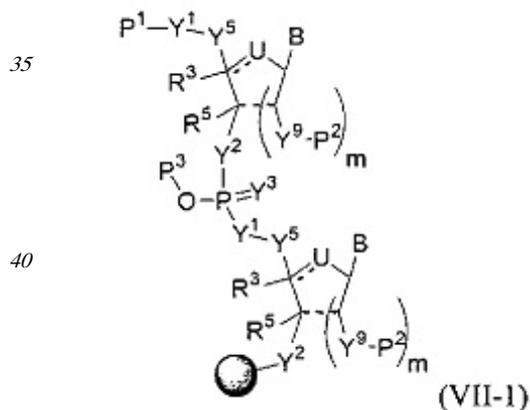
[00305] где Y^9 представляет собой Н, гидроксигруппу, фосфорил, пирофосфат, сульфат, амино, тиол, необязательно замещенную аминокислоту или пептид (например, содержащий от 2 до 12 аминокислот); каждый P^1 , P^2 и P^3 независимо представляет собой пригодную защитную группу; и \odot обозначает твердую подложку;

15

[00306] с получением модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК Формулы (VI-1):



[00307] б) окисление или сульфуризацию модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК Формулы (V) с получением модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК Формулы (VII-1):



[00308] в) удаление защитных групп с получением модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК Формулы (Ia).

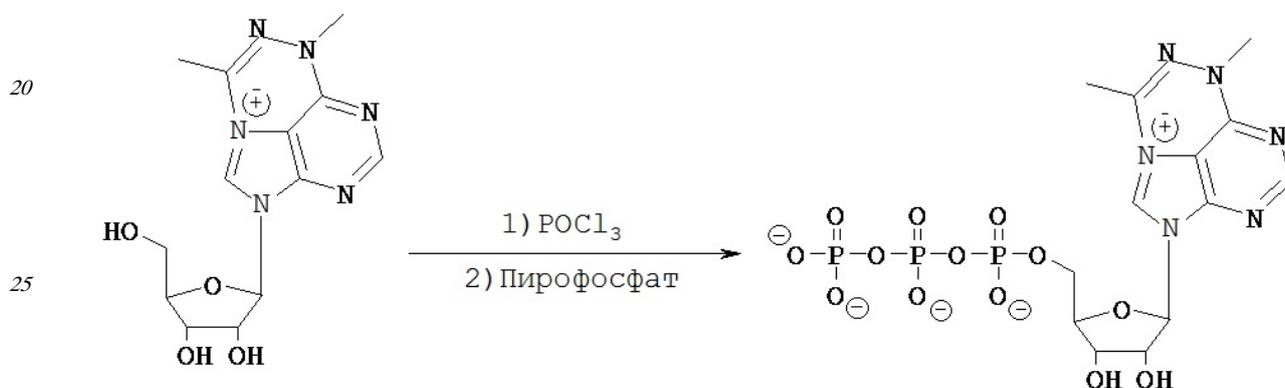
[00309] В некоторых вариантах реализации стадии а) и б) повторяют от 1 до приблизительно 10000 раз. В некоторых вариантах реализации способы дополнительно

включают нуклеотид (например, молекулу строительного блока), выбранный из группы, состоящей из: аденозина, цитозина, гуанозина и урацила. В некоторых вариантах реализации нуклеиновое основание может быть пиримидиновым основанием или его производным. В некоторых вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК является способной к трансляции.

[00310] Другие компоненты модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК необязательны, но являются предпочтительными в некоторых вариантах реализации. Например, раскрыт 5'-нетранслируемый участок (НТУ) и/или 3'НТУ, причем один из них или оба могут независимо содержать одну или более различных модификаций нуклеозидов. В таких вариантах реализации модификации нуклеозидов также могут присутствовать в транскрибируемом участке. Кроме того, раскрыты модифицированные нуклеиновые кислоты и мРНК, содержащие последовательность Козака.

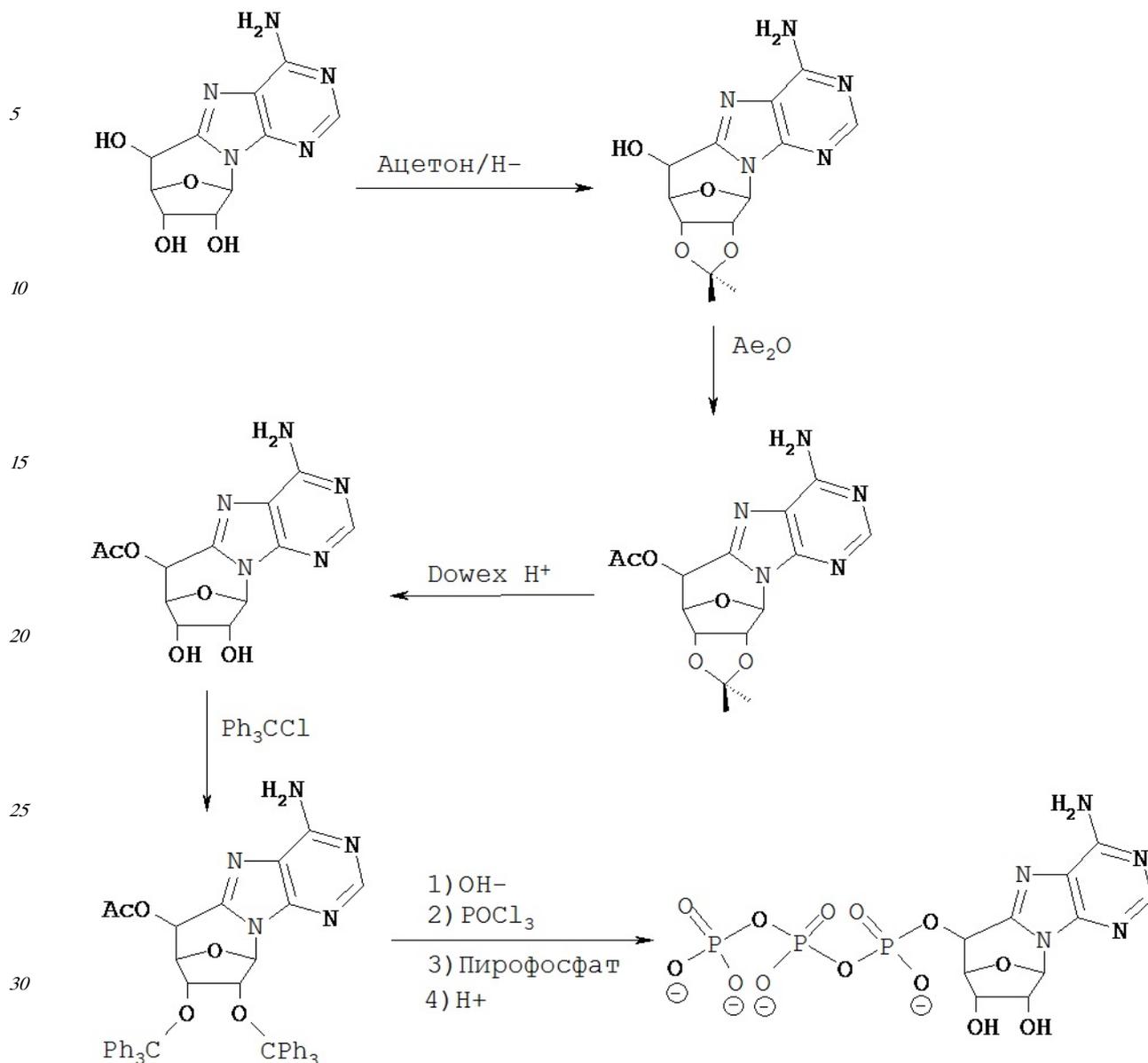
[00311] В качестве примера, синтез модифицированных нуклеотидов, которые содержатся в модифицированной нуклеиновой кислоте или мРНК, например, РНК или мРНК, раскрыт на Схемах 1-11 ниже. На Схеме 1 раскрыт общий способ фосфорилирования нуклеозидов, включая модифицированные нуклеозиды.

Схема 1



[00312] Различные защитные группы могут использоваться для контроля реакции. Например, на Схеме 2 раскрыто применение нескольких стадий введения и удаления защитных групп, чтобы способствовать фосфорилированию в положении 5' сахара, скорее чем гидроксильных групп в положениях 2' и 3'.

Схема 2

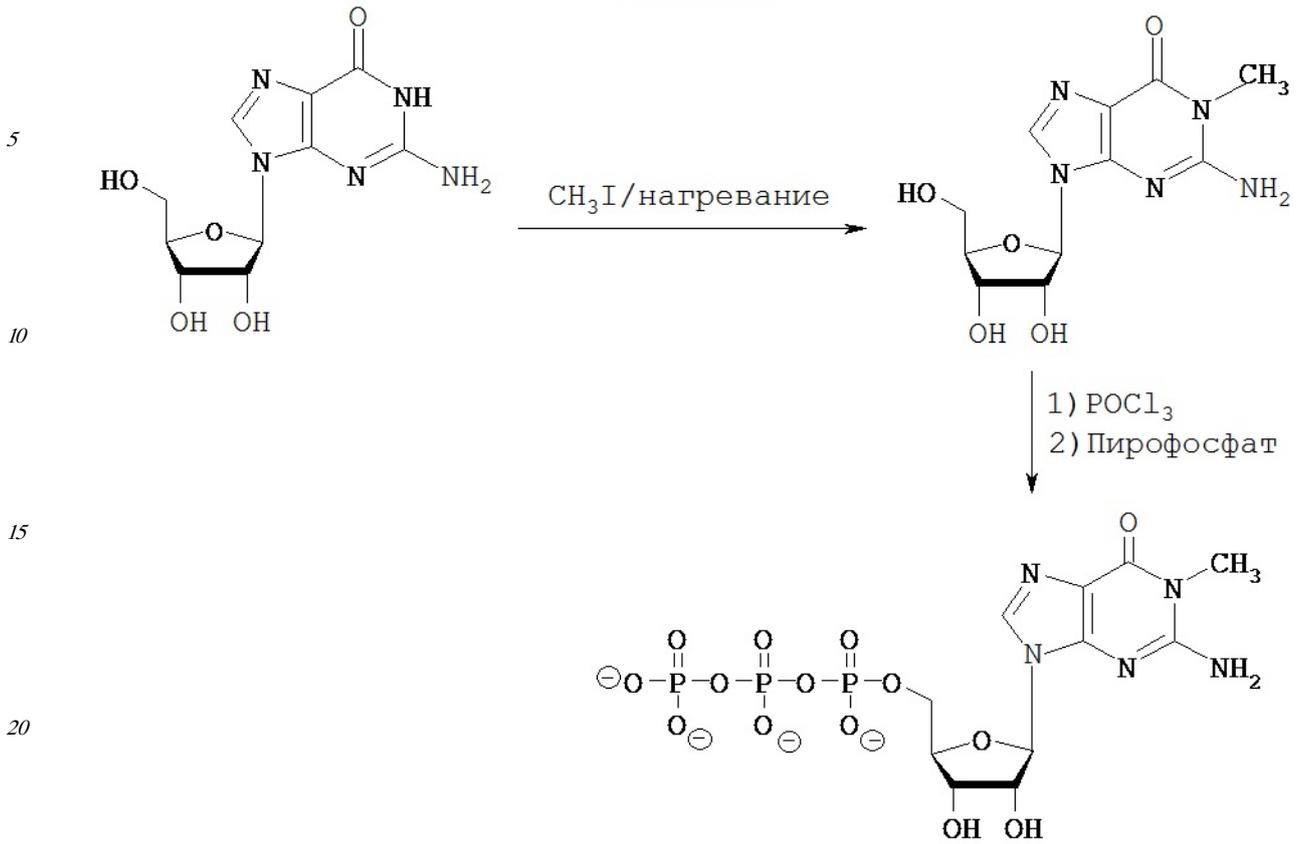


[00313] Модифицированные нуклеотиды могут быть синтезированы любым пригодным способом. На Схемах 3, 4 и 7 раскрыты примеры способов синтеза модифицированных нуклеотидов, содержащих модифицированное пуриновое нуклеиновое основание; и на Схемах 5 и 6 раскрыты примеры способов синтеза модифицированных нуклеотидов, содержащих модифицированный псевдоуридин или псевдоизоцитидин, соответственно.

40

45

Схема 3



25

Схема 4

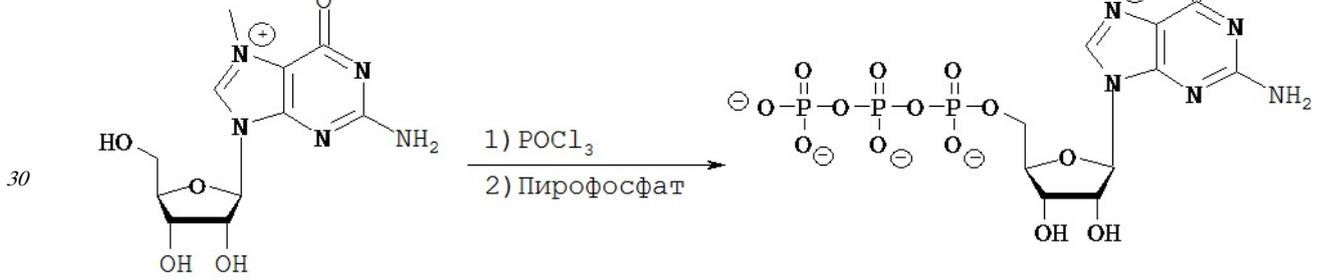


Схема 5

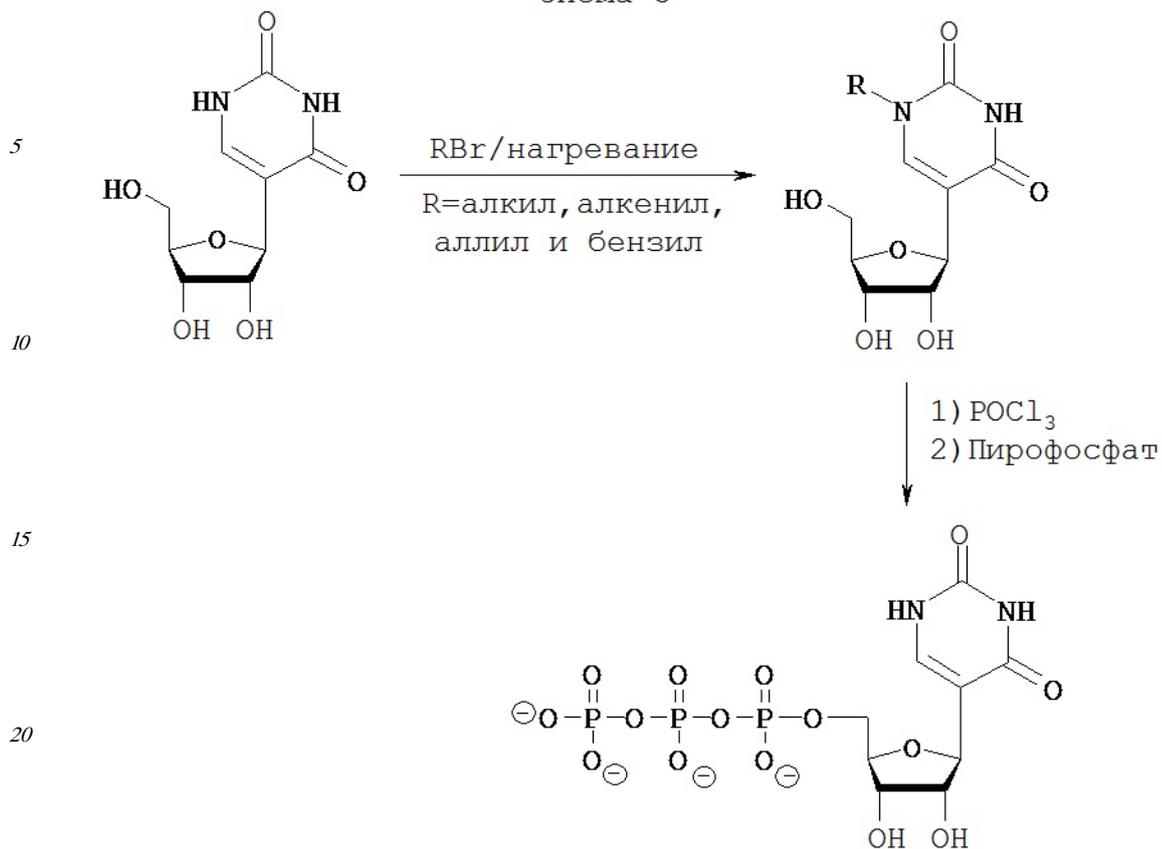


Схема 6

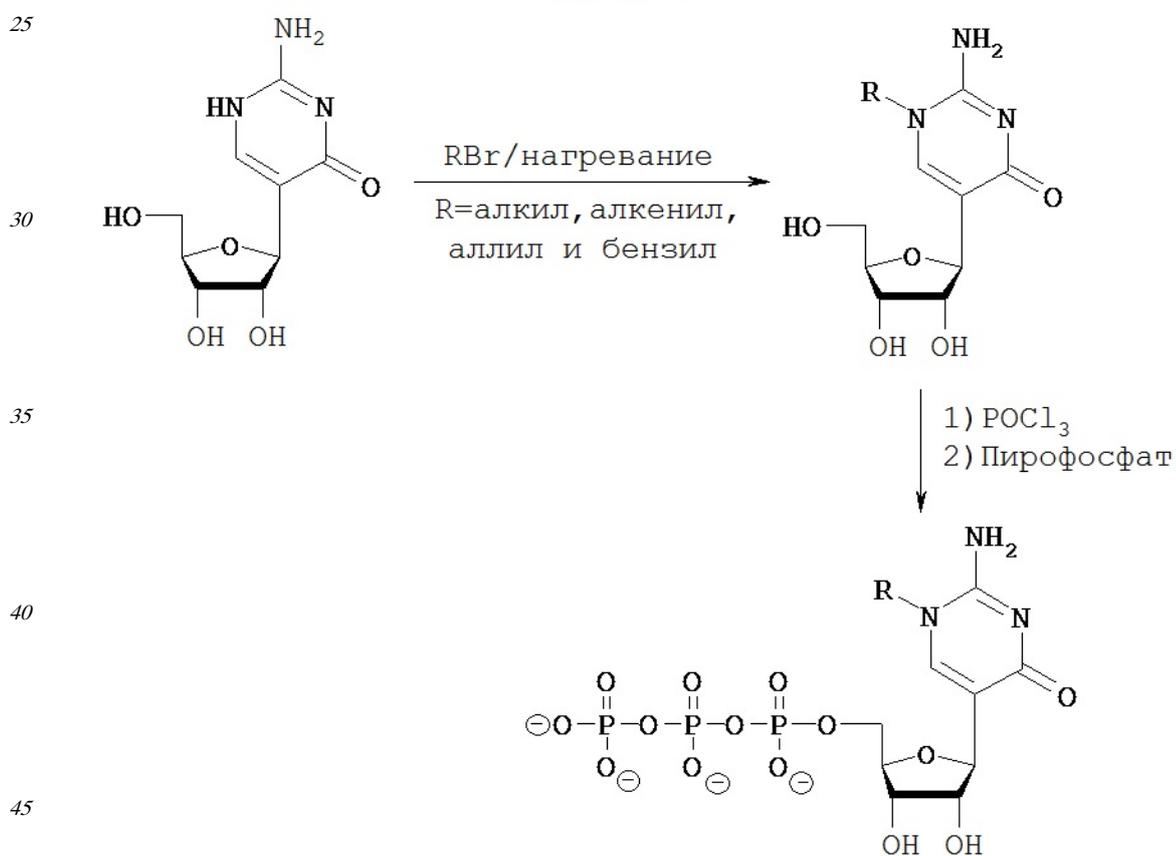
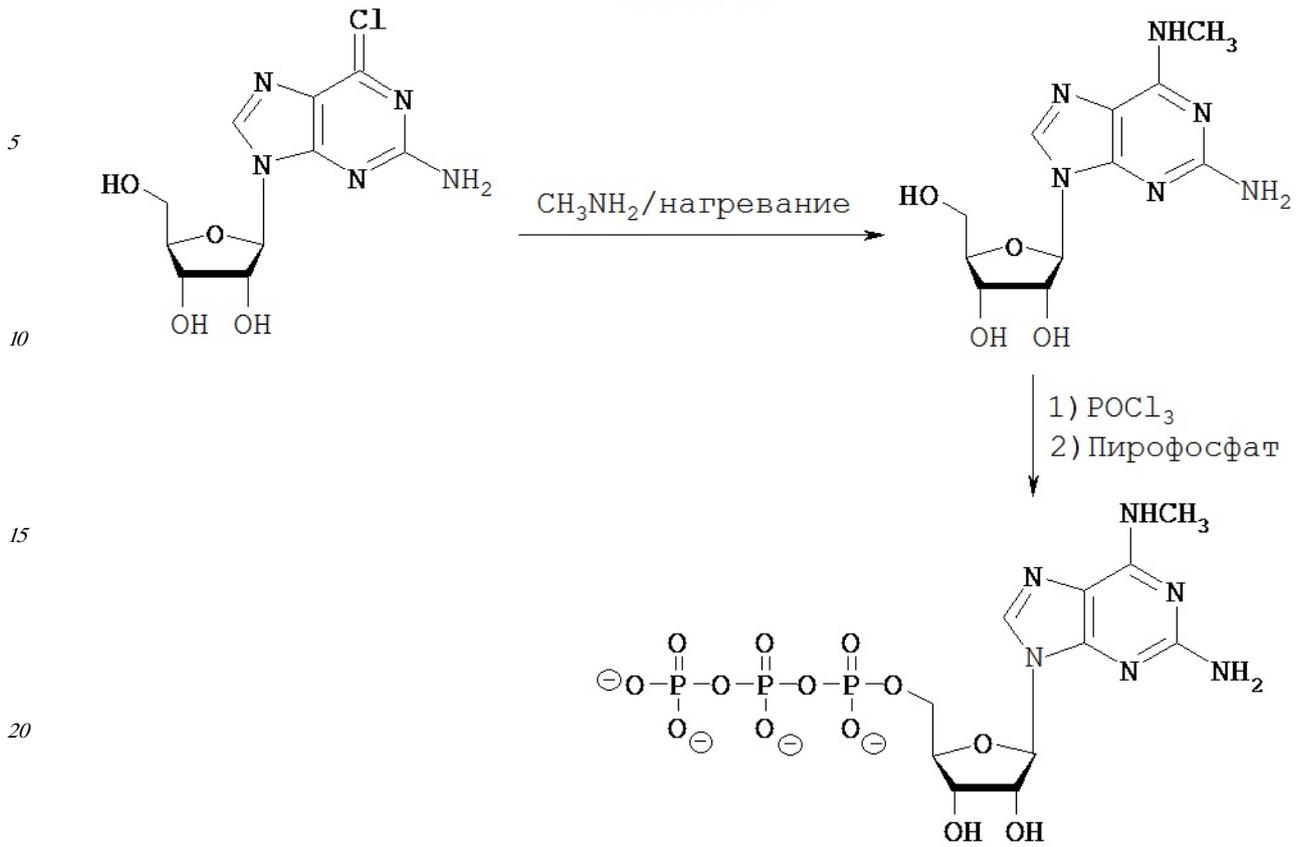


Схема 7



[00314] На Схемах 8 и 9 раскрыт пример синтеза модифицированных нуклеотидов.

25 На Схеме 10 раскрыт неограничивающий биокаталитический способ получения нуклеотидов.

30

35

40

45

Схема 8

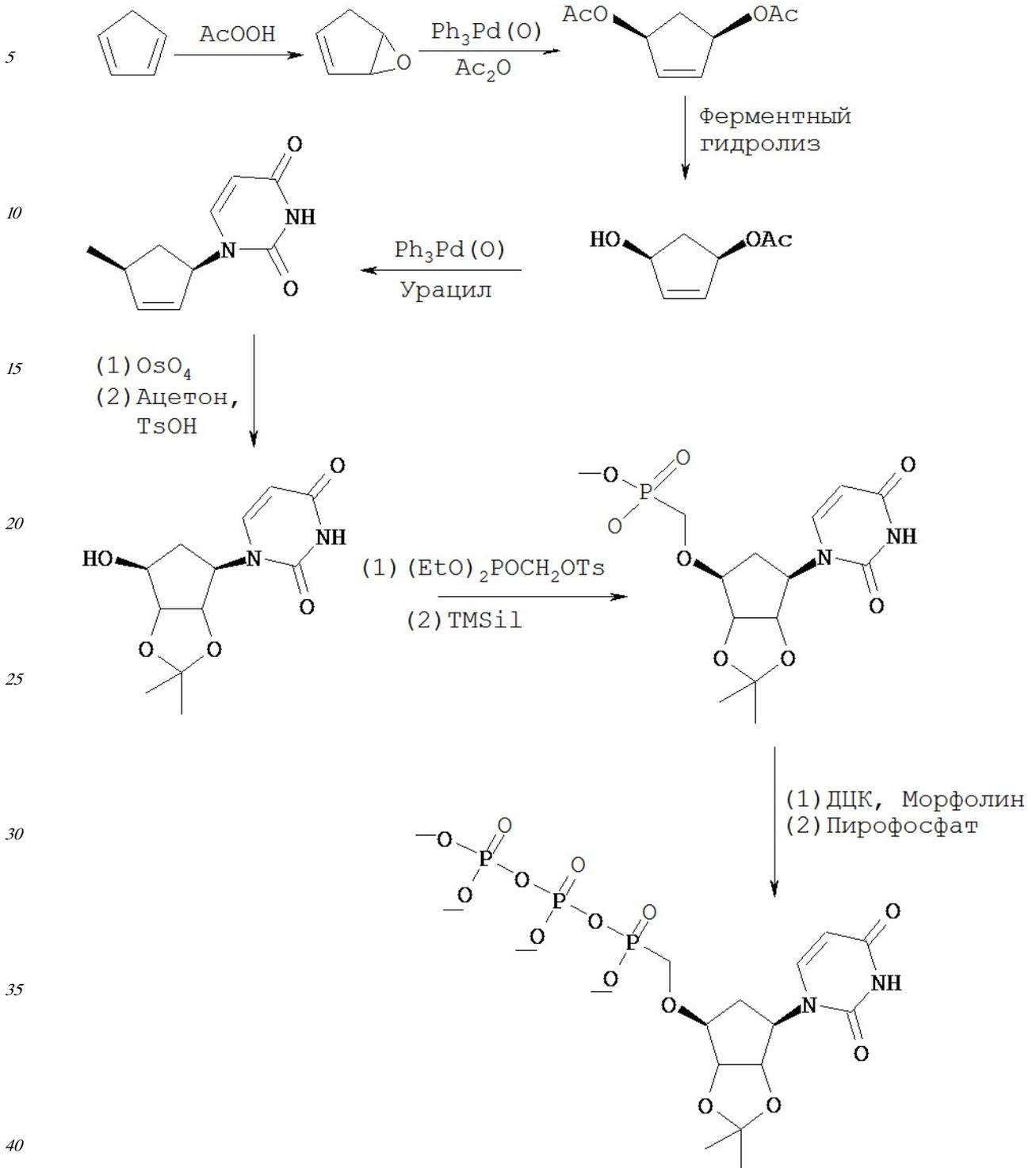


Схема 9

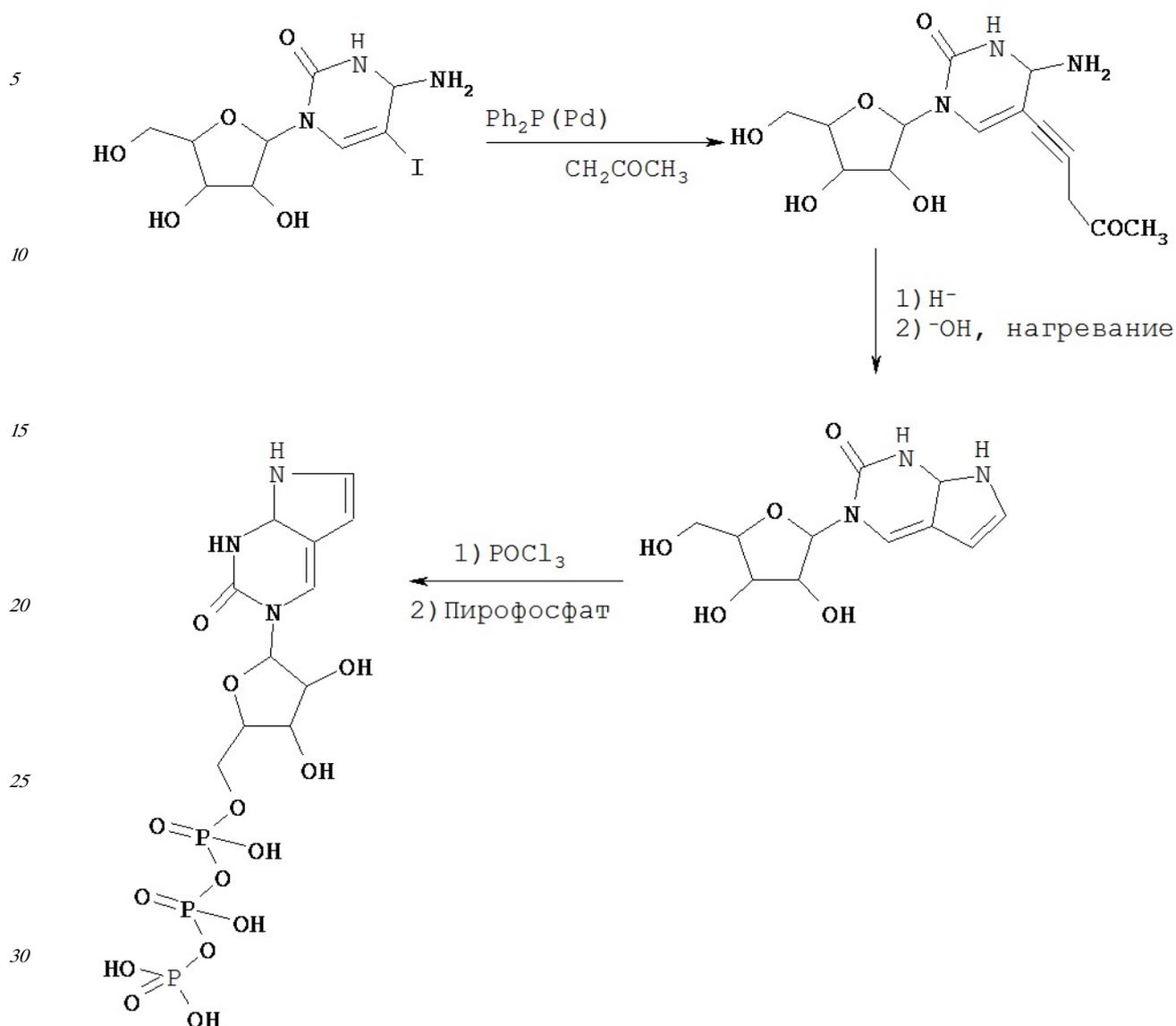
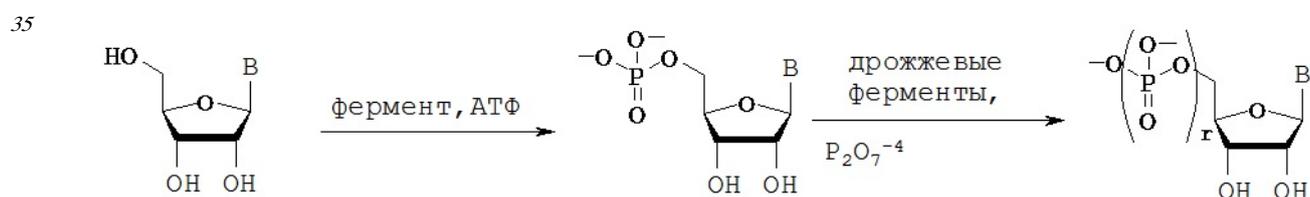


Схема 10

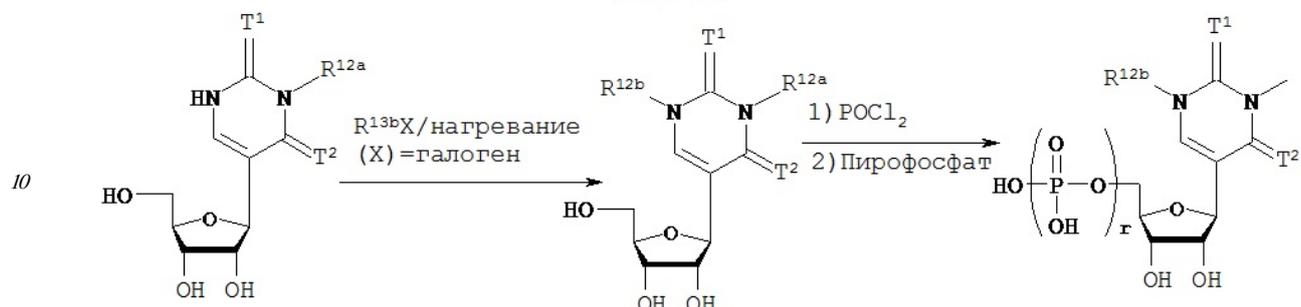


[00315] На Схеме 11 раскрыт пример синтеза модифицированного урацила, в котором положение N1 модифицировано R^{12b} , как раскрыто где-либо в другом месте, и положение 5' рибозы фосфорилировано. T^1 , T^2 , R^{12a} , R^{12b} и r являются такими, как раскрыто в настоящем документе. Раскрытый способ синтеза, а также его оптимизированные версии могут применяться для модификации других пиримидиновых нуклеиновых оснований и пуриновых нуклеиновых оснований (см., например, Формулы (b1)-(b43)) и/или для введения одной или более фосфатных групп (например, в положение 5' сахара). Кроме того, указанная реакция алкилирования может применяться для введения одной

или более необязательно замещенных алкильных групп в любую реакционноспособную группу (например, аминогруппу) любого нуклеинового основания, раскрытую в настоящем документе (например, аминогруппы в уотсон-криковском спаривании оснований для цитозина, урацила, аденина и гуанина).

5

Схема 11



Комбинации нуклеотидов в мРНК

15 [00316] Дополнительные примеры модифицированных нуклеотидов и комбинаций модифицированных нуклеотидов раскрыты в Табл. 2 ниже. Указанные комбинации модифицированных нуклеотидов могут применяться для получения модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК по изобретению. Если не указано иное, модифицированные нуклеотиды могут полностью заменять природные нуклеотиды в

20 модифицированных нуклеиновых кислотах или мРНК по изобретению. В качестве неограничивающего примера, природный нуклеотид уридин может быть заменен модифицированным нуклеозидом, раскрытым в настоящем документе. В другом неограничивающем примере природный нуклеотид уридин может быть частично

25 заменен (например, приблизительно 0,1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99,9%) по меньшей мере одним из модифицированных нуклеозидов, раскрытых в настоящем документе.

Таблица 2

Модифицированный нуклеотид	Комбинация модифицированных нуклеотидов
α-Тио-цитидин	α-Тио-цитидин/5-йод-уридин
	α-Тио-цитидин/N1-метил-псевдо-уридин
	α-Тио-цитидин/α-тио-уридин
	α-Тио-цитидин/5-метил-уридин
	α-Тио-цитидин/псевдо-уридин
	Приблизительно 50% цитозина представляет собой α-тио-цитидин
Псевдоизоцитидин	Псевдоизоцитидин/5-йод-уридин
	Псевдоизоцитидин/N1-метил-псевдоуридин
	Псевдоизоцитидин/α-тио-уридин
	Псевдоизоцитидин/5-метил-уридин
	Псевдоизоцитидин/псевдоуридин
	Приблизительно 25% цитозина представляет собой псевдоизоцитидин
Пирроло-цитидин	Псевдоизоцитидин/приблизительно 50% уридина представляет собой N1-метил-псевдоуридин, и приблизительно 50% уридина представляет собой псевдоуридин
	Псевдоизоцитидин/приблизительно 25% уридина представляет собой N1-метил-псевдо уридин, и приблизительно 25% уридина представляет собой псевдоуридин
	Пирроло-цитидин/5-йод-уридин
	Пирроло-цитидин/N1-метил-псевдоуридин
	Пирроло-цитидин/α-тио-уридин
	Пирроло-цитидин/5-метил-уридин
Пирроло-цитидин/псевдоуридин	
Приблизительно 50% цитозина представляет собой пирроло-цитидин	
5-Метил-цитидин	5-Метил-цитидин/5-йод-уридин

40

45

5		5-Метил-цитидин/N1-метил-псевдоурин
		5-Метил-цитидин/ α -тио-урин
		5-Метил-цитидин/5-метил-урин
		5-Метил-цитидин/псевдоурин
		Приблизительно 25% цитозина представляет собой 5-метил-цитидин
		Приблизительно 50% цитозина представляет собой 5-метил-цитидин
		5-Метил-цитидин/5-метокси-урин
		5-Метил-цитидин/5-бром-урин
		5-Метил-цитидин/2-тио-урин
		5-Метил-цитидин/приблизительно 50% уридина представляет собой 2-тио-урин
10		Приблизительно 50% уридина представляет собой 5-метил-цитидин/приблизительно 50% уридина представляет собой 2-тио-урин
15	N4-Ацетил-цитидин	N4-Ацетил-цитидин/5-йод-урин
		N4-Ацетил-цитидин/N1-метил-псевдоурин
		N4-Ацетил-цитидин/ α -тио-урин
		N4-Ацетил-цитидин/5-метил-урин
		N4-Ацетил-цитидин/псевдоурин
		Приблизительно 50% цитозина представляет собой N4-ацетил-цитидин
		Приблизительно 25% цитозина представляет собой N4-ацетил-цитидин
		N4-Ацетил-цитидин/5-метокси-урин
		N4-Ацетил-цитидин/5-бром-урин
		N-Ацетил-цитидин/2-тио-урин
20		Приблизительно 50% цитозина представляет собой N4-ацетил-цитидин/приблизительно 50% уридина представляет собой 2-тио-урин

[00317] Дополнительные примеры комбинаций модифицированных нуклеотидов раскрыты в Табл. 3 ниже. Указанные комбинации модифицированных нуклеотидов могут применяться для получения молекул модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК по изобретению.

25

Таблица 3	
Модифицированный нуклеотид	Комбинация модифицированных нуклеотидов
30	Модифицированный цитидин, содержащий (b 10)/псевдоурин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b10)/N1-метил-псевдоурин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b10)/5-метокси-урин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b10)/5-метил-урин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b10)/5-бром-урин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b10)/2-тио-урин
	Приблизительно 50% цитидина заменено модифицированным цитидином (b10)/приблизительно 50% уридина представляет собой 2-тио-урин
35	Модифицированный цитидин, содержащий (b32)/псевдоурин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b32)/N1-метил-псевдоурин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b32)/5-метокси-урин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b32)/5-метил-урин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b32)/5-бром-урин
	Модифицированный цитидин, содержащий (b32)/2-тио-урин
	Приблизительно 50% цитидина заменено модифицированным цитидином (b32)/приблизительно 50% уридина представляет собой 2-тио-урин
40	Модифицированный уридин, содержащий (b1)N4-ацетил-цитидин
	Модифицированный уридин, содержащий (b1)/5-метил-цитидин
45	Модифицированный уридин, содержащий (b8)N4-ацетил-цитидин
	Модифицированный уридин, содержащий (b8)/5-метил-цитидин
45	Модифицированный уридин, содержащий (b28)N4-ацетил-цитидин
	Модифицированный уридин, содержащий (b28)/5-метил-цитидин
	оснований Формулы (b28)
	Модифицированный уридин, содержащий (b29)N4-ацетил-цитидин

оснований Формулы (b29)	Модифицированный уридин, содержащий (b29)/5-метил-цитидин
Модифицированный уридин, содержащий одно или более нуклеиновых оснований Формулы (b30)	Модифицированный уридин, содержащий (b30)/N4-ацетил-цитидин
	Модифицированный уридин, содержащий (b30)/5-метил-цитидин

5 [00318] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 25% цитозина заменено соединением Формул (b10)-(b14) (например, по меньшей мере приблизительно 30%, по
 10 меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере
 15 приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере
 20 приблизительно 95% или приблизительно 100%).

[00319] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 25% урацила заменено соединением Формул (b1)-(b9) (например, по меньшей мере приблизительно 30%, по
 15 меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере
 20 приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере
 25 приблизительно 95% или приблизительно 100%).

[00320] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 25% цитозина заменено соединением Формул (b10)-(b14), и по меньшей мере 25% урацила заменено соединением
 25 Формул (b1)-(b9) (например, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере
 30 приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере
 35 приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или приблизительно 100%).

Синтез молекул модифицированных нуклеиновых кислот

[00321] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот для применения в соответствии с настоящим документом могут быть получены в соответствии с любой
 35 пригодной методикой, в том числе, без ограничений, транскрипцией *in vitro*, например, химическим синтезом и ферментным синтезом, или ферментным и химическим
 40 расщеплением *in vitro* прекурсора, и т.д. Методы синтеза РНК известны из уровня техники (см., например, Gait, M.J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; и Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, NJ.) Totowa, N.J.:
 45 Humana Press, 2005; обе из которых включены в данное описание посредством ссылки).

[00322] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот, раскрытые в настоящем документе, могут быть получены из легко доступных исходных материалов с
 45 применением следующих общих способов и методик. Следует понимать, что в случаях, где приведены типичные или предпочтительные условия процесса (например, значения температуры реакции, длительности, молярные соотношения реагентов, растворители, давление, и т.д.), другие условия способа также могут применяться, если не указано иное. Оптимальные условия реакции могут варьировать для используемых конкретных

реагентов или растворителя, и такие условия могут быть определены специалистом в данной области с помощью шаблонных методик оптимизации.

[00323] Протекание способов, раскрытых в настоящем документе, можно контролировать в соответствии с любым пригодным методом, известным из уровня техники. Например, образование продукта можно контролировать спектроскопическими средствами, такими как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, H^1 или ^{13}C), ИК-спектроскопия, спектрофотометрия (например, в УФ-видимой области) или масс-спектрометрия, или хроматография, например, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или тонкослойная хроматография.

[00324] Получение молекул модифицированных нуклеиновых кислот может включать введение и удаление защитных групп для различных химических групп. Необходимость во введении и удалении защитных групп, а также выбор пригодных защитных групп могут быть легко определены специалистом в данной области. Химия защитных групп описана, например, в Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991, которая включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00325] Реакции в способах, раскрытых в настоящем документе, могут быть проведены в подходящих растворителях, которые могут быть легко выбраны специалистом в области органического синтеза. Пригодными растворителями могут быть в значительной степени не реагирующие с исходными материалами (реагентами), промежуточными соединениями или продуктами при температурах, при которых проходят реакции, т.е., температурах, которые могут варьировать от температуры замерзания растворителя до температуры кипения растворителя. Конкретная реакция может быть проведена в одном растворителе или смеси более чем одного растворителя. В зависимости от конкретной стадии реакции, могут быть выбраны пригодные растворители для конкретной стадии реакции.

[00326] Разделение рацемических смесей молекул модифицированных нуклеиновых кислот может быть осуществлено любым из многочисленных способов, известных из уровня техники. Пример способа включает, без ограничений, фракционную перекристаллизацию с применением "хиральной разделяющей кислоты", которая представляет собой оптически активную, солеобразующую органическую кислоту. Пригодные разделяющие агенты для способов фракционной перекристаллизации представляют собой, например, оптически активные кислоты, такие как D- и L-формы винной кислоты, диацетилвинной кислоты, дибензоилвинной кислоты, манделовой кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты или различных оптически активных сульфокамфорных кислот. Кроме того, разделение рацемических смесей может быть осуществлено элюацией на колонке, заполненной оптически активным разделяющим агентом (например, динитробензоилфенилглицином). Пригодные композиции растворителей для элюации могут быть определены специалистом в данной области.

[00327] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот не обязательно должны быть однородно модифицированы по всей длине молекулы. Различные модификации нуклеиновой кислоты и/или структур скелета могут присутствовать в различных положениях нуклеиновой кислоты. Среднему специалисту в данной области будет понятно, что аналоги нуклеотидов или другая модификация(и) могут находиться в любом положении(ях) нуклеиновой кислоты, таким образом, что функция нуклеиновой кислоты по существу не снижается. Кроме того, модификация может представлять собой 5'- или 3'-концевую модификацию. Нуклеиновые кислоты могут содержать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид и максимум 100% модифицированных

нуклеотидов, или любой процент в указанном интервале, например, по меньшей мере 5% модифицированных нуклеотидов, по меньшей мере 10% модифицированных нуклеотидов, по меньшей мере 25% модифицированных нуклеотидов, по меньшей мере 50% модифицированных нуклеотидов, по меньшей мере 80% модифицированных нуклеотидов или по меньшей мере 90% модифицированных нуклеотидов. Например, нуклеиновые кислоты могут содержать модифицированный пиримидин, такой как урацил или цитозин. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100% урацила в нуклеиновой кислоте может быть заменено модифицированным урацилом. Модифицированный урацил может быть заменен соединением с единственной уникальной структурой или множеством соединений различной структуры (например, 2, 3, 4 или более уникальных структур). В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100% цитозина в нуклеиновой кислоте может быть заменено модифицированным цитозином. Модифицированный цитозин может быть заменен соединением с единственной уникальной структурой или множеством соединений различной структуры (например, 2, 3, 4 или более уникальных структур).

[00328] В общем, наименьшая длина модифицированной мРНК, в настоящем документе "ммРНК," согласно настоящему документу может быть длиной последовательности мРНК, достаточной для кодирования дипептида. В другом варианте реализации длина последовательности мРНК может быть достаточной для кодирования трипептида. В другом варианте реализации длина последовательности мРНК может быть достаточной для кодирования тетрапептида. В другом варианте реализации длина последовательности мРНК может быть достаточной для кодирования пентапептида. В другом варианте реализации длина последовательности мРНК может быть достаточной для кодирования гексапептида. В другом варианте реализации длина последовательности мРНК может быть достаточной для кодирования гептапептида. В другом варианте реализации длина последовательности мРНК может быть достаточной для кодирования октапептида. В другом варианте реализации длина последовательности мРНК может быть достаточной для кодирования нонапептида. В другом варианте реализации длина последовательности мРНК может быть достаточной для кодирования декапептида.

[00329] Примеры дипептидов, которые могут кодироваться последовательностями молекул модифицированной нуклеиновой кислоты, включают, без ограничений, карнозин и анзерин.

[00330] В дополнительном варианте реализации длина мРНК может составлять более 30 нуклеотидов. В другом варианте реализации длина молекулы РНК может составлять более 35 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более чем приблизительно 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 4000 и 5000 нуклеотидов).

Пример свойств молекул модифицированных нуклеиновых кислот

Партнеры по взаимодействию основных бороздок

[00331] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот, например, модифицированной мРНК (ммРНК), раскрытых в настоящем документе, могут нарушать взаимодействие с распознающими рецепторами, которые обнаруживают и реагируют на РНК-лиганды посредством взаимодействия, например, связывания, с

поверхностью большой бороздки нуклеотида или нуклеиновой кислоты. Таким образом, РНК-лиганды, содержащие молекулы модифицированных нуклеотидов или модифицированных нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем документе, уменьшают взаимодействие с партнерами по связыванию большой бороздки, и, таким образом, снижают природный иммунный ответ или экспрессию и секрецию провоспалительных цитокинов, или оба.

[00332] Примеры партнеров взаимодействия большой бороздки, например, связывания, включают, без ограничений, следующие нуклеазы и геликазы. В пределах мембран, TLR (Toll-подобные рецепторы) 3, 7 и 8 могут реагировать на одно- и двухцепочечную РНК. В цитоплазме, члены суперсемейства 2 класса DEX(D/H) геликаз и АТФаз могут распознавать РНК для инициации противовирусных реакций. Указанные геликазы включают RIG-I (индуцируемый ретиноевой кислотой ген I) и MDA5 (ассоциированный с дифференцировкой меланомы ген 5). Другие примеры включают лабораторию генетики и физиологии 2 (LGP2), белки, содержащие домен HIN-200 или белки, содержащие домен геликазы.

Предупреждение или уменьшение активации природного клеточного иммунного ответа с помощью молекул модифицированных нуклеиновых кислот

[00333] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот, например, мРНК, раскрытые в настоящем документе, уменьшают природный иммунный ответ в клетке. Термин «природный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, в том числе, без ограничений, одноцепочечные нуклеиновые кислоты, в общем, вирусного или бактериального происхождения, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, конкретно интерферонов, и гибель клетки. Кроме того, синтез белка может снижаться в ходе природного клеточного иммунного ответа. Хотя предпочтительной является элиминация природного иммунного ответа в клетке, в настоящем документе предлагается модифицированная мРНК, которая в значительной степени снижает иммунный ответ, в том числе, проведение сигнала интерферона, не вызывая полной элиминации такого ответа. В некоторых вариантах реализации иммунный ответ может быть снижен на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,9% или более чем 99,9%, по сравнению с иммунным ответом, индуцируемым соответствующей немодифицированной молекулой нуклеиновой кислоты. Такое снижение может быть измерено по уровню экспрессии или активности интерферонов Типа 1 или экспрессии регулируемых интерфероном генов, таких как toll-подобные рецепторы (например, TLR7 и TLR8). Кроме того, снижение природного иммунного ответа может быть измерено по уменьшению гибели клеток после введения одной или более доз модифицированной РНК в популяцию клеток; например, гибель клеток уменьшается на 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% или более чем 95%, по сравнению с гибелью клеток, наблюдаемой в случае соответствующей немодифицированной молекулы нуклеиновой кислоты. Более того, может погибнуть менее 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01% или менее чем 0,01% клеток, которые контактировали с модифицированными молекулами нуклеиновой кислоты.

[00334] В настоящем документе раскрывается повторное введение (например, трансфекция) модифицированных молекул нуклеиновой кислоты в популяцию клеток-мишеней, например, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Стадия контакта с популяцией клеток может повторяться один или более раз (например, 2, 3, 4, 5 или более 5 раз). В некоторых вариантах реализации стадия контакта популяции клеток с модифицированными молекулами нуклеиновой кислоты может повторяться достаточное количество раз для

достижения предварительно определенной эффективности трансляции белка в популяции клеток. С учетом сниженной цитотоксичности для популяции клеток-мишеней посредством модификации нуклеиновой кислоты, такие повторные трансфекции будут возможными для различных типов клеток.

5 [00335] Модифицированные нуклеиновые кислоты по изобретению, содержащие комбинацию модификаций, раскрытых в настоящем документе, могут обладать превосходящими свойствами, что делает их более пригодными в качестве терапевтических средств.

10 [00336] Было определено, что модель «все или ничего» в данной области крайне недостаточна для описания биологических феноменов, связанных с терапевтической пригодностью модифицированной мРНК. Авторами настоящего изобретения обнаружено, что для усовершенствования белковых продуктов можно рассмотреть природу модификации или комбинации модификаций, процент модификации и обзор более чем одного цитокина или показателя для определения профиля эффективности и риска для конкретной модифицированной мРНК.

15 [00337] В одном аспекте изобретения, способы определения эффективности модифицированной мРНК, по сравнению с немодифицированной, включают измерение и анализ одного или более цитокинов, экспрессия которых запускается введением экзогенной нуклеиновой кислоты по изобретению. Полученные значения сравнивают с введением немодифицированной нуклеиновой кислоты или стандартным показателем, таким как цитокиновый ответ, PolyIC, R-848 или другой стандарт, известный из уровня техники.

25 [00338] Один из примеров стандартного показателя, разработанного в настоящем изобретении, представляет собой меру соотношения уровня или количества кодируемого полипептида (белка), продуцированного в клетке, ткани или организме, и уровня или количества одного или более (или панели) цитокинов, экспрессия которых запускается в клетке, ткани или организме в результате введения или контакта с модифицированной нуклеиновой кислотой. Такие соотношения в настоящем документе обозначаются как Соотношение Белок:Цитокин или Соотношение «БЦ». Чем выше соотношение БЦ, тем более эффективна модифицированная нуклеиновая кислота (полинуклеотид, кодирующий измеряемый белок). Предпочтительные Соотношения БЦ, по цитокину, в настоящем изобретении могут составлять свыше 1, свыше 10, свыше 100, свыше 1000, свыше 10000 или более. Модифицированные нуклеиновые кислоты с более высоким Соотношением БЦ, чем у модифицированной нуклеиновой кислоты другого или немодифицированного конструкта, являются предпочтительными.

35 [00339] Соотношение БЦ может быть дополнительно уточнено с учетом процента модификаций в полинуклеотиде. Например, может быть определена выработка белка, нормализованная к 100% модифицированной нуклеиновой кислоты, как функция цитокина (или риск) или профиль цитокина.

40 [00340] В одном варианте реализации настоящего изобретения раскрыт способ определения, посредством химических реакций, цитокинов или процента модификации, относительной эффективности любого конкретного модифицированного полинуклеотида, путем сравнения Соотношения БЦ модифицированной нуклеиновой кислоты (полинуклеотида).

45 Активация иммунного ответа: Вакцины

[00341] В одном варианте реализации настоящего изобретения молекулы мРНК могут применяться для индукции или провоцирования иммунного ответа в организме. Молекулы мРНК для введения могут кодировать иммуногенный пептид или полипептид,

и могут кодировать более одного такого пептида или полипептида.

[00342] Дополнительно, некоторые модифицированные нуклеозиды или их комбинации, при введении в модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению, активизируют природный иммунный ответ. Такие активизирующие молекулы пригодны в качестве адъювантов, в сочетании с полипептидами и/или другими вакцинами. В некоторых вариантах реализации активизирующие молекулы содержат транслируемый участок, который кодирует последовательность полипептида, пригодную в качестве вакцины, таким образом, предлагая свойство самоадъюванта.

[00343] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК по изобретению могут кодировать иммуногенное средство. Введение модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, кодирующих иммуногенное средство, может активизировать иммунный ответ. В качестве неограничивающего примера, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, кодирующие иммуногенное средство, могут быть доставленным к клеткам, чтобы запустить множественные пути природного ответа (см. Международную публикацию WO 2012006377; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В качестве другого неограничивающего примера, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и ммРНК по настоящему изобретению, кодирующие иммуногенное средство, могут быть введены позвоночному животному в дозе, достаточно большой, чтобы быть иммуногенной для позвоночного животного (см. Международную публикацию WO 2012006372 и WO 2012006369; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00344] Модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению могут кодировать последовательность полипептида для вакцины, и могут дополнительно содержать ингибитор. Ингибитор может ослаблять представление антигена и/или подавлять различные пути, известные из уровня техники. В качестве неограничивающего примера, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению могут применяться для вакцины в комбинации с ингибитором, который может ослабить представление антигена (см. Международные публикации WO 2012089225 и WO 2012089338; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00345] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению могут представлять собой самореплицирующуюся РНК. Молекулы самореплицирующейся РНК могут повышать эффективность доставки РНК и экспрессию соответствующего генного продукта. В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК могут содержать по меньшей мере одну модификацию, раскрытую в настоящем документе и/или известную из уровня техники. В одном варианте реализации самореплицирующаяся РНК может быть сконструирована таким образом, что самореплицирующаяся РНК не будет индуцировать выработки, инфекционных вирусных частиц. В качестве неограничивающего примера, самореплицирующаяся РНК может быть сконструирована способами, раскрытыми в Публикации США US 20110300205 и Международной публикации WO 2011005799, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00346] В одном варианте реализации самореплицирующиеся модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению могут кодировать белок, который может вызывать иммунный ответ. В качестве неограничивающего примера,

модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК могут представлять собой самореплицирующуюся мРНК, которая может кодировать по меньшей мере один антиген (см. Публикацию США US 20110300205 и Международную публикацию WO 2011005799; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00347] В одном варианте реализации самореплицирующиеся модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК по изобретению могут быть введены в состав способами, раскрытыми в настоящем документе или известными в данной области. В качестве неограничивающего примера, самореплицирующаяся РНК может быть введена в состав для доставки способами, раскрытыми в Geall et al (Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines, PNAS 2012; PMID:22908294; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00348] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по настоящему изобретению могут кодировать амфифильные и/или иммуногенные амфифильные пептиды.

[00349] В одном варианте реализации состав на основе модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или ммРНК по настоящему изобретению может дополнительно содержать амфифильный и/или иммуногенный амфифильный пептид. В качестве неограничивающего примера, модифицированная молекула нуклеиновой кислоты или ммРНК, содержащая амфифильный и/или иммуногенный амфифильный пептид, может быть введена в состав, как описано в Публикации США US 20110250237 и Международных публикациях WO 2010009277 и WO 2010009065; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00350] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и ммРНК по настоящему изобретению могут быть иммуностимуляторами. В качестве неограничивающего примера, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и ммРНК могут кодировать полноразмерную или часть положительно-смысловую или отрицательно-смысловую цепи РНК вирусного генома (см. Международную публикацию WO 2012092569 и Публикацию США US 20120177701, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В другом неограничивающем примере, иммуностимулирующие модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по настоящему изобретению могут быть введены в состав вместе со вспомогательным веществом для последующего введения, как описано в настоящем документе и/или известно из уровня техники (см. Международную публикацию WO 2012068295 и Публикацию США US 20120213812, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00351] В одном варианте реализации ответ на вакцину, созданную в соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе, может быть усилен добавлением различных соединений с целью индукции терапевтического эффекта. В качестве неограничивающего примера, в состав вакцины может входить пептид, связывающийся с МНС II, или пептид с последовательностью, подобной связывающемуся с МНС II пептиду (см. Международные публикации WO 2012027365, WO 2011031298 и Публикации США US 20120070493, US 20110110965, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В качестве другого примера, в состав вакцины могут входить модифицированные никотиновые соединения, которые могут вызывать у субъекта реакцию в форме антител к остатку никотина (см. Международную публикацию WO 2012061717 и Публикацию США US 20120114677, каждая из которых

включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

Варианты полипептидов

[00352] Модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептиды, например, различные полипептиды, которым свойственна некоторая степень идентичности последовательности референтного полипептида. Термин «идентичность», как известно из уровня техники, обозначает взаимоотношения между последовательностями двух или более пептидов, определенное путем сравнения последовательностей. Кроме того, в уровне техники «идентичность» обозначает степень родства последовательностей пептидов, определяемую по количеству совпадений между цепями из двух или более остатков аминокислот. Идентичность измеряется процентом идентичных совпадений между меньшей из двух или более последовательностей при выравнивании промежутков (если они присутствуют) с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е., «алгоритмов»). Идентичность родственных пептидов может быть легко вычислена известными способами. Такие способы включают, без ограничений, раскрытые в Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988); все из которых включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00353] В некоторых вариантах реализации, вариант полипептида может обладать такой же или сходной активностью с референтным полипептидом. Альтернативно, вариант может обладать измененной активностью (например, увеличенной или уменьшенной) относительно референтного полипептида. В общем, последовательность вариантов конкретного полинуклеотида или полипептида согласно настоящему документу будет по меньшей мере приблизительно на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичной последовательности конкретного референтного полинуклеотида или полипептида, по данным программ выравнивания последовательностей и параметров, раскрытых в настоящем документе и известных специалистам из уровня техники.

[00354] Специалисту в данной области будет понятно, что фрагменты белка, функциональные домены белка и гомологичные белки также рассматриваются как находящиеся в пределах контекста настоящего документа. Например, в настоящем документе раскрывается любой белковый фрагмент референтного белка (что означает последовательность полипептида, которая по меньшей мере на 1 остаток аминокислоты короче последовательности референтного полипептида, но в других отношениях является идентичной) длиной 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 аминокислот. В качестве другого примера, любой белок, который содержит последовательность длиной около 20, около 30, около 40, около 50, или около 100 аминокислот, которая приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% или приблизительно на 100% идентична любой из последовательностей, раскрытых в настоящем документе, может использоваться в соответствии с настоящим документом. В некоторых вариантах реализации последовательность белка, которая используется в соответствии с настоящим документом, содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, или более мутаций, как проиллюстрировано

в любой из последовательностей, раскрытых или процитированных в настоящем документе.

Комплексы полипептид-нуклеиновая кислота

[00355] Надлежащая трансляция белка включает физическую агрегацию целого ряда полипептидов и нуклеиновых кислот, связанных с мРНК. В настоящем документе раскрыты комплексы белок-нуклеиновая кислота, содержащие транслируемую мРНК с одной или более модификаций нуклеозидов (например, по меньшей мере две различные модификации нуклеозидов) и один или более полипептидов, связанных с мРНК. В общем, белки предложены в количестве, эффективном для предупреждения или уменьшения природного иммунного ответа клетки, в которую введен комплекс.

Нетранслируемые модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты

[00356] Как раскрыто в настоящем документе, предложены мРНК, содержащие в существенной мере нетранслируемые последовательности. Такие мРНК при введении субъекту могут быть эффективными в качестве вакцины. Кроме того, раскрыто, что субъект, которому вводят вакцину, может быть млекопитающим, более предпочтительно человеком, и наиболее предпочтительно пациентом.

[00357] Также раскрыты модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат один или более не кодирующих участков. Такие модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, в общем, не транслируются, но способны к связыванию и секвестрации одного или более трансляционных компонентов аппарата клетки, такого как рибосомальный белок или транспортная РНК (тРНК), таким образом, эффективно снижая экспрессию белка в клетке. Модифицированная молекула нуклеиновой кислоты может содержать ядрышковую РНК небольшого размера (мяРНК), микро-РНК (микро-РНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или РНК, взаимодействующую по piwi-типу (piwi-взаимодействующая РНК).

Фармацевтические составы

Препарат, введение, доставка и дозы

[00358] В настоящем изобретении раскрываются составы и комплексы на основе модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтические составы могут необязательно содержать одну или более дополнительных активных субстанций, например терапевтически и/или профилактически активные субстанции. Общие соображения касательно лекарственной формы и/или производства фармацевтических агентов можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00359] В некоторых вариантах реализации составы вводят людям, пациентам-людям или субъектам. Для целей настоящего документа, выражение «активный ингредиент», в общем, обозначает модифицированные нуклеиновые кислоты и ммРНК для введения, как раскрыто в настоящем документе.

[00360] Хотя описания фармацевтических составов, раскрытых в настоящем документе, главным образом, относятся к фармацевтическим составам, которые пригодны для введения человеку, специалисту будет понятно, что такие составы, в общем, пригодны для введения любому другому животному, например, негуманоидным животным, например, негуманоидным млекопитающим. Модификация фармацевтических составов, пригодных для введения человеку, с целью получения составов, пригодных для введения различным животным, хорошо изучена, и средний ветеринарный фармаколог может разработать и/или осуществить такую модификацию

в пределах шаблонного экспериментирования, если оно необходимо. Субъекты, которым предполагается вводить фармацевтические составы, включают, без ограничений, человека и/или других приматов; млекопитающих, в том числе, разводимых в коммерческих целях млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, мыши и/или крысы; и/или птиц, в том числе, разводимых в коммерческих целях птиц, таких как домашняя птица, куры, утки, гуси и/или индюки.

[00361] Препараты фармацевтических составов, раскрытых в настоящем документе, могут быть получены любым способом, известным, или который будет в будущем разработан в области фармакологии. В общем, такие способы получения включают стадию сочетания активного ингредиента со вспомогательным веществом и/или одним или более других дополнительных ингредиентов, а затем, при необходимости и/или желании, разделения, формирования и/или упаковки продукта в желательную одно- или многодозовую упаковку.

[00362] Фармацевтический состав в соответствии с изобретением может быть получен, упакован и/или продан в нерасфасованном виде, в виде однодозовой формы и/или в виде множества однодозовых форм. В настоящем документе «единица дозы» обозначает дискретное количество фармацевтического состава, содержащее предварительно определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента, в общем, соответствует дозе активного ингредиента для введения субъекту и/или подходящей части такой дозы, например, половине или трети такой дозы.

[00363] Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтическом составе в соответствии с изобретением будут варьировать, в зависимости от вида, размеров и/или состояния здоровья субъекта, получающего лечение, и дополнительно будут зависеть от предполагаемого способа введения состава. В качестве примера, состав может содержать от 0,1% до 100%, например, 0,5-50%, 1-30%, 5-80%, по меньшей мере 80% масс активного ингредиента.

Препараты

[00364] Модифицированная нуклеиновая кислота и ммРНК по изобретению может быть введена в состав с использованием одного или более вспомогательных веществ для: (1) повышения стабильности; (2) увеличения трансфекции клеток; (3) обеспечения контролируемого или замедленного высвобождения (например, из препарата депо модифицированной нуклеиновой кислоты или ммРНК); (4) изменения распределения в биологической системе (например, нацеливания модифицированной нуклеиновой кислоты или ммРНК на конкретные ткани или типы клеток); (5) увеличения трансляции кодируемого белка *in vivo*; и/или (6) изменения профиля высвобождения кодируемого белка *in vivo*. В дополнение к традиционным вспомогательным веществам, таким как любые и все растворители, дисперсионные среды, разбавители или другие жидкие носители, диспергирующие или суспендирующие агенты, поверхностно-активные агенты, агенты для поддержания изотоничности, загустители или эмульгаторы, консерванты; вспомогательные вещества по настоящему изобретению могут включать, без ограничений, липидоиды (липидоподобные материалы), липосомы, наночастицы липидов, полимеры, липоплексы (самособирающиеся комплексы из катионных липидов и ДНК), наночастицы со структурой ядро/оболочка, пептиды, белки, трансфицированные модифицированной нуклеиновой кислотой или ммРНК клетки (например, для пересадки субъекту), гиалуронидазу, имитаторы наночастиц и их комбинации. Соответственно, препараты по изобретению могут содержать одно или более вспомогательных веществ, каждое в количестве, которое в совокупности повышает стабильность

модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, увеличивает трансфекцию клетки модифицированной нуклеиновой кислотой или мРНК, увеличивает экспрессию модифицированной нуклеиновой кислоты или кодируемого мРНК белка и/или изменяет профиль высвобождения модифицированной нуклеиновой кислоты или кодируемых мРНК белков. Кроме того, модифицированные нуклеиновые кислоты и мРНК по
5 настоящему изобретению могут быть введены в препарат с использованием самособирающихся наночастиц нуклеиновой кислоты.

[00365] Препараты фармацевтических составов, раскрытых в настоящем документе, могут быть получены любым способом, известным или который будет в будущем
10 разработан в области фармакологии. В общем, такие способы получения включают стадию сочетания активного ингредиента со вспомогательным веществом и/или одним или более других дополнительных ингредиентов.

[00366] Фармацевтический состав в соответствии с настоящим документом может быть получен, упакован и/или продан в нерасфасованном виде, в виде однодозовой
15 формы и/или в виде множества однодозовых форм. В настоящем документе «единица дозы» обозначает дискретное количество фармацевтического состава, содержащее предварительно определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента, в общем, соответствует дозе активного ингредиента для введения субъекту и/или подходящей части такой дозы, в том числе, без ограничений, половине или трети
20 такой дозы.

[00367] Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтическом составе в соответствии с настоящим документом могут варьировать, в зависимости от вида, размеров и/или состояния здоровья субъекта, получающего*
25 лечение, и дополнительно будут зависеть от предполагаемого способа введения состава. В качестве примера, состав может содержать от 0,1% до 99% масс активного ингредиента.

[00368] В некоторых вариантах реализации препараты модифицированной мРНК, раскрытые в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере одну
30 модифицированную мРНК. Препараты могут содержать 1, 2, 3, 4 или 5 модифицированных мРНК. В одном варианте реализации препарат содержит по меньшей мере три модифицированных мРНК, кодирующие белки. В одном варианте реализации препарат содержит по меньшей мере пять модифицированных мРНК, кодирующих белки.

[00369] Фармацевтические препараты могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, которое, в соответствии с
35 настоящим документом, включает, без ограничений, любые и все растворители, дисперсионные среды, разбавители или другой жидкий носитель, диспергирующие или суспендирующие агенты, поверхностно-активные агенты, агенты для поддержания
40 изотоничности, загустители или эмульгаторы агентов, консерванты и т.п., в соответствии с конкретной желательной лекарственной формой. Различные вспомогательные вещества для получения фармацевтических составов и методы получения составов известны из
уровня техники (см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A.R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; включено в настоящий
45 документ в полном объеме посредством ссылки). Использование обычной среды вспомогательного вещества может быть предусмотрено в контексте настоящего документа, за исключением случаев, когда какая-либо обычная среда вспомогательного вещества может быть несовместима с субстанцией или ее производными, например,

оказывает какое-либо нежелательное биологическое влияние или вступает в другое нежелательное взаимодействие с любым другим компонентом(ами) фармацевтического состава.

5 [00370] В некоторых вариантах реализации размер наночастицы липида может быть увеличен и/или уменьшен. Изменение размера частицы может способствовать
противодействию биологической реакции, такой как, без ограничений, воспаление, или может усиливать биологический эффект модифицированной мРНК, вводимой
млекопитающим.

10 [00371] Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, используемые в производстве фармацевтических составов, включают, без ограничений, инертные
разбавители, поверхностно-активные вещества и/или эмульгаторы, консерванты,
буферизующие вещества, смазывающие вещества и/или масла. Такие вспомогательные
вещества необязательно могут входить в состав фармацевтических препаратов по
изобретению.

15 Липидоиды

[00372] Синтез липидоидов подробно описан, и препараты, содержащие такие
соединения, особенно пригодны для доставки модифицированных молекул нуклеиновой
кислоты или ммРНК (см. Mahon et al., *Bioconjug Chem.* 2010 21:1448-1454; Schroeder et
al., *J Intern Med.* 2010 267:9-21; Akinc et al., *Nat Biotechnol.* 2008 26:561-569; Love et al., *Proc*
20 *Natl Acad Sci USA.* 2010 107:1864-1869; Siegwart et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 108:
12996-3001; все из которых включены в настоящий документ в полном объеме).

[00373] Хотя указанные липидоиды использовали для эффективной доставки молекул
двухцепочечной миРНК грызунам и негуманоидным приматам (см. Akinc et al., *Nat*
Biotechnol. 2008 26:561-569; Frank-Kamenetsky et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 105:
25 11915-11920; Akinc et al., *Mol Ther.* 2009 17:872-879; Love et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*
2010 107:1864-1869; Leuschner et al., *Nat Biotechnol.* 2011 29:1005-1010; все из которых
включены в настоящий документ в полном объеме), в настоящем документе
раскрывается препарат на их основе и их применение для доставки модифицированных
молекул одноцепочечной нуклеиновой кислоты или ммРНК. Могут быть получены
30 комплексы, мицеллы, липосомы или частицы, содержащие указанные липидоиды, и,
следовательно, можно осуществить эффективную доставку модифицированных молекул
нуклеиновой кислоты или ммРНК, доказательством чего будет выработка кодируемого
белка, после инъекции липидоидного препарата путем местного и/или системного
введения. Липидоидные комплексы модифицированных молекул нуклеиновой кислоты
или ммРНК можно вводить различными способами, в том числе, без ограничений,
35 внутривенным, внутримышечным или подкожным способами.

[00374] На доставку нуклеиновых кислот *in vivo* могут повлиять многие параметры,
в том числе, без ограничений, состав препарата, природа частицы пегилирования,
степень нагрузки, соотношение олигонуклеотида и липида, а также биофизические
40 параметры, например, без ограничений, размер частицы (Akinc et al., *Mol Ther.* 2009 17:
872-879; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В
качестве примера, небольшие изменения длины якорной цепи поли(этиленгликоля)
(ПЭГ) липидов могут приводить к значительному влиянию на эффективность *in vivo*.
Препараты с различным липидоидами, в том числе, без ограничений, пента[3-(1-
45 лауриламинопропионил)]-триэтилететрамина гидрохлоридом (TETA-5LAP; или 98N12-
5, см. Murugaiah et al., *Analytical Biochemistry*, 401:61 (2010); включена в настоящий
документ в полном объеме посредством ссылки), C12-200 (в том числе, его производные
и варианты), и MD1, могут быть протестированы на предмет активности *in vivo*.

[00375] Липидоид, который в настоящем документе носит название «98N12-5», раскрыт Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879, которая включена в полном объеме посредством ссылки (см. Фиг. 1).

5 [00376] Липидоид, который в настоящем документе носит название «C12-200», раскрыт Love et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869 и Liu and Huang, Molecular Therapy. 2010 669-670 (см. Фиг. 1); оба из которых включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Препараты липидоидов могут содержать частицы, содержащие 3, 4 или более компонентов, в дополнение к модифицированным молекулам нуклеиновых кислот или ммРНК. В качестве примера, препараты с некоторыми
10 липидоидами, включают, без ограничений, 98N12-5, и могут содержать 42% липидоида, 48% холестерина и 10% ПЭГ (длина цепи алкила C14). В качестве другого примера, препараты с некоторыми липидоидами, включают, без ограничений, C12-200, и могут содержать 50% липидоида, 10% дистероилфосфатидилхолина, 38,5% холестерина и 1,5% ПЭГ-ДМГ.

15 [00377] В одном варианте реализации модифицированная молекула нуклеиновой кислоты или ммРНК, введенная в состав с липидоидом для системного внутривенного введения, может быть нацелена на печень. Например, конечный оптимизированный препарат для внутривенного введения, содержащий модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или ммРНК, и содержащий липиды с молярным составом 42%
20 98N12-5, 48% холестерина и 10% ПЭГ-липиды, с конечным массовым соотношением приблизительно общих липидов и модифицированной нуклеиновой кислоты или ммРНК 7,5:1, и длиной цепи алкила C14 в ПЭГ-липиде, со средним размером частицы грубо 50-60 нм, может приводить к распределению более 90% препарата в печени (см., Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879; включена в настоящий документ в полном объеме
25 посредством ссылки). В другом примере, препарат для внутривенного введения, содержащий липидоид C12-200 (см. предварительную заявку США 61/175770 и опубликованную международную заявку WO 2010129709, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), который может содержать молярное соотношение C12-200/дистероилфосфатидилхолин/холестерин/ПЭГ-ДМГ
30 50:10:38,5:1,5, с массовым соотношением общих липидов и модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК 7:1 и средним размером частицы 80 нм, может быть эффективным для доставки модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК к гепатоцитам (см., Love et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В другом
35 варианте реализации препарат, содержащий липидоид MD1, может применяться для эффективной доставки модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК к гепатоцитам *in vivo*. Характеристики оптимизированных липидоидных препаратов для внутримышечного или подкожного введения могут значительно варьировать, в зависимости от типа клетки-мишени и способности препаратов диффундировать сквозь
40 внеклеточный матрикс в кровоток. Хотя размер частицы менее 150 нм может быть желательным для эффективной доставки в гепатоцит за счет размера эндотелиальных fenestr (см., Akinc et al., Mol Ther. 2009 17:872-879; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), применение модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или ммРНК в липидоидных препаратах с целью доставки
45 препарата к клеткам других типов, включая, без ограничений, эндотелиальные клетки, миелоидные клетки и мышечные клетки, может не быть в такой же степени ограничено размером. Сообщалось о применении липидоидных препаратов для доставки ммРНК *in vivo* в другие клетки, кроме гепатоцитов, например, миелоидные клетки и эндотелий

(см. Akinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Leuschner et al., Nat Biotechnol. 2011 29: 1005-1010; Cho et al. Adv. Funct. Mater. 2009 19:3112-3118; 8th International Judah Folkman Conference, Cambridge, MA, October 8-9, 2010; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Для эффективной доставки в миелоидные клетки, такие как моноциты, препараты липидоидов могут содержать компоненты в подобном молярном соотношении. Различные соотношения липидоидов и других компонентов, включая, без ограничений, дистероилфосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-ДМГ, могут использоваться для оптимизации препарата модифицированной нуклеиновой кислоты или ммРНК с целью доставки в другие типы клеток, в том числе, без ограничений, гепатоциты, миелоидные клетки, мышечные клетки и т.п. Например, молярное соотношение компонентов может включать, без ограничений, 50% C12-200, 10% дистероилфосфатидилхолина, 38,5% холестерина и 1,5% ПЭГ-ДМГ (см. Leuschner et al., Nat Biotechnol 2011 29:1005-1010; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Применение липидоидных препаратов для локализованной доставки нуклеиновых кислот в клетки (например, без ограничений, жировые клетки и мышечные клетки) подкожным или внутримышечным способом может не требовать всех компонентов препарата, желательных для системной доставки, и таким образом, может включать только липидоид и модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или ммРНК.

[00378] Комбинации различных липидоидов могут применяться для повышения эффективности направляемой модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты или ммРНК выработки белка, поскольку липидоиды могут способствовать увеличению трансфекции клетки модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты или ммРНК и/или увеличивать трансляцию кодируемого белка (см. Whitehead et al., Mol. Ther. 2011, 19:1688-1694, включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

Липосомы, липотексы, и наночастицы липидов

[00379] Модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и ммРНК по изобретению могут быть введены в состав с использованием одной или более липосом, липоплексов или липидных наночастиц. В одном варианте реализации фармацевтические составы модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК содержат липосомы. Липосомы представляют собой искусственно полученные пузырьки, которые могут в основном состоять из двойного слоя липидов и могут применяться в качестве носителя для доставки при введении питательных веществ и фармацевтических составов. Липосомы могут быть различных размеров, например, без ограничений, многослойный пузырек (МЛП), диаметр которого может составлять сотни нанометров, и который может содержать серию концентрических двойных слоев, разделенных узкими водными отсеками, однаочейковый пузырек небольшого размера (ОЯП), диаметр которого может составлять менее 50 нм, и однослойный пузырек большого размера (ОБП), диаметр которого может составлять от 50 до 500 нм. Конструкция липосомы может, содержать, без ограничений, опсоины или лиганды, для улучшения прикрепления липосом к пораженной ткани или активизации событий, таких как, без ограничений, эндоцитоз. Липосомы могут иметь низкое или высокое значение рН с целью улучшения доставки фармацевтических составов.

[00380] Образование липосом может зависеть от физико-химических характеристик, например, без ограничений, содержащегося в липосоме фармацевтического состава и ингредиентов липосомы, природы среды, в которой диспергируются липидные пузырьки, эффективной концентрации содержащейся в липосоме субстанции и ее потенциальной токсичности, любых дополнительных процессов, вовлеченных в нанесение и/или

доставку пузырьков, масштаба оптимизации, полидисперсности и срока хранения пузырьков для предусмотренного применения, а также воспроизводимости от одной серии к другой и возможности крупномасштабного производства безопасных и эффективных липосомальных продуктов.

5 [00381] В одном варианте реализации фармацевтические составы, раскрытые в настоящем документе, могут содержать, без ограничений, липосомы, например, липосомы, образованные из 1,2-диолеилокси-N,N-диметиламинопропана (ДОДМА), липосомы DiLa2 от Marina Biotech (Ботелл, Вашингтон), 1,2-дилинолеилокси-3-
10 диметиламинопропан (ДЛин-ДМА), 2,2-дилинолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолан (ДЛин-КС2-ДМА), и МС3 (US 20100324120; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), и липосомы, которые могут доставлять низкомолекулярные лекарственные средства, например, без ограничений, DOXIL® от Janssen Biotech, Inc. (Хоршем, Пенсильвания). В одном варианте реализации
15 фармацевтические составы, раскрытые в настоящем документе, могут содержать, без ограничений, липосомы, например, полученные в результате синтеза стабилизированных частиц плазида-липид (СЧПЛ) или стабилизированной частицы нуклеиновая кислота-липид (СЧНКЛ), которые были раскрыты ранее и продемонстрировали свою пригодность для доставки олигонуклеотидов *in vitro* и *in vivo* (см. Wheeler et al. Gene Therapy. 1999 6:271-281; Zhang et al. Gene Therapy. 1999 6:1438-1447; Jeffs et al. Pharm Res. 2005 22:362-372; Morrissey et al., Nat Biotechnol. 2005 2:1002-1007; Zimmermann et al., Nature. 2006 441:111-114; Heyes et al. J Contr Rel. 2005 107:276-287; Semple et al. Nature Biotech. 2010 28:172-176; Judge et al. J Clin Invest. 2009 119:661-673; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; все из которых включены в настоящий документ в полном объеме). Оригинальный способ производства Wheeler et al. методом диализа против поверхностно-
25 активного вещества, который позже был усовершенствован Jeffs et al., носит названия метода самопроизвольного образования пузырька. Препараты липосом состоят из 3-4 липидных компонентов в дополнение к модифицированной молекуле нуклеиновой кислоты или ммРНК. В качестве примера, липосома может содержать, без ограничений, 55% холестерина, 20% дистероилфосфатидилхолина (ДСФХ), 10% ПЭГ-С-ДСГ и 15%
30 1,2-диолеилокси-N,N-диметиламинопропана (ДОДМА), как раскрыто Jeffs et al. В качестве другого примера, некоторые препараты липосом могут содержать, без ограничений, 48% холестерина, 20% ДСФХ, 2% ПЭГ-С-ДМА, и 30% катионного липида, где катионный липид может представлять собой 1,2-дистеарилокси-N,N-диметиламинопропан (ДСДМА), ДОДМА, ДЛин-ДМА или 1,2-дилиноленилокси-3-
35 диметиламинопропан (ДЛенДМА), как раскрыто Heyes et al.

[00382] В одном варианте реализации фармацевтические составы могут содержать липосомы, сформированные для доставки ммРНК, которая может кодировать по меньшей мере одно иммуногенное средство. ммРНК может быть инкапсулирована в липосому и/или она может содержаться в водном ядре, которое затем может быть
40 инкапсулировано в липосому (см. Международные публикации WO 2012031046, WO 2012031043, WO 2012030901 и WO 2012006378; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В другом варианте реализации ммРНК, которая может кодировать иммуногенное средство, может быть введена в катионную эмульсию масло-в-воде, где частица эмульсии содержит масляное ядро и катионный
45 липид, способный взаимодействовать с ммРНК, фиксирующий молекулу на частице эмульсии (см. Международную публикацию WO 2012006380; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Еще в одном варианте реализации липидный препарат может содержать по меньшей мере катионный липид, липид,

способный увеличивать трансфекцию, и по меньшей мере один липид, содержащий гидрофильную концевую группу, соединенную с липидным фрагментом (Международная публикация WO 2011076807 и Публикация США №20110200582; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В другом варианте реализации модифицированная мРНК, кодирующая иммуногенное средство, может быть введена в липидный пузырек, который может содержать поперечные связи между двумя содержащими функциональные группы слоями липида (см. Публикацию США 20120177724, включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

10 [00383] В одном варианте реализации модифицированная мРНК может быть введена в липидный пузырек, который может содержать поперечные связи между двумя содержащими функциональные группы слоями липида.

[00384] В одном варианте реализации модифицированная мРНК может быть введена в липид-поликатионный комплекс. Образование липид-поликатионного комплекса
15 может быть осуществлено способами, известными из уровня техники, и/или как раскрыто в Публикации США №20120178702, которая включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В качестве неограничивающего примера, поликатион может содержать катионный пептид или полипептид, например, без ограничений, полилизин, полиорнитин и/или полиаргинин и катионные пептиды, раскрытые в
20 Международной публикации WO 2012013326; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В другом варианте реализации модифицированная мРНК может быть введена в липид-поликатионный комплекс, который может дополнительно содержать нейтральный липид, например, без ограничений, холестерин или диолеоилфосфатидилэтаноламин (ДОФЭ).

25 [00385] На липосомальный препарат может повлиять, без ограничений, выбор катионного компонента липида, степень катионного насыщения липида, природа пегилирования, соотношение всех компонентов и биофизических параметров, таких как размер. В одном из примеров Semple et al. (Semple et al. Nature Biotech. 2010 28:172-176; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки),
30 липосомальный препарат состоял из 57,1% катионного липида, 7,1% дипальмитоилфосфатидилхолина, 34,3% холестерина и 1,4% ПЭГ-С-ДМА. В качестве другого примера, модификация состава катионного липида могла бы обеспечить более эффективную доставку мРНК в различные антигенпрезентирующие клетки (Basha et al. Mol Ther. 2011 19:2186-2200; включена в настоящий документ в полном объеме
35 посредством ссылки).

[00386] В некоторых вариантах реализации соотношение ПЭГ в препаратах липидной наночастицы (ЛНЧ) может быть увеличено или уменьшено, и/или длина углеродной цепи ПЭГ-липида может быть модифицирована с C14 до C18, с целью изменения фармакокинетики и/или распределения в биологической системе препаратов ЛНЧ. В
40 качестве неограничивающего примера, препараты ЛНЧ могут содержать 1-5% молярного соотношения липида ПЭГ-С-ДМПО, по сравнению с катионным липидом, ДСФХ и холестерином. В другом варианте реализации ПЭГ-С-ДМПО может быть заменен ПЭГ-липидом, например, без ограничений, ПЭГ-ДСГ (1,2-дистеароил-sn-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль) или ПЭГ-ДПГ (1,2-дипальмитоил-sn-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль). В качестве катионного липида может быть выбран любой липид, известный из уровня техники, например, без ограничений, ДЛин-МС3-ДМА, ДЛин-ДМА, С12-200 и ДЛин-КС2-ДМА.

[00387] В одном варианте реализации катионный липид может быть выбран, без

ограничений, из катионного липида, раскрытого в Международных публикациях WO 2012040184, WO 2011153120, WO 2011149733, WO 2011090965, WO 2011043913, WO 2011022460, WO 2012061259, WO 2012054365, WO 2012044638, WO 2010080724, WO 201021865 и WO 2008103276, патентах США №№ 7893302, 7404969 и 8283333, и Патентных публикациях США №№ US 20100036115 и US 20120202871; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В другом варианте реализации катионный липид может быть выбран, без ограничений, из формулы А, раскрытой в Международных публикациях WO 2012040184, WO 2011153120, WO 2011149733, WO 2011090965, WO 2011043913, WO 2011022460, WO 2012061259, WO 2012054365 и WO 2012044638; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Еще в одном варианте реализации катионный липид может быть выбран, без ограничений, из формулы CLI-CLXXIX Международной публикации WO 2008103276, формулы CLI-CLXXIX патента США №7893302, формулы CLI-CLXXXII патента США №7404969 и формулы I-VI Патентной публикации США №US 20100036115; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В качестве неограничивающего примера, катионный липид может быть выбран из (20Z,23Z)-N,N-диметилнонакоза-20,23-диен-10-амина, (17Z,20Z)-N,N-диметилгексакоза-17,20-диен-9-амина, (1Z,19Z)-N,N-диметилпентакоза-16,19-диен-8-амина, (13Z,16Z)-N,N-диметилдокоза-13,16-диен-5-амина, (12Z,15Z)-N,N-диметиленэйкоза-12,15-диен-4-амина, (14Z,17Z)-N,N-диметилтрикоза-14,17-диен-6-амина, (15Z,18Z)-N,N-диметилтетракоза-15,18-диен-7-амина, (18Z,21Z)-N,N-диметилгептакоза-18,21-диен-10-амина, (15Z,18Z)-N,N-диметилтетракоза-15,18-диен-5-амина, (14Z,17Z)-N,N-диметилтрикоза-14,17-диен-4-амина, (19Z,22Z)-N,N-диметилоктакоза-19,22-диен-9-амина, (18Z,21Z)-N,N-диметилгептакоза-18,21-диен-8-амина, (17Z,20Z)-N,N-диметилгексакоза-17,20-диен-7-амина, (16Z,19Z)-N,N-диметилпентакоза-16,19-диен-6-амина, (22Z,25Z)-N,N-диметилгептакоза-22,25-диен-10-амина, (21Z,24Z)-N,N-диметилтриаконта-21,24-диен-9-амина, (18Z)-N,N-диметилгептакоз-18-ен-10-амина, (17Z)-N,N-диметилгексакоз-17-ен-9-амина, (19Z,22Z)-N,N-диметилоктакоза-19,22-диен-7-амина, N,N-диметилгептакозан-10-амина, (20Z,23Z)-N-этил-N-метилнонакоза-20,23-диен-10-амина, 1-[(11Z, 14Z)-1-нонилэйкоза-11,14-диен-1-ил]пирролидина, (20Z)-N,N-диметилгептакоз-20-ен-10-амина, (15Z)-N,N-диметилгептакоз-15-ен-10-амина, (14Z)-N,N-диметилнонакоз-14-ен-10-амина, (17Z)-N,N-диметилнонакоз-17-ен-10-амина, (24Z)-N,N-диметилтриаконт-24-ен-10-амина, (20Z)-N,N-диметилнонакоз-20-ен-10-амина, (22Z)-N,N-диметилгептакоз-22-ен-10-амина, (16Z)-N,N-диметилпентакоз-16-ен-8-амина, (12Z,15Z)-N,N-диметил-2-нонилгеникоза-12,15-диен-1-амина, (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амина, N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]гептадекан-8-амина, 1-[(1S,2R)-2-гексилциклопропил]-N,N-диметилнонадекан-10-амина, N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]нонадекан-10-амина, N,N-диметил-21-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]геникоза-10-амина, N,N-диметил-1-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-пентилциклопропил]метил}циклопропил]нонадекан-10-амина, N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]гексадекан-8-амина, N,N-диметил-[(1R,2S)-2-ундецилциклопропил]тетрадекан-5-амина, N,N-диметил-3-{7-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]гептил}додекан-1-амина, 1-[(1R,2S)-2-гептилциклопропил]-N,N-диметилоктадекан-9-амина, 1-[(1S,2R)-2-децилциклопропил]-N,N-диметилпентадекан-6-амина, N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]пентадекан-8-амина, R-N,N-диметил-1-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-3-(октилокси)пропан-2-амина, S-N,N-диметил-1-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-3-(окталокси)пропан-2-амина, 1-{2-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-1-[(октилокси)метил]этил}пирролидина, (2S)-

N,N-диметил-1-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-3-[(5Z)-окт-5-ен-1-илокси]пропан-2-амина, 1-{2-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-1-[(октилокси)метил]этил} азетидина, (2S)-1-(гексилокси)-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амина, (2S)-1-(гептилокси)-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амина, N,N-диметил-1-(нонилокси)-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амина, N,N-диметил-1-[(9Z)-октадек-9-ен-1-илокси]-3-(октилокси)пропан-2-амина; (2S)-N,N-диметил-1-[(6Z,9Z,12Z)-октадека-6,9,12-триен-1-илокси]-3-(октилокси)пропан-2-амина, (2S)-1-[(11Z,14Z)-эйкоза-11,14-диен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(пентилокси)пропан-2-амина, (2S)-1-(гексилокси)-3-[(11Z,14Z)-эйкоза-11,14-диен-1-илокси]-N,N-диметилпропан-2-амина, 1-[(11Z,14Z)-эйкоза-11,14-диен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(октилокси)пропан-2-амина, 1-[(13Z,16Z)-докоза-13,16-диен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(октилокси)пропан-2-амина, (2S)-1-[(13Z,16Z)-докоза-13,16-диен-1-илокси]-3-(гексилокси)-N,N-диметилпропан-2-амина, (2S)-1-[(13Z)-докоз-13-ен-1-илокси]-3-(гексилокси)-N,N-диметилпропан-2-амина, 1-[(13Z)-докоз-13-ен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(октилокси)пропан-2-амина, 1-[(9Z)-гексадек-9-ен-1-илокси]-N,N-диметил-3-(октилокси)пропан-2-амина, (2R)-N,N-диметил-N(1-метилоктил)окси]-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амина, (2R)-1-[(3,7-диметилоктил)окси]-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амина, N,N-диметил-1-(октилокси)-3-({8-[(1S,2S)-2-[[[(1R,2R)-2-пентилциклопропил]метил]циклопропил]октил}окси)пропан-2-амина, N,N-диметил-1-{{8-(2-октилциклопропил)октил}окси}-3-(октилокси)пропан-2-амина и (11E,20Z,23Z)-N,N-диметилнонакоза-11,20,2-триен-10-амина или фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера указанных соединений.

[00388] В одном варианте реализации катионный липид может быть синтезирован способами, известными из уровня техники, и/или как раскрыто в Международных публикациях WO 2012040184, WO 2011153120, WO 2011149733, WO 2011090965, WO 2011043913, WO 2011022460, WO 2012061259, WO 2012054365, WO 2012044638, WO 2010080724 и WO 201021865; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00389] В одном варианте реализации препарат ЛНЧ может содержать ПЭГ-к-ДМПО с молярным соотношением липида 3%. В другом варианте реализации препарат ЛНЧ может содержать ПЭГ-к-ДМПО с молярным соотношением липида 1,5%.

[00390] В одном варианте реализации препарат ЛНЧ может содержать ПЭГ-ДМГ 2000 (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]). В одном варианте реализации препарат ЛНЧ может содержать ПЭГ-ДМГ 2000, катионный липид, известный из уровня техники, и по меньшей мере еще один компонент. В другом варианте реализации препарат ЛНЧ может содержать ПЭГ-ДМГ 2000, катионный липид, известный из уровня техники, ДСФХ и холестерин. В качестве неограничивающего примера, препарат ЛНЧ может содержать ПЭГ-ДМГ 2000, ДЛин-ДМА, ДСФХ и холестерин. В качестве другого неограничивающего примера, препарат ЛНЧ может содержать ПЭГ-ДМГ 2000, ДЛин-ДМА, ДСФХ и холестерин в молярном соотношении 2:40:10:48 (см., например, Geall et al., Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines, PNAS 2012; PMID: 22908294; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00391] В одном варианте реализации препарат ЛНЧ может быть получен способами, раскрытыми в Международных публикациях №№ WO 2011127255 или WO 2008103276, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В качестве неограничивающего примера, модифицированная РНК, раскрытая в настоящем документе, может быть инкапсулирована в препараты ЛНЧ, как раскрыто

в WO 2011127255 и/или WO 2008103276; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В качестве другого неограничивающего примера, модифицированная РНК, раскрытая в настоящем документе, может быть введена в наночастицу для парентеральной доставки, как раскрыто в Публикации США №20120207845; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00392] В одном варианте реализации препараты ЛНЧ, раскрытые в настоящем документе, могут содержать поликатионную композицию. В качестве неограничивающего примера, поликатионная композиция может быть выбрана из формул 1-60 Патентной публикации США № US 20050222064; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В другом варианте реализации препараты ЛНЧ, содержащие поликатионную композицию, могут применяться для доставки модифицированной РНК, раскрытой в настоящем документе, *in vivo* и/или *in vitro*.

[00393] В одном варианте реализации препараты ЛНЧ, раскрытые в настоящем документе, могут дополнительно содержать молекулу, повышающую проницаемость. Неограничивающие примеры молекул, повышающих проницаемость, раскрыты в Патентной публикации США № US 20050222064; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

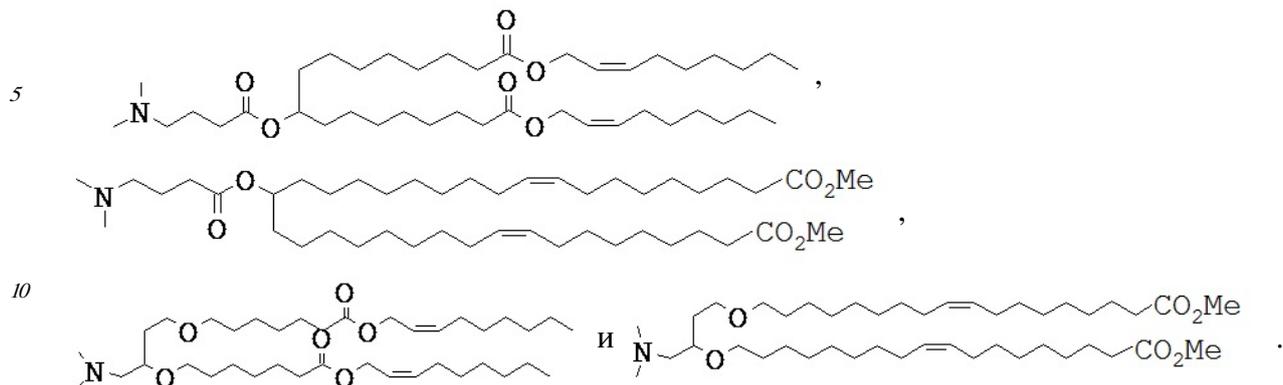
[00394] В одном варианте реализации фармацевтические составы могут быть введены в липосомы, такие как, без ограничений, липосомы DiLa2 (Marina Biotech, Ботелл, Вашингтон), SMARTICLES® (Marina Biotech, Ботелл, Вашингтон), липосомы на основе нейтрального ДОФХ (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) (например, доставка миРНК при раке яичника (Landen et al. Cancer Biology & Therapy 2006 5(12)1708-1713); включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки) и покрытые гиалуронатом липосомы (Quiet Therapeutics, Израиль).

[00395] Препараты наночастицы могут представлять собой углеводную наночастицу, содержащую углеводный носитель и модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты (например, мРНК). В качестве неограничивающего примера, углеводный носитель может включать, без ограничений, модифицированный ангидридом фитогликоген или материал типа гликогена, фитогликоген октенилсукцинат, фитогликоген бета-декстрин, модифицированный ангидридом фитогликоген бета-декстрин. (См., например, Международную Публикацию WO 2012109121; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00396] Препараты липидных наночастиц могут быть улучшены путем замены катионного липида поддающимся биологическому разложению катионным липидом, который известен как быстро элиминирующаяся липидная наночастица (бэЛНЧ). Ионизируемые катионные липиды, например, без ограничений, ДЛинДМА, ДЛин-КС2-ДМА, и ДЛин-МС3-ДМА, продемонстрировали аккумуляцию в плазме и тканях с течением времени, и потенциально могут представлять собой источник токсичности. Быстрый метаболизм быстро элиминирующихся липидов может улучшить переносимость и терапевтический индекс липидных наночастиц на порядок величины от дозы 1 мг/кг до 10 мг/кг у крыс. Введение разрушаемой ферментом эфирной связи может улучшить разложение и профиль метаболизма катионного компонента, при сохранении активности препарата бэЛНЧ. Эфирная связь может быть внутренней, т.е., расположенной в пределах липидной цепи, или она может быть концевой, т.е., расположенной на конце липидной цепи. Внутренняя эфирная связь может заменять любой атом углерода в липидной цепи.

[00397] В одном варианте реализации внутренняя эфирная связь может быть

расположена с любой стороны насыщенного атома углерода. Неограничивающие примеры бЭЛНЧ включают:



[00398] В одном варианте реализации иммунный ответ может быть вызван введением
 15 липидных наночастиц, которые могут содержать наномолекулу, полимер и
 иммуногенное средство. (Публикация США №20120189700 и Международная
 Публикация WO 2012099805; каждая из которых включена в настоящий документ в
 полном объеме посредством ссылки). Наномолекула может быть инкапсулирована в
 полимер или частично инкапсулирована в полимер. Иммуногенное средство может
 20 представлять собой рекомбинантный белок, модифицированную РНК раскрытую в
 настоящем документе. В одном варианте реализации липидные наночастицы могут
 быть сконструированы для применения в составе вакцины, например, без ограничений,
 против патогена.

[00399] Липидные наночастицы могут быть сконструированы таким образом, чтобы
 25 модифицировать поверхностные свойства частиц для проникновения липидных
 наночастиц сквозь барьер слизистой оболочки. Слизь расположена на ткани слизистой
 оболочки, например, без ограничений, ротовой полости (например, буккальная слизистая
 оболочка, слизистая оболочка пищевода и ткань миндалевидной железы), глаза,
 желудочно-кишечного тракта (например, желудка, тонкого кишечника, толстого
 30 кишечника, ободочной кишки, прямой кишки), носа, дыхательных путей (например,
 слизистая оболочка носа, глотки, трахеи и бронхов), мочеполового тракта (например,
 слизистая оболочка влагалища, шейки матки и уретры). Наночастицы размером более
 10-200 нм, которые предпочтительны с точки зрения более высокой эффективности
 инкапсуляции лекарственного средства и способности обеспечить контролируемую
 35 доставку широкого спектра лекарственных средств, считаются слишком большими
 для быстрой диффузии сквозь барьеры слизистой оболочки. Слизь непрерывно
 секретируется, распределяется, выталкивается или расщепляется и рециклируется таким
 образом, что большинство захваченных частиц могут быть удалены с ткани слизистой
 оболочки в течение секунд или нескольких часов. Крупные полимерные наночастицы
 40 (диаметром 200-500 нм), плотно покрытые низкомолекулярным полиэтиленгликолем
 (ПЭГ), диффундируют сквозь слизь всего в 4-6 раз медленнее, чем такие же частицы
 диффундируют в воде (Lai et al. PNAS 2007 104(5):1482-487; Lai et al. Adv Drug Deliv Rev.
 2009 61(2):158-171; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме
 посредством ссылки). Транспорт наночастиц можно определить с использованием
 45 скорости проникновения и/или методов флуоресцентной микроскопии, включая, без
 ограничений, восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (ВФПФ) и
 отслеживание множественных частиц с высоким разрешением (ОМЧ). В качестве
 неограничивающего примера, составы, которые могут проникать сквозь барьер
 слизистой оболочки, могут быть получены, как раскрыто в патенте США №8241670,

включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00400] Липидные наночастицы, сконструированные для проникновения сквозь слизь, могут содержать полимерный материал (т.е. полимерное ядро) и/или конъюгат полимер-витамин и/или три-блок-сополимер. Полимерный материал может включать, без ограничений, полиамины, полиэфиры, полиамиды, сложные полиэфиры, поликарбаматы, полимочевины, поликарбонаты, поли(стиролы), полиимиды, полисульфоны, полиуретаны, полиацетилены, полиэтилены, полиэтиленимины, полиизоцианаты, полиакрилаты, полиметакрилаты, полиакрилонитрилы и полиарилаты. Полимерный материал может быть биоразлагаемым и/или биосовместимым.

Полимерный материал может быть дополнительно облучен. В качестве неограничивающего примера, полимерный материал может быть облучен гамма-лучами (См, например, Международную заявку WO 201282165, включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Неограничивающие примеры конкретных полимеров включают поли(капролактон) (ПКЛ), этиленвинилацетатный полимер (ЭВА), поли(молочную кислоту) (ПМК), поли(L-молочную кислоту) (ПЛМК), поли(гликолевую кислоту) (ПГК), поли(молочную кислоту-со-гликолевую кислоту) (ПМГК), поли(L-молочную кислоту-со-гликолевую кислоту) (ПЛМГК), поли(D,L-лактид) (ПДЛЛ), поли(L-лактид) (ПЛМК), поли(D,L-лактид-со-капролактон), поли(D,L-лактид-со-капролактон-со-гликолид), поли(D,L-лактид-со-ПАО-со-D,L-лактид), поли(D,L-лактид-со-РРО-со-D,L-лактид), полиалкилцианоакрилат, полиуретан, поли-L-лизин (ПЛЛ), гидроксипропилметакрилат (ГПМА), полиэтиленгликоль, поли-L-глутаминовую кислоту, поли(гидроксикислоты), полиангидриды, полиортоэфиры, поли(эфирамиды), полиамиды, поли(эфирэфиры), поликарбонаты, полиалкилены, такие как полиэтилен и полипропилен, полиалкиленгликоли, такие как поли(этиленгликоль) (ПЭГ), полиалкиленоксиды (ПАО), полиалкилентерефталаты, такие как поли(этилентерефталат), поливиниловые спирты (ЛВС), поливиниловые эфиры, поливиниловые сложные эфиры, такие как поли(винилацетат), поливинилгалогениды, такие как поли(винилхлорид) (ПВХ), поливинилпирролидон, полисилоксаны, полистирол (ПС), полиуретаны, дериватизированную целлюлозу, например, алкилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, эфиры целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы, нитроцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, полимеры акриловых кислот, такие как поли(метил(мет)акрилат) (ПММА), поли(этил(мет)акрилат), поли(бутил(мет)акрилат), поли(изобутил(мет)акрилат), поли(гексил(мет)акрилат), поли(изодецил(мет)акрилат), поли(лаурил(мет)акрилат), поли(фенил(мет)акрилат), поли(метилакрилат), поли(изопропилакрилат), поли(изобутилакрилат), поли(октадецилакрилат), и сополимеры и их смеси, полидиоксанон и его сополимеры, полигидроксиалканоаты, полипропиленфумарат, полиоксиметилен, полоксамеры, поли(орто)эфиры, поли(масляную кислоту), поли(валериановую кислоту), поли(лактид-со-капролактон) и триметиленкарбонат, поливинилпирролидон. Липидные наночастицы могут быть покрыты или соединены с сополимером, например, без ограничений, блок-сополимером и (поли(этиленгликоль))-поли(пропиленоксид))-поли(этиленгликоль)) триблок-сополимером (см. например, Публикации США 20120121718 и 20100003337 и патент США №8263665; каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Сополимер может представлять собой полимер, который, в общем, расценивается как безопасный (ВРКБ), и образование липидных наночастиц может происходить таким образом, что новые химические молекулы не образуются. Например, липидные наночастицы могут содержать полоксамеры, покрывающие наночастицы ПМГК, без образования новых химических молекул, которые по-прежнему

могут быстро проникать сквозь слизь, вырабатываемую человеком (Yang et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011 50:2597-2600; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

5 [00401] Витамин в конъюгате полимер-витамин может быть витамином Е. Витаминная часть конъюгата может быть заменена другими пригодными компонентами, такими как, без ограничений, витамин А, витамин Е, другие витамины, холестерин, гидрофобный фрагмент или гидрофобный компонент других поверхностно-активных веществ (например, цепи стерола, жирные кислоты, углеводородные цепи и цепи алкиленоксида).

10 [00402] Липидная наночастица, сконструированная для проникновения сквозь слизь, может содержать модифицирующие поверхность агенты, например, без ограничений, ммРНК, анионные белки (такие как альбумин телячьей сыворотки), поверхностно-активные вещества (такие как катионные поверхностно-активные вещества, например, диметилдиоктадецил-аммония бромид), сахара или производные Сахаров (например, циклодекстрин), нуклеиновые кислоты, полимеры (например, гепарин, 15 полиэтиленгликоль и полоксамер), муколитические агенты (например, N-ацетилцистеин, полынь обыкновенная, бромелаин, папаин, клеродендрум, ацетилцистеин, бромгексин, карбоцистеин, эпразинон, месна, амброксол, собрерол, домиодол, летостеин, степронин, тиопронин, гелзолин, тимозин β 4 дорназа альфа, нелтенексин, эрдостеин) и различные ДНКазы, включая рчДНКазу. Модифицирующий поверхность агент может быть 20 внедрен или сцеплен с поверхностью частицы или расположен (например, посредством нанесения покрытия, адсорбции, образования ковалентной связи или другого процесса) на поверхности липидной наночастицы. (См., например, Публикации США 20100215580 и 20080166414; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

25 [00403] Проникающие сквозь слизь липидные наночастицы могут содержать по меньшей мере одну ммРНК, раскрытую в настоящем документе. ммРНК может быть инкапсулирована в липидную наночастицу и/или расположена на поверхности частицы. ммРНК может быть ковалентно присоединена к липидным наночастицам. Препараты 30 проникающих сквозь слизь липидных наночастиц могут содержать множество наночастиц. Кроме того, препараты могут содержать частицы, которые способны взаимодействовать со слизью и модифицировать структурные и/или адгезивные свойства окружающей слизи для уменьшения мукоадгезии, что может увеличить доставку проникающих сквозь слизь липидных наночастиц в ткань слизистой оболочки.

35 [00404] В одном варианте реализации модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или ммРНК вводят в липоплекс, например, без ограничений, система ATUPLEX™, система DACC, система DBTC и другая технология миРНК-липоплекс от Silence Therapeutics (Лондон, Великобритания), STEMFECT™ от STEMGENT® (Кембридж, Массачусетс), а также целевая и нецелевая доставка нуклеиновых кислот на основе полиэтиленimina (ПЭИ) или протамина (Aleku et al. *Cancer Res.* 2008 68:9788- 40 9798; Strumberg et al. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2012 50:76-78; Santel et al., *Gene Ther* 2006 13:1222-1234; Santel et al., *Gene Ther* 2006 13:1360-1370; Gutbier et al., *Pulm Pharmacol. Ther.* 2010 23:334-344; Kaufmann et al. *Microvasc Res* 2010 80:286-293 Weide et al. *J Immunother.* 2009 32:498-507; Weide et al. *J Immunother.* 2008 31:180-188; Pascolo *Expert Opin. Biol. Ther.* 4:1285-1294; Fotin-Mleczek et al., 2011 *J. Immunother.* 34:1-15; Song et al., *Nature Biotechnol.* 45 2005, 23:709-717; Peer et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 6;104:4095-4100; deFougerolles *Hum Gene Ther.* 2008 19:125-132; все из которых включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00405] В одном варианте реализации такие препараты дополнительно могут быть

разработаны, или составы могут быть модифицированы таким образом, что они пассивно или активно нацелены на различные типы клеток *in vivo*, включая, без ограничений, гепатоциты, иммунные клетки, опухолевые клетки, эндотелиальные клетки, презентующие антиген клетки и лейкоциты (Akinc et al. *Mol Ther.* 2010 18:1357-1364; Song et al., *Nat Biotechnol.* 2005 23:709-717; Judge et al., *J Clin Invest.* 2009 119:661-673; Kaufmann et al., *Microvasc Res* 2010 80:286-293; Santel et al., *Gene Ther* 2006 13:1222-1234; Santel et al., *Gene Ther* 2006 13:1360-1370; Gutbier et al., *Pulm Pharmacol. Ther.* 2010 23:334-344; Basha et al., *Mol. Ther.* 2011 19:2186-2200; Fenske and Cullis, *Expert Opin Drug Deliv.* 2008 5:25-44; Peer et al., *Science.* 2008 319:627-630; Peer and Lieberman, *Gene Ther.* 2011 18:1127-1133; все из которых включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Один из примеров пассивного нацеливания препаратов на клетки печени включает препараты липидных наночастиц на основе Длин-ДМА, ДЛин-КС2-ДМА и ДЛин-МС3-ДМА, которые доказано связываются с аполипопротеином Е и способствуют связыванию и захвату таких препаратов гепатоцитами *in vivo* (Akinc et al. *Mol Ther.* 2010 18:1357-1364; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Кроме того, препараты могут быть избирательно нацелены посредством экспрессии различных лигандов на их поверхности, например, без ограничений, фолат, трансферрин, N-ацетилгалактозамин (GalNAc), и подходов нацеливания с применением антител (Kolhatkar et al., *Curr Drug Discov Technol.* 2011 8:197-206; Musacchio and Torchilin, *Front Biosci.* 2011 16:1388-1412; Yu et al., *Mol Membr Biol.* 2010 27:286-298; Patil et al., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2008 25:1-61; Benoit et al., *Biomacromolecules.* 2011 12:2708-2714; Zhao et al., *Expert Opin Drug Deliv.* 2008 5:309-319; Akinc et al., *Mol Ther.* 2010 18:1357-1364; Srinivasan et al., *Methods Mol Biol.* 2012 820:105-116; Ben-Arie et al., *Methods Mol Biol.* 2012 757:497-507; Peer 2010 *J Control Release.* 20:63-68; Peer et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 104:4095-4100; Kim et al., *Methods Mol Biol.* 2011 721:339-353; Subramanya et al., *Mol Ther.* 2010 18:2028-2037; Song et al., *Nat Biotechnol.* 2005 23:709-717; Peer et al., *Science.* 2008 319:627-630; Peer and Lieberman, *Gene Ther.* 2011 18:1127-1133; все из которых объединены в настоящем документе в полном объеме посредством ссылки).

[00406] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК вводят в твердую липидную наночастицу. Твердая липидная наночастица (ТЛН) может быть сферической, со средним диаметром от 10 до 1000 нм. ТЛН содержит матрицу твердого липидного ядра, которая может сольубилизировать липофильные молекулы, и может быть стабилизирована с помощью поверхностно-активных веществ и/или эмульгаторов. В дополнительном варианте реализации липидная наночастица может представлять собой самособирающуюся наночастицу липид-полимер (см. Zhang et al., *ACS Nano*, 2008, 2 (8), pp 1696-1702; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00407] Липосомы, липоплексы или липидные наночастицы могут использоваться для повышения эффективности модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или направляемой мРНК выработки белка, поскольку эти препараты могут обладать способностью увеличивать трансфекцию клетки модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты или мРНК; и/или увеличивать трансляцию кодируемого белка. Один из таких примеров включает применение липидной инкапсуляции, чтобы создать возможность эффективной системной доставки полиплекса ДНК плазмиды (Heyes et al., *Mol Ther.* 2007 15:713-720; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Кроме того, липосомы, липоплексы или липидные наночастицы могут применяться для повышения стабильности модифицированных молекул

нуклеиновой кислоты или ммРНК.

[00408] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК по настоящему изобретению могут быть введены в состав для контролируемого высвобождения и/или целенаправленной доставки. В настоящем документе «контролируемое высвобождение» обозначает профиль высвобождения фармацевтического состава или соединения, который согласуется с конкретным характером высвобождения, чтобы обеспечить терапевтический результат. В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновых кислот или ммРНК могут быть инкапсулированы в агент доставки, раскрытый в настоящем документе и/или известный из уровня техники, для контролируемого высвобождения и/или целенаправленной доставки. В настоящем документе термин «инкапсулировать» обозначает включить, окружить или упаковать. В связи с составом соединений по изобретению, инкапсуляция может быть существенной, полной или частичной. Термин «в существенной мере инкапсулированный» означает, что по меньшей мере свыше 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,9 или более 99,999% фармацевтического состава или соединения по изобретению может быть включено, окружено или упаковано в агент доставки. «Частичная инкапсуляция» означает, что менее 10, 10, 20, 30, 40 50 или менее фармацевтического состава или соединения по изобретению может быть включено, окружено или упаковано в агент доставки. Предпочтительно, степень инкапсуляции может быть определена путем измерения степени выхода или активности фармацевтического состава или соединения по изобретению, с использованием флуоресценции и/или снимка электронного микроскопа. Например, по меньшей мере 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 или более 99,99% фармацевтического состава или соединения по изобретению инкапсулировано в агенте доставки.

[00409] В одном варианте реализации состав с контролируемым высвобождением может содержать, без ограничений, три-блок-сополимеры. В качестве неограничивающего примера, состав может содержать два различных вида три-блок-сополимеров (Международные публикации №№ WO 2012131104 и WO 2012131106; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00410] В другом варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК могут быть инкапсулированы в липидную наночастицу или быстро элиминирующуюся липидную наночастицу, и липидные наночастицы или быстро элиминирующая липидная наночастица далее может быть инкапсулирована в полимер, гидрогель и/или хирургический герметик, раскрытый в настоящем документе и/или известный из уровня техники. В качестве неограничивающего примера, полимер, гидрогель или хирургический герметик может представлять собой ПМГК, этиленвинилацетат (ЭВА), поллоксамер, GELSITE® (Nanotherapeutics, Inc. Алачуа, Флорида), NYLENEX® (Halozyme Therapeutics, Сан-Диего, Калифорния), хирургические герметики, такие как полимеры фибриногена (Ethicon Inc. Корнелия, Джорджия), TISSELL® (Baxter International, Inc, Дирфилд, Иллинойс), герметики на основе ПЭГ и COSEAL® (Baxter International, Inc, Дирфилд, Иллинойс).

[00411] В другом варианте реализации липидная наночастица может быть инкапсулирована в любой полимер, известный из уровня техники, который может образовывать гель при инъекционном введении субъекту. В качестве неограничивающего примера, липидная наночастица может быть инкапсулирована в полимерную матрицу, которая может быть биоразлагаемой.

[00412] В одном варианте реализации препарат модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК для контролируемого высвобождения и/или целенаправленной доставки может дополнительно содержать по меньшей мере один вид покрытия с контролируемым высвобождением. Покрытия с контролируемым высвобождением включают, без ограничений, OPADRY®, сополимер поливинилпирролидон/винилацетат, поливинилтшрролидон, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, EUDRAGIT RL®, EUDRAGIT RS® и производные целлюлозы, такие как водные дисперсии этилцеллюлозы (AQUACOAT® и SURELEASE®).

[00413] В одном варианте реализации препарат с контролируемым высвобождением и/или целенаправленной доставкой может содержать по меньшей мере один разлагаемый полиэфир, который может содержать поликатионные боковые цепи. Разлагаемые полиэфирные включают, без ограничений, поли(сериновый сложный эфир), поли(L-лактид-со-L-лизин), поли(4-гидрокси-L-пролиновый эфир) и их комбинации. В другом варианте реализации разлагаемые полиэфирные могут включать конъюгацию с ПЭГ с образованием пегилированного полимера.

[00414] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или мРНК по настоящему изобретению могут быть инкапсулированы в терапевтические наночастицы. Терапевтические наночастицы могут быть разработаны с применением способов, раскрытых в настоящем документе и известных из уровня техники, например, без ограничений, Международные публикации WO 2010005740, WO 2010030763, WO 2010005721, WO 2010005723, WO 2012054923, Публикации США №№ US 20110262491, US 20100104645, US 20100087337, US 20100068285, US 20110274759, US 20100068286 и US 20120288541 и патенты США №№8206747, 8293276, 8318208 и 8318211; каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В другом варианте реализации наночастицы терапевтического полимера могут быть идентифицированы способами, раскрытыми в Публикации США US 20120140790; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00415] В одном варианте реализации может быть создана терапевтическая наночастица для контролируемого высвобождения. В настоящем документе «контролируемое высвобождение» обозначает фармацевтический состав или соединение, которое соответствует скорости высвобождения на протяжении конкретного периода времени. Период времени может включать, без ограничений, часы, дни, недели, месяцы и годы. В качестве неограничивающего примера, наночастица с контролируемым высвобождением может содержать полимер и терапевтический агент, например, без ограничений, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и мРНК по настоящему изобретению (см. Международную публикацию №2010075072 и Публикации США №№ US 20100216804, US 20110217377 и US 20120201859, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00416] В одном варианте реализации могут быть созданы терапевтические наночастицы, специфичные в отношении мишени. В качестве неограничивающего примера, терапевтические наночастицы могут содержать кортикостероид (см. Международную публикацию WO 2011084518; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В одном варианте реализации могут быть созданы терапевтические наночастицы по настоящему изобретению, специфичные в отношении рака. В качестве неограничивающего примера, терапевтические наночастицы могут быть созданы в форме наночастиц, раскрытых в Международных публикациях WO 2008121949, WO 2010005726, WO 2010005725, WO 2011084521 и Публикациях США №№

US 20100069426, US 20120004293 и US 20100104655, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00417] В одном варианте реализации наночастицы по настоящему изобретению могут содержать полимерную матрицу. В качестве неограничивающего примера, наночастица может содержать 2 или более полимеров, например, без ограничений, полиэтилены, поликарбонаты, полиангидриды, полигидроксикислоты, полипропилфумараты, поликапролактоны, полиамиды, полиацетали, полиэферы, сложные полиэферы, поли(ортоэферы), полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полицианоакрилаты, полимочевины, полистиролы, полиамины, полилизин, поли(этиленимин), поли(сериновый сложный эфир), поли(L-лактид-со-L-лизин), поли(4-гидрокси-L-пролиновый эфир) или их комбинации.

[00418] В одном варианте реализации терапевтическая наночастица включает диблок-сополимер. В одном варианте реализации диблок-сополимер может содержать ПЭГ в сочетании с полимером, таким как, без ограничений, полиэтилены, поликарбонаты, полиангидриды, полигидроксикислоты, полипропилфумараты, поликапролактоны, полиамиды, полиацетали, полиэферы, сложные полиэферы, поли(ортоэферы), полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полицианоакрилаты, полимочевины, полистиролы, полиамины, полилизин, поли(этиленмин), поли(сериновый сложный эфир), поли(L-лактид-со-L-лизин), поли(4-гидрокси-L-пролиновый сложный эфир) или их комбинации.

[00419] В качестве неограничивающего примера терапевтическая наночастица содержит ПМГК-ПЭГ блок-сополимер (см. Публикацию США № US 20120004293 и патент США №8236330, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В другом неограничивающем примере терапевтическая наночастица представляет собой маскирующую наночастицу, содержащую диблок-сополимер ПЭГ и ПМК или ПЭГ и ПМГК (см. патент США №8246968; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00420] В одном варианте реализации терапевтическая наночастица может содержать поли-блок-сополимер (см, например, патенты США №№8263665 и 8287910; каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00421] В одном варианте реализации блок-сополимеры, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены в полиионный комплекс, содержащий неполимерную мицеллу и блок-сополимер. (См., например, Публикацию США №20120076836; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00422] В одном варианте реализации терапевтическая наночастица может содержать по меньшей мере один акриловый полимер. Акриловые полимеры включают, без ограничений, сополимеры акриловой кислоты, метакриловой кислоты, акриловой кислоты и метакриловой кислоты, метилметакрилата метилсодержащие сополимеры, этоксиэтилметакрилаты, цианоэтилметакрилат, аминоалкилметакрилатный сополимер, поли(акриловую кислоту), поли(метакриловую кислоту), полицианоакрилаты и их комбинации.

[00423] В одном варианте реализации терапевтические наночастицы могут содержать по меньшей мере один катионный полимер, раскрытый в настоящем документе и/или известный из уровня техники.

[00424] В одном варианте реализации терапевтические наночастицы могут содержать по меньшей мере один аминоксодержащий полимер, например, без ограничений, полилизин, полиэтиленмин, поли(аминоамин)дендримеры, поли(бета-амино сложные

эфир) (см., например, патент США №8287849; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки) и их комбинации.

5 [00425] В одном варианте реализации терапевтические наночастицы могут содержать по меньшей мере один разлагаемый сложный полиэфир, который может содержать поликатионные боковые цепи. Разлагаемые сложные полиэфиры включают, без ограничений, поли(сериновый сложный эфир), поли(L-лактид-со-L-лизин), поли(4-гидрокси-L-пролиновый сложный эфир) и их комбинации. В другом варианте реализации разлагаемые сложные полиэфиры могут включать конъюгацию с ПЭГ с образованием пегилированного полимера.

10 [00426] В другом варианте реализации терапевтическая наночастица может включать конъюгацию по меньшей мере с одним нацеливающим лигандом. Нацеливающий лиганд может представлять собой любой лиганд, известный из уровня техники, такой как, без ограничений, моноклональное антитело (Kirpotin et al, Cancer Res. 2006 66:6732-6740; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

15 [00427] В одном варианте реализации терапевтическая наночастица может быть введена в водный раствор, который может применяться для целенаправленного воздействия на рак (см. Международную публикацию WO 2011084513 и Публикацию США № US 20110294717, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

20 [00428] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК могут быть инкапсулированы в, соединены с и/или ассоциированы с синтетическими наноносителями. Синтетические наноносители включают, без ограничений, раскрытые в Международных публикациях WO 2010005740, WO 2010030763, WO 201213501, WO 2012149252, WO 2012149255, WO 2012149259, WO 25 2012149265, WO 2012149268, WO 2012149282, WO 2012149301, WO 2012149393, WO 2012149405, WO 2012149411 и WO 2012149454 и Публикации США №№ US 20110262491, US 20100104645, US 20100087337 и US 20120244222, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Синтетические наноносители могут быть созданы с применением способов, известных из уровня техники и/или 30 раскрытых в настоящем документе. В качестве неограничивающего примера, синтетические наноносители могут быть получены способами, раскрытыми в Международных публикациях WO 2010005740, WO 2010030763 и WO 201213501 и Публикациях США №№ US 20110262491, US 20100104645, US 20100087337 и US 20120244222, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме 35 посредством ссылки. В другом варианте реализации препараты синтетических наноносителей могут быть лиофилизированы способами, раскрытыми в Международной публикации WO 2011072218 и патенте США №8211473; каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00429] В одном варианте реализации синтетические наноносители могут содержать 40 реакционноспособные группы для высвобождения модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или мРНК, раскрытых в настоящем документе, (см. Международную публикацию WO 20120952552 и Публикацию США № US 20120171229, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

45 [00430] В одном варианте реализации синтетические наноносители могут содержать иммуностимулятор с целью усиления иммунного ответа, вызванного доставкой синтетического наноносителя. В качестве неограничивающего примера, синтетический наноноситель может содержать Th1 иммуностимулятор, который может усиливать

базирующийся на Th1 ответ иммунной системы (см. Международную публикацию WO 2010123569 и Публикацию США № US 20110223201, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

5 [00431] В одном варианте реализации синтетические наноносители могут быть созданы для направленного высвобождения. В одном варианте реализации синтетический наноноситель создан таким образом, чтобы высвободить модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или мРНК при конкретном значении pH и/или через желательный промежуток времени. В качестве неограничивающего примера, синтетическая наночастица может быть создана для
10 высвобождения модифицированных молекул мРНК и/или ммРНК через 24 часа и/или при pH 4,5 (см. Международные публикации № WO 2010138193 и WO 2010138194 и Публикации США №№ US 20110020388 и US 20110027217, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

15 [00432] В одном варианте реализации синтетические наноносители могут быть созданы для контролируемого и/или непрерывного высвобождения модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, раскрытых в настоящем документе,. В качестве неограничивающего примера, синтетические наноносители для непрерывного высвобождения могут быть созданы способами, известными из уровня техники, раскрытыми в настоящем документе и/или раскрытыми в Международной публикации
20 № WO 2010138192 и Публикации США №20100303850, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00433] В одном варианте реализации синтетический наноноситель может быть создан для применения в качестве вакцины. В одном варианте реализации синтетический наноноситель может инкапсулировать по меньшей мере одну модифицированную
25 молекулу нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, которая кодирует по меньшей мере один антиген. В качестве неограничивающего примера, синтетический наноноситель может содержать по меньшей мере один антиген и вспомогательное вещество для лекарственной формы вакцины (см. Международную публикацию № WO 2011150264 и Публикацию США № US 20110293723, каждая из которых включена в настоящий
30 документ в полном объеме посредством ссылки). В качестве другого неограничивающего примера, лекарственная форма вакцины может содержать по меньшей мере 2 синтетических наноносителя с одинаковыми или разными антигенами и вспомогательным веществом (см. Международную публикацию № WO 2011150249 и Публикацию США № US 20110293701, каждая из которых включена в настоящий
35 документ в полном объеме посредством ссылки). Лекарственная форма вакцины может быть выбрана с применением способов, раскрытых в настоящем документе, известных из уровня техники и/или раскрытых в Международной публикации № WO 2011150258 и Публикации США № US 20120027806, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

40 [00434] В одном варианте реализации синтетический наноноситель может содержать по меньшей мере одну модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, которая кодирует по меньшей мере один адъювант. В другом варианте реализации синтетический наноноситель может содержать по меньшей мере одну модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты и/или ммРНК и адъювант. В
45 качестве неограничивающего примера, синтетический наноноситель, содержащий адъювант, может быть создан способами, раскрытыми в Международной публикации № WO 2011150240 и Публикации США № US 20110293700, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00435] В одном варианте реализации синтетический наноноситель может инкапсулировать по меньшей мере одну модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты и/или мРНК, которая кодирует пептид, фрагмент или участок вируса. В качестве неограничивающего примера, синтетический наноноситель может содержать, без ограничений, наноносители, раскрытые в Международных публикациях № WO 2012024621, WO 201202629, WO 2012024632 и Публикациях США №№ US 20120064110, US 20120058153 и US 20120058154, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00436] В одном варианте реализации наночастица может быть оптимизирована для перорального введения. Наночастица может содержать по меньшей мере один катионный биополимер, например, без ограничений, хитозан или его производное. В качестве неограничивающего примера, наночастица может быть создана способами, раскрытыми в Публикации США №20120282343; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

Полимеры, биоразлагаемые наночастицы и наночастицы со структурой ядро/оболочка [00437] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК по изобретению могут быть введены в составы с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть использованы для доставки включают, без ограничений, препараты DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Пасадена, Калифорния) от MIRUS® Bio (Мэдисон, Висконсин) и Roche Madison (Мэдисон, Висконсин), полимерные препараты PHASERX™, такие как, без ограничений, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY™ (Сиэтл, Вашингтон), DMRI/ДОФЭ, полуксамер, адъювант VAXFECTIN® от Vical (Сан-Диего, Калифорния), хитозан, циклодекстрин от Calando Pharmaceuticals (Пасадена, Калифорния), дендримеры и полимеры поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (ПМГК), полимеры RONDEL™ (наночастицы для доставки иРНК/олигонуклеотида) (Arrowhead Research Corporation, Пасадена, Калифорния) и реагирующие на pH со-блок-полимеры, такие как, без ограничений, PHASERX™ (Сиэтл, Вашингтон).

[00438] Неограничивающий пример препарата хитозана включает ядро из положительно заряженного хитозана и наружную часть отрицательно заряженного субстрата (Публикация США №20120258176; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Хитозан включает, без ограничений, N-триметилхитозан, МОНО-N-карбоксиметилхитозан (КМХ), N-пальмитоилхитозан (НПХЗ), ЭДТА-хитозан, низкомолекулярный хитозан, производные хитозана или их комбинации.

[00439] В одном варианте реализации полимеры, используемые в данном изобретении, подвергаются обработке с целью снижения и/или подавления присоединения нежелательных субстанций, таких как, без ограничений, бактерии, к поверхности полимера. Полимер может быть обработан способами, известными и/или раскрытыми в уровне техники и/или раскрытыми в Международной публикации № WO 2012150467, включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00440] Неограничивающий пример препаратов ПМГК включает, без ограничений, инъекционный препарат депо ПМГК (например, ELIGARD®, который образуется при растворении ПМГК в 66% N-метил-2-пирролидоне (НМП), причем остальную часть составляют водный растворитель и лейпролид. После введения инъекцией, ПМГК и пептид лейпролида осаждаются в подкожном пространстве).

[00441] Многие из указанных подходов с использованием полимеров продемонстрировали свою эффективность с точки зрения доставки олигонуклеотидов in vivo в цитоплазму клетки (обзор приведен в deFougerolles Hum Gen Ther. 2008 19:125-

132; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Два подхода с использованием полимеров, которые дают робастную доставку нуклеиновых кислот *in vivo*, в данном случае малой интерферирующей РНК (миРНК), представляют собой динамические поликонъюгаты и наночастицы на основе циклодекстрина. В первом из указанных подходов для доставки используются динамические поликонъюгаты, и у мышей продемонстрирована эффективная доставка *in vivo* миРНК и молчащих мРНК с эндогенным нацеливанием на гепатоциты (Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104:12982-12887; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Данный конкретный подход представляет собой многокомпонентную полимерную систему, ключевые признаки которой включают мембрано-активный полимер, к которому посредством дисульфидной связи ковалентно присоединена нуклеиновая кислота, в данном случае миРНК, и где фрагменты ПЭГ (для маскировки заряда) и N-ацетилгалактозаминовые группы (для нацеливания на гепатоциты) присоединены посредством рН-чувствительных связей (Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104:12982-12887; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). При связывании с гепатоцитом и вхождении в эндосому, полимерный комплекс разъединяется в среде с низким значением рН, причем полимер принимает на себя положительный заряд, что приводит к выходу из эндосомы и высвобождению миРНК из полимера в цитоплазме. Показано, что посредством замены N-ацетилгалактозаминовой группы на маннозную, можно изменить нацеливание с гепатоцитов, экспрессирующих асиалогликопротеиновый рецептор, на синусоидальный эндотелий и клетки Купфера. Другой подход с использованием полимера включает использование трансферрин-нацеленных циклодекстрин-содержащих поликатионных наночастиц. Указанные наночастицы продемонстрировали нацеленный сайленсинг генного продукта EWS-FLI1 в клетках опухоли саркомы Юинга, экспрессирующих рецептор трансферрина (Hu-Lieskovan et al., Cancer Res, 2005 65:8984-8982; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), и миРНК, введенная в такие наночастицы, хорошо переносилась негуманоидными приматами (Heidel et al., Proc Natl Acad Sci USA 2007 104:5715-21; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Обе указанных стратегии доставки включают рациональные подходы с применением направленной доставки и механизмов выхода из эндосомы.

[00442] Полимерный препарат может позволять контролируемое или замедленное высвобождение модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК (например, после внутримышечной или подкожной инъекции). Модифицированный профиль высвобождения модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК может приводить, например, к трансляции кодируемого белка на протяжении пролонгированного периода времени. Полимерный препарат также может применяться для повышения стабильности модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК. Биоразлагаемые полимеры ранее применялись для защиты других нуклеиновых кислот, кроме мРНК, от разложения, и приводили к контролируемому высвобождению полезной нагрузки *in vivo* (Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104:12982-12887; Sullivan et al., Expert Opin Drug Deliv. 2010 7:1433-1446; Convertine et al., Biomacromolecules. 2010 Oct 1; Chu et al., Acc Chem Res. 2012 Jan 13; Manganiello et al., Biomaterials. 2012 33: 2301-2309; Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Singha et al., Nucleic Acid Ther. 2011 2:133-147; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; Schaffert and Wagner, Gene Ther. 2008 16:1131-1138; Chaturvedi et al., Expert Opin Drug Deliv. 2011 8:1455-1468; Davis, Mol Pharm. 2009 6:659-668; Davis, Nature 2010 464:1067-1070; каждая из которых

включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00443] В одном варианте реализации фармацевтические составы могут представлять собой препараты с контролируемым высвобождением. В дополнительном варианте реализации препараты с контролируемым высвобождением могут быть предназначены для подкожного введения. Препараты с контролируемым высвобождением могут содержать, без ограничений, микросферы ПМГК, этиленвинилацетат (ЭВА), поллоксамер, GELSITE® (Nanotherapeutics, Inc. Алачуа, Флорида), HYLENEX® (Halozyme Therapeutics, Сан-Диего, Калифорния), хирургические герметики, такие как полимеры фибриногена (Ethicon Inc. Корнелия, Джорджия), TISSELL® (Baxter International, Inc, Дирфилд, Иллинойс), герметики на основе ПЭГ и COSEAL® (Baxter International, Inc, Дирфилд, Иллинойс).

[00444] В качестве неограничивающего примера, модифицированная мРНК может быть введена в микросферы ПМГК путем получения микросфер ПМГК с регулируемой скоростью высвобождения (например, дни и недели) и инкапсуляции модифицированной мРНК в микросферы ПМГК, при сохранении целостности модифицированной мРНК в ходе процесса инкапсуляции. ЭВА представляют собой неразлагаемые в биологических системах, биосовместимые полимеры, которые широко применяются в доклинических исследованиях имплантов с контролируемым высвобождением (например, продукты с пролонгируемым высвобождением: глазной имплант с пилокарпином Ocusert при глаукоме или внутриматочное устройство Progestasert с контролируемым высвобождением прогестерона; системы трансдермальной доставки Testoderm, дурагезик и селегилин; катетеры). Поллоксамер F-407 NF представляет собой гидрофильный, неионный поверхностно-активный триблок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен-полиоксиэтилен, обладающий низкой вязкостью при температурах ниже 5°C и образующий плотный гель при температурах выше 15°C. Хирургические герметики на основе ПЭГ содержат два синтетических ПЭГ-компонента, смешиваемые в устройстве для доставки; они могут быть получены в течение 1 минуты, застывают в пределах 3 минут и реабсорбируются в пределах 30 дней. GELSITE® и природные полимеры способны образовывать гель *in situ* в месте введения. Показано, что они взаимодействуют с белковыми и пептидными терапевтическими средствами-кандидатами посредством ионного взаимодействия, с получением эффекта стабилизации.

[00445] Полимерные препараты также можно избирательно нацеливать посредством экспрессии различных лигандов, как проиллюстрировано на примере, без ограничений, фолата, трансферрина и N-ацетилгалактозамина (GalNAc) (Benoit et al., *Biomacromolecules*. 2011 12:2708-2714; Rozema et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 104:12982-12887; Davis, *Mol Pharm*. 2009 6:659-668; Davis, *Nature* 2010 464:1067-1070; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00446] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК по изобретению могут быть введены в составы вместе с или в пределах полимерного соединения. Полимер может включать по меньшей мере один полимер, например, без ограничений, полиэтилены, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(1-лизин) (ПЛЛ), пересаженный на ПЛЛ ПЭГ, катионный липополимер, биоразлагаемый катионный липополимер, полиэтиленимин (ПЭИ), поперечно-сшитые разветвленные поли(алкиленимины), полиаминные производные, модифицированный поллоксамер, биоразлагаемый полимер, эластичный биоразлагаемый полимер, биоразлагаемый блок-сополимер, биоразлагаемый статистический сополимер, биоразлагаемый полиэфирный сополимер, биоразлагаемый полиэфирный блок-сополимер, биоразлагаемый полиэфирный статистический блок-сополимер, поли-блок-сополимеры, линейный биоразлагаемый сополимер, поли[α -(4-

аминобутил)-L-гликолевую кислоту) (ПАГК), биоразлагаемые поперечно-сшитые катионные поли-блок-сополимеры, поликарбонаты, полиангидриды, полигидроксикислоты, полипропилфумараты, поликапролактоны, полиамиды, полиацетали, полиэферы, сложные полиэферы, поли(ортоэферы), полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полицианоакрилаты, полимочевины, полистиролы, полиамины, полилизин, поли(этиленмин), поли(сериновый сложный эфир), поли(L-лактид-со-L-лизин), поли(4-гидрокси-L-пролиновый сложный эфир), акриловые полимеры, аминоксодержащие полимеры, полимеры декстрана, полимеры производных декстрана или их комбинации.

[00447] В качестве неограничивающего примера, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению могут быть введены в состав с полимерным соединением ПЭГ, пересаженного на ПЛЛ, как раскрыто в патенте США №6177274; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Состав может применяться для трансфекции клеток *in vitro* или для доставки *in vivo* модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и ммРНК. В другом примере, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и ммРНК могут быть суспендированы в растворе или среде с катионным полимером, в сухом фармацевтическом составе или в растворе, который может быть высушен, как раскрыто в Публикациях США №№20090042829 и 20090042825; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00448] В качестве другого неограничивающего примера, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению могут быть введены в состав с ПМГК-ПЭГ блок-сополимером (см. Публикацию США № US 20120004293 и патент США №8236330, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки) или ПМГК-ПЭГ-ПМГК блок-сополимерами (см. патент США №6004573, включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В качестве неограничивающего примера, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению могут быть введены в состав с диблок-сополимером ПЭГ и ПМК или ПЭГ и ПМГК (см. патент США №8246968; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00449] Полиаминное производное может использоваться для доставки молекул нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, или для лечения и/или профилактики заболевания, или для введения в имплантируемое или вводимое инъекцией устройство (Публикация США №20100260817; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В качестве неограничивающего примера, фармацевтический состав может содержать модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и ммРНК, а также полиаминные производные, раскрытые в Публикации США №20100260817 (содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки). В качестве неограничивающего примера, модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК по настоящему изобретению могут быть доставлены с использованием полиамидного полимера, например, без ограничений, полимера, содержащего 1,3-биполярное добавление полимера, полученного сочетанием углеводов-диазидного мономера с диалкиновым фрагментом, содержащим олигоакрилаты (патент США №8236280; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00450] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и/или ммРНК по изобретению могут быть введены в состав по меньшей мере с одним акриловым полимером. Акриловые полимеры включают, без ограничений, акриловую кислоту,

метакриловую кислоту, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, метилметакрилатные сополимеры, этоксиэтилметакрилаты, цианоэтилметакрилат, аминоалкилметакрилатный сополимер, поли(акриловую кислоту), поли(метакриловую кислоту), полицианоакрилаты и их комбинации.

5 [00451] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или мРНК по настоящему изобретению могут быть введены в состав по
меньшей мере с одним полимером и/или его производным, раскрытым в Международных
публикациях № WO 2011115862, WO 2012082574 и WO 2012068187 и Публикации США
10 №20120283427, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме
посредством ссылки. В другом варианте реализации модифицированные молекулы
нуклеиновой кислоты и/или мРНК по настоящему изобретению могут быть введены
в состав с полимером формулы Z, как раскрыто в WO 2011115862; включена в настоящий
документ в полном объеме посредством ссылки. В еще одном варианте реализации
15 модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК могут быть введены
в состав с полимером формулы Z, Z' или Z" как раскрыто в Международных публикациях
WO 2012082574 или WO 2012068187, каждая из которых включена в настоящий документ
в полном объеме посредством ссылки. Полимеры, введенные в состав с
модифицированными нуклеиновыми кислотами и/или модифицированными мРНК по
20 настоящему изобретению, могут быть синтезированы способами, раскрытыми в
Международных публикациях № WO 2012082574 или WO 2012068187, каждая из которых
включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00452] Составы на основе модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или
мРНК по изобретению могут содержать по меньшей мере один аминоксодержащий
полимер, например, без ограничений, полилизин, полиэтиленмин, поли(амидоамин)
25 дендримеры или их комбинации.

[00453] Например, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или мРНК
по изобретению могут быть введены в фармацевтическое соединение, содержащее поли
(алкиленимин), биоразлагаемый катионный липополимер, биоразлагаемый блок-
сополимер, биоразлагаемый полимер или биоразлагаемый статистический сополимер,
30 биоразлагаемый полиэфирный блок-сополимер, биоразлагаемый полиэфирный полимер,
биоразлагаемый полиэфирный статистический сополимер, линейный биоразлагаемый
сополимер, ПАГК, биоразлагаемый поперечно-сшитый катионный поли-блок-сополимер
или их комбинации. Биоразлагаемый катионный липополимер может быть получен
способами, известными из уровня техники и/или раскрытыми в патенте США №6696038,
35 Заявках США №№20030073619 и 20040142474, каждая из которых включена в настоящий
документ в полном объеме посредством ссылки. Поли(алкиленимин) может быть
получен с применением способов, известных из уровня техники и/или раскрытых в
Публикации США №20100004315, включена в настоящий документ в полном объеме
посредством ссылки. Биоразлагаемый полимер, биоразлагаемый блок-сополимер,
40 биоразлагаемый статистический сополимер, биоразлагаемый полиэфирный блок-
сополимер, биоразлагаемый полиэфирный полимер или биоразлагаемый полиэфирный
статистический сополимер может быть получен с применением способов, известных
из уровня техники и/или раскрытых в патентах США №№6517869 и 6267987, содержание
каждого из которых включено в настоящий документ в полном объеме посредством
45 ссылки. Линейный биоразлагаемый сополимер может быть получен с применением
способов, известных из уровня техники и/или раскрытых в патенте США №6652886.
Полимер ПАГК может быть получен с применением способов, известных из уровня
техники и/или раскрытых в патенте США №6217912; включен в настоящий документ

в полном объеме посредством ссылки. Полимер ПАГК может быть сополимеризован с образованием сополимера или блок-сополимера с полимерами, такими как, без ограничений, поли-Ь-лизин, полиаргинин, полиорнитин, гистоны, авидин, протамины, полилактиды и поли(лактид-со-гликолиды). Биоразлагаемые поперечно-сшитые катионные поли-блок-сополимеры могут быть получены способами, известными из уровня техники и/или раскрытыми в патенте США №8057821 или Публикации США №2012009145, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Например, полиблок-сополимеры могут быть синтезированы с использованием блоков линейного полиэтиленimina (ЛПЭИ), конфигурация которых отличается от разветвленных полиэтилениминов. Затем состав или фармацевтический состав может быть получен способами, известными из уровня техники, раскрытыми в настоящем документе или раскрытыми в Публикации США №20100004315 или патентах США №№6267987 и 6217912, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00454] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК по изобретению могут быть введены в состав по меньшей мере с одним разлагаемым полиэфиром, который может содержать поликатионные боковые цепи. Разлагаемые полиэфиры включают, без ограничений, поли(серинный сложный эфир), поли(L-лактид-со-L-лизин), поли(4-гидрокси-L-пролиновый сложный эфир) и их комбинации. В другом варианте реализации разлагаемые полиэфиры могут включать конъюгацию с ПЭГ с образованием пегилированного полимера.

[00455] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК по изобретению могут быть введены в состав по меньшей мере с одним полиэфиром, способным к образованию поперечно-сшитых связей. Полиэфиры, способные к образованию поперечно-сшитых связей, включают известные из уровня техники и раскрытые в Публикации США №20120269761, включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00456] В одном варианте реализации полимеры, раскрытые в настоящем документе, могут быть конъюгированы с липид-концевым ПЭГ. В качестве неограничивающего примера, ПМГК может быть конъюгирован с липид-концевым ПЭГ с образованием ПМГК-ДСФЭ-ПЭГ. В качестве другого неограничивающего примера, конъюгаты ПЭГ для использования в данном изобретении представляют собой раскрытые в Международной публикации WO 2008103276; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Полимеры могут быть конъюгированы с использованием конъюгата лиганда, например, без ограничений, конъюгатов, раскрытых в патенте США №8273363; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00457] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть конъюгированы с другим соединением. Неограничивающие примеры конъюгатов раскрыты в патентах США №№7964578 и 7833992, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В другом варианте реализации модифицированные РНК по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с конъюгатами формул 1-122, раскрытыми в патентах США №№7964578 и 7833992, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Модифицированные РНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть конъюгированы с металлом, таким как, без ограничений, золото (см., например, Giljohann et al. Journ. Amer. Chem. Soc. 2009 131(6):2072-2073; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В другом варианте реализации модифицированные молекулы

нуклеиновой кислоты и/или мРНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть конъюгированы и/или инкапсулированы в наночастицы золота. (Международная публикация № WO 201216269 и Публикация США №20120302940; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

5 [00458] Как раскрыто в Публикации США №20100004313, которая включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки, состав для доставки гена может содержать нуклеотидную последовательность и полоксамер. Например, модифицированная нуклеиновая кислота и мРНК по настоящему изобретению могут использоваться в составе для доставки гена, содержащем полоксамер, как раскрыто в
10 Публикации США №20100004313.

[00459] В одном варианте реализации полимерный препарат по настоящему изобретению может быть стабилизирован посредством контакта полимерного препарата, который может содержать катионный носитель, с катионным
15 липополимером, который может быть ковалентно связан с холестерином и группами полиэтиленгликоля. Полимерный препарат может быть приведен в контакт с катионным липополимером с применением способов, раскрытых в Публикации США №20090042829; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Катионный носитель может включать, без ограничений, полиэтиленимин, поли(триметиленимин), поли(тетраметиленимин), полипропиленимин, аминокликозид-полиамин, дидезокси-
20 диамино-*b*-циклодекстрин, спермин, спермидин, поли(2-диметиламино)этилметакрилат, поли(лизин), поли(гистидин), поли(аргинин), катионизированный желатин, дендримеры, хитозан, 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан (ДОТАП), N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония хлорид (ДОТМА), 1-[2-(олеилокси)этил]-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил)имидазолиния хлорид (ДОТИМ), 2,3-диолеилокси-N-[2
25 (сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия трифторацетат (ДОСПА), 3 β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерина гидрохлорид (ДК-холестерин HCl), дигептадециламидоглицил спермидин (ДОГС), N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония бромид (ДДАБ), N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтил аммония бромид (ДМПЭ), N,N-диолеил-N,N-диметиламмония хлорид ДОДАХ) и их
30 комбинации.

[00460] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и/или мРНК по изобретению могут быть введены в полиплекс одного или более полимеров (Публикации США №№20120237565 и 20120270927; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В одном варианте реализации
35 полиплекс содержит два или более катионных полимеров. Катионный полимер может содержать поли (этил енимин) (ПЭИ), например, линейный ПЭИ.

[00461] Кроме того, молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК по изобретению могут быть введены в наночастицу, с использованием комбинации полимеров, липидов и/или других биоразлагаемых агентов, таких как, без ограничений,
40 кальция фосфат. Компоненты могут быть введены в структуру ядро-оболочка, с гибридной и/или послойной архитектурой, чтобы создать возможность тонкой настройки наночастицы с целью повышения эффективности доставки модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты и мРНК (Wang et al., Nat Mater. 2006 5:791-796; Fuller et al., Biomaterials. 2008 29:1526-1532; DeKoker et al., Adv Drug Deliv Rev. 2011 63:748-761; Endres et al., Biomaterials. 2011 32:7721-7731; Su et al., Mol Pharm. 2011 Jun 6;8(3):774-87; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В качестве неограничивающего примера, наночастица может содержать несколько полимеров, например, без ограничений, гидрофильно-гидрофобные полимеры

(например, ПЭГ-ПМГК), гидрофобные полимеры (например, ПЭГ) и/или гидрофильные полимеры (Международная публикация № WO 20120225129; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

5 [00462] Продемонстрирована доставка модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и мРНК *in vivo* с помощью биоразлагаемых наночастиц кальция фосфата в сочетании с липидами и/или полимерами. В одном варианте реализации покрытая
липидом наночастица кальция фосфата, которая дополнительно может содержать
нацеливающий лиганд, такой как анисамид, может использоваться для доставки
модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты и мРНК по настоящему
10 изобретению. Например, для эффективной доставки мРНК в модели метастазов в
легкие мыши применяли покрытую липидом наночастицу кальция фосфата (Li et al., J
Contr Rel. 2010 142: 416-421; Li et al., J Contr Rel. 2012 158:108-114; Yang et al., Mol Ther.
2012 20:609-615; включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).
Указанная система доставки объединяет направленную наночастицу и компонент,
15 активизирующий выход из эндосомы, кальция фосфат, с целью повышения
эффективности доставки мРНК.

[00463] В одном варианте реализации кальция фосфат с ПЭГ-полианион блок-
сополимером может использоваться для доставки модифицированных молекул
нуклеиновой кислоты и мРНК (Kazikawa et al., J Contr Rel. 2004 97:345-356; Kazikawa
20 et al., J Contr Rel. 2006 111:368-370; включены в настоящий документ в полном объеме
посредством ссылки).

[00464] В одном варианте реализации полимер ПЭГ с переходящим зарядом (Pitella
et al., Biomaterials. 2011 32:3106-3114) может использоваться для образования
наночастицы с целью доставки модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и
25 мРНК по настоящему изобретению. Полимер ПЭГ с переходящим зарядом может
иметь преимущество перед ПЭГ-полианион блок-сополимером благодаря расщеплению
на поликатион при кислых значениях pH, что активизирует выход из эндосомы.

[00465] При использовании наночастиц со структурой ядро-оболочка дополнительно
акцентировался подход высокопроизводительного синтеза ядер из катионного
30 поперечно-сшитого наногеля и различных оболочек (Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci
USA. 2011 108:12996-13001). Комплексообразование, доставку и интернализацию
полимерных наночастиц можно точно контролировать, меняя химический состав
компонентов ядра и оболочки наночастицы. Например, наночастицы со структурой
ядро-оболочка могут эффективно доставлять мРНК в гепатоциты мыши после
35 ковалентного присоединения холестерина к наночастице.

[00466] В одном варианте реализации полое липидное ядро, содержащее
промежуточный слой ПМГК и внешний слой нейтрального липида, содержащего ПЭГ,
может использоваться для доставки модифицированных молекул нуклеиновой кислоты
и мРНК по настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера, у
40 мышей, несущих экспрессирующую люциферазу опухоль, было определено, что
гибридная наночастица липид-полимер-липид в значительной мере подавляет экспрессию
люциферазы, по сравнению с обычным липоплексом (Shi et al, Angew Chem Int Ed. 2011
50:7027-7031; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00467] В одном варианте реализации липидные наночастицы могут содержать ядро
45 из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящем
документе, и полимерную оболочку. Полимерная оболочка может состоять из любого
полимера, раскрытого в настоящем документе и известного из уровня техники. В
дополнительном варианте реализации полимерная оболочка может использоваться

для защиты модифицированных нуклеиновых кислот в ядре.

[00468] Наночастицы со структурой ядро-оболочка для использования с модифицированными молекулами нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению раскрыты и могут быть получены способами, раскрытыми в патенте США №8313777; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00469] В одном варианте реализации наночастицы со структурой ядро-оболочка могут содержать ядро из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящем документе, и полимерную оболочку. Полимерная оболочка может состоять из любого полимера, раскрытого в настоящем документе и известного из уровня техники. В дополнительном варианте реализации полимерная оболочка может использоваться для защиты молекул модифицированных нуклеиновых кислот в ядре.

Пептиды и белки

[00470] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК по изобретению могут быть введены в состав с пептидами и/или белками с целью увеличения степени трансфекции клеток модифицированными молекулами нуклеиновой кислоты или ммРНК. В одном варианте реализации пептиды, такие как, без ограничений, проникающие в клетку пептиды и белки, а также пептиды, которые позволяют внутриклеточную доставку, могут применяться для доставки фармацевтических составов. Неограничивающий пример пептида, проникающего в клетку, который может быть использован с фармацевтическими составами по настоящему изобретению, включает последовательность пептида, проникающего в клетку, соединенную с поликатионами, которые облегчают доставку во внутриклеточное пространство, например, полученный из ВИЧ пептид ТАТ, пенетратины, транспортаны или полученные из hCT пептиды, проникающие в клетку (см., например, Caron et al., Mol. Ther. 3(3):310-8 (2001); Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL, 2002); El-Andaloussi et al., Curr. Pharm. Des. 11(28):3597-611 (2003); и Deshayes et al., Cell. Mol. Life Sci. 62(16):1839-49 (2005), все из которых включены в данное описание посредством ссылки). Кроме того, рецептура составов может быть разработана таким образом, чтобы включать проникающий в клетку агент, например, липосомы, который повышает эффективность доставки составов во внутриклеточное пространство. Могут быть образованы комплексы молекул модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК по изобретению с пептидами и/или белками, например, без ограничений, пептидами и/или белками, производимыми Aileron Therapeutics (Кембридж, Массачусетс) и Permeon Biologies (Кембридж, Массачусетс), с целью обеспечения возможности внутриклеточной доставки (Cronican et al., ACS Chem. Biol. 2010 5:747-752; McNaughton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009 106:6111-6116; Sawyer, Chem Biol Drug Des. 2009 73: 3-6; Verdine and Hilinski, Methods Enzymol. 2012;503:3-33; все из которых включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00471] В одном варианте реализации проникающий в клетку полипептид может содержать первый домен и второй домен. Первый домен может содержать полипептид с излишним зарядом. Второй домен может содержать белок-партнер по связыванию. В настоящем документе «белок-партнер по связыванию» включает, без ограничений, антитела и их функциональные фрагменты, платформенные белки или пептиды. Проникающий в клетку полипептид дополнительно может содержать внутриклеточного партнера по связыванию к белку-партнеру по связыванию. Проникающий в клетку полипептид может быть способен к секреции из клетки, в которую введены модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК.

[00472] Составы, содержащие пептиды или белки, могут использоваться для

увеличения степени трансфекции клетки модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты или ммРНК, изменения биораспределения модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК (например, нацеливанием на конкретные виды тканей или клеток) и/или активизации трансляции кодируемого белка (см., например, 5 Международную публикацию № WO 2012110636; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

Клетки

[00473] Модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты и ммРНК по изобретению могут быть трансфицированы клетки *ex vivo*, которые в дальнейшем 10 пересаживают субъекту. В качестве неограничивающих примеров, фармацевтические составы могут содержать эритроциты для доставки модифицированной РНК в клетки печени и миелоидные клетки, виросомы для доставки модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и ммРНК в вирусоподобные частицы (ВПЧ) и подвергнутые электропорации клетки, такие как, без ограничений, производимые МАХСУТЕ® 15 (Гейтерсберг, Мэриленд) и ERYTECH® (Лион, Франция), для доставки модифицированной РНК. Задokumentированы примеры использования эритроцитов, вирусных частиц и подвергнутых электропорации клеток для доставки полезной нагрузки, кроме ммРНК (Godfrin et al., Expert Opin Biol Ther. 2012 12:127-133; Fang et al., Expert Opin Biol Ther. 2012 12:385-389; Hu et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2011 108:10980- 20 10985; Lund et al., Pharm Res. 2010 27:400-420; Huckriede et al., J Liposome Res. 2007;17:39-47; Cusi, Hum Vaccin. 2006 2:1-7; de Jonge et al., Gene Ther. 2006 13:400-411; все из которых включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК могут быть доставлены в синтетические ВПЧ, синтезированные способами, раскрытыми в Международной 25 публикации № WO 2011085231 и Публикации США №20110171248, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00474] Клеточные препараты модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и ммРНК по изобретению могут использоваться для обеспечения трансфекции клеток (например, в клеточном носителе), изменения биораспределения модифицированной 30 молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК (например, путем нацеливания клетки-носителя на конкретные виды тканей или клеток) и/или увеличения трансляции кодируемого белка.

Введение в клетки

[00475] Различные способы известны из уровня техники и пригодны для введения 35 нуклеиновой кислоты в клетку, в том числе опосредованные вирусами и невирусные технологии. Примеры типичных невирусных технологий включают, без ограничений, электропорацию, опосредованный кальция фосфатом перенос, нуклеофекцию, сонопорацию, термический шок, магнитофекцию, опосредованный липосомами перенос, микроинъекцию, опосредованный баллистической трансфекцией перенос (наночастицы), 40 опосредованный катионным полимером перенос (ДЭАЭ-декстран, полиэтиленимин, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и т.п.) или слияние клеток.

[00476] В технологии сонопорации или звуковой обработки клеток применяется звук (например, ультразвуковые частоты) для изменения проницаемости плазматической мембраны клетки. Методы сонопорации известны специалистам из уровня техники и 45 раскрыты, например, относительно бактерий в Патентной публикации США 20100196983, и относительно других видов клеток, например, в Патентной публикации США 20100009424, каждая из которых включена в данное описание в полном объеме посредством ссылки.

[00477] Технологии электропорации также хорошо известны из уровня техники. В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК могут быть доставлены методом электропорации, как раскрыто в Примере 8.

Гиалуронидаза

5 [00478] Локальная внутримышечная или подкожная инъекция модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК по изобретению может содержать гиалуронидазу, которая катализирует гидролиз гиалуронана. Катализируя гидролиз гиалуронана, составляющей интерстициального барьера, гиалуронидаза снижает вязкость гиалуронана, таким образом повышая проницаемость ткани (Frost, Expert
10 Opin. Drug Deliv. (2007) 4:427-440; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Полезным будет ускорение диспергирования и системного распределения кодируемых белков, вырабатываемых трансфицированными клетками. Альтернативно, гиалуронидаза может применяться для увеличения количества клеток, контактирующих с модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты или мРНК
15 по изобретению, введенной внутримышечно или подкожно.

Миметики наночастиц

[00479] Модифицированные молекулы нуклеиновых кислот и мРНК по изобретению могут быть инкапсулированы в и/или абсорбированы на миметике наночастицы. Миметик наночастицы может имитировать функцию доставки, свойственную
20 организмам или частицам, таким как, без ограничений, патогены, вирусы, бактерии, грибы, паразиты, прионы и клетки. В качестве неограничивающего примера модифицированная мРНК по изобретению может быть инкапсулирована в невирусную частицу, которая может имитировать функцию доставки вируса (см. Международную публикацию № WO 2012006376; включена в настоящий документ в полном объеме
25 посредством ссылки).

Нанотрубки

[00480] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК по изобретению могут быть присоединены или другим способом связаны по меньшей мере с одной нанотрубкой, такой как, без ограничений, розеткообразные нанотрубки,
30 розеткообразные нанотрубки, содержащие сдвоенные основания с линкером, углеродные нанотрубки и/или однослойные углеродные нанотрубки, Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК могут быть связаны с нанотрубками посредством таких сил как, без ограничений, стерические, ионные, ковалентные и/или другие силы.

[00481] В одном варианте реализации нанотрубка может высвобождать одну или
35 более модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК в клетках. Размер и/или структура поверхности по меньшей мере одной нанотрубки может быть изменена таким образом, чтобы направлять взаимодействие нанотрубки в организме и/или присоединение или связывание с модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты или мРНК, раскрытой в настоящем документе. В одном варианте реализации
40 связывающийся блок и/или функциональные группы, присоединенные к связывающемуся блоку по меньшей мере одной нанотрубки, могут быть изменены для регуляции размеров и/или свойств нанотрубки. В качестве неограничивающего примера, длина нанотрубок может варьировать, чтобы воспрепятствовать прохождению нанотрубок сквозь отверстия в стенках нормальных кровеносных сосудов, но все же быть достаточно
45 маленькой для прохождения сквозь более крупные отверстия в кровеносных сосудах опухоловой ткани.

[00482] В одном варианте реализации по меньшей мере одна нанотрубка может быть дополнительно покрыта соединениями, повышающими эффективность доставки, в том

числе, полимерами, такими как, без ограничений, полиэтиленгликоль. В другом варианте реализации по меньшей мере одна нанотрубка и/или модифицированная мРНК может быть смешана с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами и/или носителями для доставки.

5 [00483] В одном варианте реализации модифицированная мРНК присоединена и/или другим способом связана по меньшей мере с одной розеткообразной нанотрубкой. Розеткообразные нанотрубки могут быть получены способом, известным из уровня
10 техники и/или раскрытым в Международной публикации WO 2012094304; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. По меньшей мере одна модифицированная мРНК может быть присоединена и/или другим образом связана по
15 меньшей мере с одной розеткообразной нанотрубкой способом, раскрытым в Международной публикации WO 2012094304; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки, где розеткообразные нанотрубки или модули, их образующие, смешивают в водной среде по меньшей мере с одной модифицированной
20 мРНК в условиях, которые могут вызывать присоединение или другой вид связывания по меньшей мере одной модифицированной мРНК с розеткообразными нанотрубками.

[00484] В одном варианте реализации модифицированная молекула нуклеиновой кислоты или ммРНК может быть присоединена и/или иным образом связана по меньшей
25 мере с одной углеродной нанотрубкой. В качестве неограничивающего примера, модифицированная молекула нуклеиновой кислоты или ммРНК может быть связана с линкерным агентом, и связанный агент может быть присоединен к углеродной нанотрубке (см, например, патент США №8246995; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Углеродная нанотрубка может представлять собой однослойную нанотрубку (см., например, патент США №8246995; включен в
30 настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

Конъюгаты

[00485] Модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и ммРНК по изобретению включают конъюгаты, такие как модифицированная молекула нуклеиновой
35 кислоты или ммРНК, ковалентно связанная с носителем или нацеливающей группой, или содержащая два кодирующих участка, которые вместе дают слитый белок (например, несущий нацеливающую группу и терапевтический белок или пептид).

[00486] Конъюгаты по изобретению включают природное вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (САЧ), липопротеин низкой плотности (ЛПНП), липопротеин высокой плотности (ЛПВП) или глобулин); углевод (например,
40 декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту); или липид. Кроме того, лиганд может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, которая представляет собой полилизин (ПЛЛ), поли L-аспарагиновую кислоту, поли L-глутаминовую кислоту, сополимер стирол-малеиновой
45 кислоты ангидрид, поли(L-лактид-со-гликолированный)сополимер, сополимер дивиниловый эфир-малеиновый ангидрид, N-(2-гидроксипропил)метакриламидный сополимер (ГПМА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ЛВС), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленмин, полилизин (ПЛЛ), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, полиаминный пептидомиметик, полиаминный дендример, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный

пептид.

[00487] Характерные патенты США, в которых раскрыто получение полинуклеотидных конъюгатов, конкретно РНК, включают, без ограничений, патенты США №№4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 и 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00488] В одном варианте реализации конъюгат по настоящему изобретению может функционировать как носитель модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и мРНК по настоящему изобретению. Конъюгат может содержать катионный полимер, например, без ограничений, полиамин, полилизин, полиалкиленимин и полиэтиленимин, которые могут быть пересажены на поли(этиленгликоль). В качестве неограничивающего примера, конъюгат может быть сходным с полимерным конъюгатом, и способ синтеза полимерного конъюгата, раскрытый в патенте США №6586524, включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00489] Кроме того, конъюгаты могут содержать нацеливающие группы, например, нацеливающий на клетку или ткань агент, такой как, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, связывающееся с конкретным видом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-глюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин, пептид RGD (аргинилглициласпарагиновую кислоту), миметик пептида RGD или аптамер.

[00490] Нацеливающие группы могут быть белками, например, гликопротеинами, или пептидами, например, молекулами со специфичной аффинностью в отношении солиганда, или антителами, например, антителом, которое специфично связывается с конкретным видом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Кроме того, нацеливающие группы могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные молекулы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-глюкозамин поливалентная манноза, поливалентная фукоза или аптамеры. Лиганд может быть, например, липополисахаридом или активатором р38 MAP киназы (митоген-активируемой протеинкиназы).

[00491] Нацеливающая группа может быть любым лигандом, который способен к нацеливанию на конкретный рецептор. Примеры включают, без ограничений, фолат, GalNAc, галактозу, маннозу, маннозу-бР, аптамеры, рецептор интегриновых лигандов, рецептор хемокиновых лигандов, трансферрин, биотин, рецептор серотониновых лигандов, простатический специфический мембранный антиген (ПСМА), эндотелии, GСPII, соматостатин, лиганды ЛПНП и ЛПВП. В конкретных вариантах реализации нацеливающая группа представляет собой аптамер. Аптамер может быть

немодифицированным или содержать любую комбинацию модификаций, раскрытых в настоящем документе.

[00492] В одном варианте реализации фармацевтические составы по настоящему изобретению могут включать химические модификации, такие как, без ограничений, модификации, подобные циклическим нуклеиновым кислотам.

[00493] Характерные патенты США, в которых раскрыто получение циклической («замкнутой») нуклеиновой кислоты (ЦНК), такие как выданные Santaris, включают, без ограничений, следующие: патенты США №№6268490; 6670461; 6794499; 6998484; 7053207; 7084125; и 7399845, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00494] Характерные патенты США, в которых раскрыто получение соединений ПНК, включают, без ограничений, патенты США №№5539082; 5714331; и 5719262, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные указания касательно соединений ПНК могут быть найдены, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

[00495] Некоторые варианты реализации, очерченные в изобретении, включают модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК с фосфоротиоатными скелетами и олигонуклеозиды с модифицированными иным образом скелетами и, в частности, $-\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2\text{-}$ [известный как метилен (метилимико) или ММИ скелет], $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-}$ и $-\text{N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ [где природный фосфодиэфирный скелет представлен как $-\text{O-P(O)}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$] из процитированного выше патента США №5489677, и амидные скелеты из процитированного выше патента США №5602240. В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, очерченные в настоящем документе, содержат структуры морфолинового скелета из процитированного выше патента США №5034506.

[00496] Модификации в положении 2' также могут способствовать доставке.

Предпочтительно, модификации в положении 2' не относятся к кодирующей полипептид последовательности, т.е., расположены за пределами транслируемого участка.

Модификации в положении 2' могут быть расположены в 5' UTR, 3' UTR и/или хвостовом участке. Модификации в положении 2' могут включать одно из следующего в положении 2': H (т.е., 2'-дезоксид); F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкилом или $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ алкенилом и алкинилом. В качестве примера, пригодные модификации включают $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ и $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, где n и m равны от 1 до

приблизительно 10. В других вариантах реализации модифицированные нуклеиновые кислоты или ммРНК содержат одно из следующего в положении 2': $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂,

гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силлил, отщепляемую группу РНК, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств или группу для улучшения фармакодинамических свойств и другие заместители с подобными свойствами. В некоторых вариантах реализации модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЭ) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), т.е., алкокси-алкокси группу. Другим примером

модификации является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е., $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ группа, также известная как 2'-ДМАОЭ, как раскрыто в примерах настоящего документа ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известный из уровня техники как 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-ДМАЭОЭ), т.е., $2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2)_2$, также раскрытый в примерах настоящего документа ниже. Другие модификации включают 2'-метокси (2'- OCH_3), 2'-аминопропокси (2'- $OCH_2CH_2CH_2NH_2$) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях, конкретно в положении 3' сахара 3'-концевого нуклеотида или в 2'-5' соединенных дцРНК и положении 5' 5'-концевого нуклеотида. Кроме того, полинуклеотиды по изобретению могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты вместо пентофуранозильного сахара. Характерные патенты США, в которых раскрыто получение таких модифицированных сахарных структур включают, без ограничений, патенты США №№4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; и 5700920; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

[00497] В других вариантах реализации модифицированная молекула нуклеиновой кислоты или ммРНК ковалентно конъюгирована с проникающим в клетку полипептидом. Дополнительно, проникающий в клетку пептид может содержать сигнальную последовательность. Конъюгаты по изобретению могут быть сконструированы таким образом, чтобы обеспечить повышенную стабильность; повышенную степень трансфекции клеток; и/или измененное биораспределение (например, нацеливание на конкретные виды тканей или клеток).

Самособирающиеся наночастицы

Самособирающиеся наночастицы нуклеиновой кислоты

[00498] Самособирающимся наночастицам свойственен хорошо определенный размер, который можно точно контролировать, поскольку цепи нуклеиновой кислоты можно легко перепрограммировать. Например, оптимальный размер частицы нацеливающего на рак носителя для нанодоставки составляет 20-100 нм, поскольку диаметр свыше 20 нм позволяет избежать почечного клиренса и повышает эффективность доставки в некоторые опухоли благодаря повышенной проницаемости и эффекту удерживания. С использованием самособирающихся наночастиц нуклеиновой кислоты осуществляется точный контроль пространственной ориентации и плотности единой однородно по размеру и форме популяции нацеливающих на рак лигандов для более эффективной доставки. В качестве неограничивающего примера, были получены олигонуклеотидные наночастицы с использованием программируемых самособирающихся коротких фрагментов ДНК и терапевтических миРНК. Указанные наночастицы являются идентичными с молекулярной точки зрения, с контролируемым размером частиц, целевой локализацией лиганда и плотностью. Происходит самосборка фрагментов ДНК и миРНК в ходе одностадийной реакции с образованием тетраэдрических наночастиц ДНК/миРНК для направленной доставки *in vivo*. (Lee et al., Nature Nanotechnology 2012 7:389-393; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00499] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и ммРНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены в самособирающиеся наночастицы. В качестве неограничивающего примера, нуклеиновые кислоты могут использоваться для получения наночастиц, которые могут быть

использованы в системе доставки для модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или мРНК по настоящему изобретению (см., например, Международную публикацию WO 2012125987; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

5 [00500] В одном варианте реализации самособирающиеся наночастицы нуклеиновой кислоты могут содержать ядро из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК, раскрытых в настоящем документе, и полимерную оболочку. Полимерная оболочка может состоять из любого полимера, раскрытого в настоящем документе и известного из уровня техники. В дополнительном варианте реализации полимерная оболочка может использоваться для защиты модифицированных молекул нуклеиновой
10 кислоты и мРНК в ядре.

Самособирающиеся наночастицы на основе полимеров

[00501] Полимеры могут использоваться для формирования листов, которые самособираются в наночастицы. Указанные наночастицы могут использоваться для доставки модифицированных нуклеиновых кислот и мРНК по настоящему
15 изобретению. В одном варианте реализации указанные самособирающиеся наночастицы могут представлять собой микрогубки, образованные длинными полимерами шпилек РНК, которые формируются в кристаллические «гофрированные» листы перед самосборкой в микрогубки. Указанные микрогубки представляют собой плотно упакованные губкоподобные микрочастицы, которые могут функционировать как
20 эффективный носитель и обладать способностью доставлять груз в клетку. Диаметр микрогубок может составлять от 1 мкм до 300 нм. Микрогубки могут образовывать комплексы с другими агентами, известными из уровня техники, с образованием микрогубок большего размера. В качестве неограничивающего примера, микрогубка может образовывать комплекс с агентом, с образованием внешнего слоя, который
25 способствует захвату клеткой, такого как поликатионный полиэтиленмин (ПЭИ). Такой комплекс может образовывать частицу диаметром 250 нм, которая может оставаться стабильной при высоких температурах (150°C) (Grabow and Jaegar, Nature Materials 2012, 11:269-269; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Дополнительно, указанные микрогубки могут быть способны к проявлению
30 чрезвычайно высокой степени защиты от разложения рибонуклеазами.

[00502] В другом варианте реализации самособирающиеся наночастицы на основе полимера, такие как, без ограничений, микрогубки, могут быть полностью программируемыми наночастицами. Геометрию, размер и стехиометрию наночастиц можно точно контролировать для создания оптимальных наночастиц для доставки
35 груза, такого как, без ограничений, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и мРНК.

[00503] В одном варианте реализации наночастицы на основе полимера могут содержать ядро из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и мРНК, раскрытых в настоящем документе, и полимерную оболочку. Полимерная оболочка
40 может состоять из любого полимера, раскрытого в настоящем документе и известного из уровня техники. В дополнительном варианте реализации полимерная оболочка может использоваться для защиты модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и мРНК в ядре.

Неорганические наночастицы

45 [00504] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК по настоящему изобретению могут быть введены в неорганические наночастицы (патент США №8257745; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Неорганические наночастицы могут содержать, без ограничений, глиняные субстанции,

которые набухают в воде. В качестве неограничивающего примера, неорганическая наночастица может содержать синтетические смектитовые глины, которые получают из простых силикатов (см., например, патенты США №№5585108 и 8257745, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

5 [00505] В одном варианте реализации неорганические наночастицы могут содержать ядро из модифицированных нуклеиновых кислот, раскрытых в настоящем документе, и полимерную оболочку. Полимерная оболочка может состоять из любого полимера, раскрытого в настоящем документе и известного из уровня техники. В дополнительном варианте реализации полимерная оболочка может использоваться для защиты

10 модифицированных нуклеиновых кислот в ядре.

Полупроводниковые и металлические наночастицы

[00506] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК по настоящему изобретению могут быть введены в диспергируемые в воде наночастицы, содержащие полупроводниковый или металлический материал (Публикация США

15 №20120228565; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), или сформированные магнитные наночастицы (Публикации США №20120265001 и 20120283503; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Диспергируемые в воде наночастицы могут представлять собой гидрофобные наночастицы или гидрофильные наночастицы.

20 [00507] В одном варианте реализации полупроводниковые и/или металлические наночастицы могут содержать ядро из модифицированных нуклеиновых кислот, раскрытых в настоящем документе, и полимерную оболочку. Полимерная оболочка может состоять из любого полимера, раскрытого в настоящем документе и известного из уровня техники. В дополнительном варианте реализации полимерная оболочка

25 может использоваться для защиты модифицированных нуклеиновых кислот в ядре.

Гели и гидрогели

[00508] В одном варианте реализации модифицированная мРНК, раскрытая в настоящем документе, может быть инкапсулирована в любой гидрогель, известный из уровня техники, который может образовывать гель при инъекционном введении

30 субъекту. Гидрогели представляют собой сеть полимерных цепей, которые являются гидрофильными и иногда принимают форму коллоидного геля, если дисперсионная среда является водой. Гидрогели представляют собой природные или синтетические полимеры с высокими абсорбирующими свойствами (они могут содержать свыше 99% воды). Кроме того, гидрогелям свойственна степень гибкости, в высокой степени

35 сходная с природной тканью, благодаря значительному содержанию воды. Гидрогель, раскрытый в настоящем документе, может использоваться для инкапсуляции липидных наночастиц, которые являются биосовместимыми, биоразлагаемыми и/или пористыми.

[00509] В качестве неограничивающего примера, гидрогель может представлять собой аптамер-функционализированный гидрогель. Аптамер-функционализированный

40 гидрогель может быть запрограммирован на высвобождение одной или более модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или мРНК с применением гибридизации нуклеиновой кислоты. (Battig et al., J. Am. Chem. Society. 2012 134:12410-12413; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00510] В качестве другого неограничивающего примера, гидрогель может принимать

45 форму перевернутого опала. Опаловые гидрогели демонстрируют более высокие соотношения набухания, и их кинетика набухания также на порядок быстрее. Способы получения опаловых гидрогелей и описание опаловых гидрогелей раскрыты в Международной публикации № WO 2012148684; включена в настоящий документ в

полном объеме посредством ссылки.

[00511] В качестве другого неограничивающего примера, гидрогель может представлять собой антибактериальный гидрогель. Антибактериальный гидрогель может содержать фармацевтически приемлемую соль или органический материал, например, без ограничений, соль серебра фармацевтической категории и/или медицинской категории и гель или экстракт алоэ вера. (Международная публикация № WO 2012151438; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00512] В одном варианте реализации модифицированная мРНК может быть инкапсулирована в липидную наночастицу, и далее липидная наночастица может быть инкапсулирована в гидрогель.

[00513] В одном варианте реализации модифицированная мРНК, раскрытая в настоящем документе, может быть инкапсулирована в любой гель, известный из уровня техники. В качестве неограничивающего примера, гель может представлять собой инъекционный гель фторурацила или инъекционный гель фторурацила, содержащий химическое соединение и/или лекарственное средство, известное из уровня техники. В качестве другого примера, модифицированная мРНК может быть инкапсулирована в гель фторурацила, содержащий эпинефрин (см., например, Smith et al. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1999 44(4):267-274; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00514] В одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть инкапсулированы в фибриновый гель, фибриновый гидрогель или фибриновый клей. В другом варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК могут быть введены в липидную наночастицу или быстро элиминирующуюся липидную наночастицу до инкапсуляции в фибриновый гель, фибриновый гидрогель или фибриновый клей. В еще одном варианте реализации модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК могут быть введены в липоплекс перед инкапсуляцией в фибриновый гель, гидрогель или фибриновый клей. Фибриновые гель, гидрогели и клеи содержат два компонента, раствор фибриногена и раствор тромбина, богатый кальцием (смю, например, Spicer and Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148:49-55; Kidd et al. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Концентрация компонентов фибринового геля, гидрогеля и/или клея может быть изменена с целью модификации характеристик, размера ячеек сети и/или параметров разложения геля, гидрогеля и/или клея, таких как, без ограничений, модификация параметров высвобождения фибринового геля, гидрогеля и/или клея (см., например, Spicer and Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148:49-55; Kidd et al. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas et al. Tissue Engineering 2008. 14:119-128; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Данный признак может быть предпочтительным в случае применения для доставки модифицированной мРНК, раскрытой в настоящем документе (см., например, Kidd et al. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas et al. Tissue Engineering 2008. 14:119-128; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

Катионы и анионы

[00515] Препараты модифицированных молекул нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе, могут содержать катионы или анионы. В одном варианте реализации составы содержат катионы металлов, такие как, без ограничений, Zn²⁺,

Ca²⁺, Cu²⁺, Mg⁺ и их комбинации. В качестве неограничивающего примера, препараты могут содержать полимеры и модифицированную мРНК в комплексе с катионом металла (см., например, патенты США №№6265389 и 6555525, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

5 Формованные наночастицы и микрочастицы

[00516] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и/или ммРНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены в наночастицы и/или микрочастицы. Указанные наночастицы и/или микрочастицы могут быть сформованы в формы любого размера и химической природы. В качестве примера, наночастицы и/или микрочастицы
10 получают с использованием технологии PRINT® от LIQUIDA TECHNOLOGIES® (Моррисвилл, Северная Каролина) (см., например, Международную публикацию № WO 2007024323; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00517] В одном варианте реализации формованные наночастицы могут содержать ядро из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или ммРНК, раскрытых
15 в настоящем документе, и полимерную оболочку. Полимерная оболочка может состоять из любого полимера, раскрытого в настоящем документе и известного из уровня техники. В дополнительном варианте реализации полимерная оболочка может использоваться для защиты модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или ммРНК в ядре.

20 Нанокорпуса и нанолипосомы

[00518] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и/или ммРНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены в нанокорпуса и нанолипосомы, производимые Keystone Nano (Колледж Штата, Пенсильвания). Нанокорпуса получают из соединений, которые от природы найдены в организме, в том числе, кальция, фосфата,
25 дополнительно они могут содержать небольшое количество силикатов. Размер нанокорпусов может варьировать от 5 до 50 нм, и их можно использовать для доставки гидрофильных и гидрофобных соединений, таких как, без ограничений, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК.

[00519] Нанолипосомы получают из липидов, например, без ограничений, липидов,
30 которые от природы встречаются в организме. Размер нанолипосом может варьировать в интервале 60-80 нм, и их можно применять для доставки гидрофильных и гидрофобных соединений, таких как, без ограничений, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и/или ммРНК. В одном из аспектов, модифицированные нуклеиновые кислоты, раскрытые в настоящем документе, вводят в нанолипосому, например, без ограничений,
35 керамидные нанолипосомы.

 Вспомогательные вещества

[00520] Фармацевтические препараты могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, которое в настоящем документе включает, без ограничений, любой и все растворители, дисперсионные среды,
40 разбавители или другие жидкие носители, диспергирующие или суспендирующие агенты, поверхностно-активные агенты, агенты для поддержания изотоничности, загустители или эмульгаторы, консерванты, твердые наполнители, смазывающие вещества и т.п., в соответствии с конкретной желательной лекарственной формой. Различные вспомогательные вещества для создания фармацевтических составов и способы
45 получения состава известны из уровня техники (см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A.R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Применение традиционной среды вспомогательного вещества может находиться в пределах

настоящего документа, за исключением тех случаев, когда любая традиционная среда вспомогательного вещества может быть несовместима с субстанцией или ее производными, например, вызывать любой нежелательный биологический эффект или иным способом оказывать вредное воздействие при взаимодействии с любым другим компонентом(ами) фармацевтического состава.

[00521] В некоторых вариантах реализации чистота фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества может составлять по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%. В некоторых вариантах реализации вспомогательное вещество может быть зарегистрировано для применения у человека и в ветеринарии. В некоторых вариантах реализации вспомогательное вещество может быть одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов. В некоторых вариантах реализации вспомогательное вещество может быть фармацевтической категории. В некоторых вариантах реализации вспомогательное вещество может соответствовать стандартам Фармакопеи США (Фарм. США), Европейской Фармакопеи (ЕФ), Британской Фармакопеи и/или Международной Фармакопеи.

[00522] Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, применяемые в производстве фармацевтических составов включают, без ограничений, инертные разбавители, диспергирующие и/или гранулирующие агенты, поверхностно-активные агенты и/или эмульгаторы, дезинтегранты, связующие агенты, консерванты, буферизующие агенты, смазывающие агенты и/или масла. Такие вспомогательные вещества необязательно могут входить в фармацевтические препараты. Дополнительно, состав может содержать вспомогательные вещества, такие как масло какао и суппозиторные воски, красители агенты, покрывающие агенты, подсластители, вкусовые добавки и/или ароматизаторы.

[00523] В качестве примера, разбавители включают, без ограничений, кальция карбонат, натрия карбонат, кальция фосфат, дикальция фосфат, кальция сульфат, кальция гидрофосфат, натрия фосфат, лактозу, сахарозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, сорбит, инозитол, натрия хлорид, сухой крахмал, кукурузный крахмал, порошковый сахар и т.д. и/или их комбинации.

[00524] В качестве примера, гранулирующие и/или диспергирующие агенты включают, без ограничений, картофельный крахмал, кукурузный крахмал, крахмал тапиоки, натрий крахмал гликолят, глину, альгиновую кислоту, гуаровую камедь, мякоть цитрусовых, агар, бентонит, целлюлозу и продукты обработки древесины, натуральную губку, катионообменные смолы, кальция карбонат, силикаты, натрия карбонат, поперечно-сшитый поли(винил-пирролидон) (кросповидон), натрий карбоксиметилкрахмал (натрий крахмал гликолят), карбоксиметилцеллюлозу, поперечно-сшитую натрий карбоксиметилцеллюлозу (кроскармелозу), метилцеллюлозу, прежелатинизированный крахмал (крахмал 1500), микрокристаллический крахмал, нерастворимый в воде крахмал, кальций карбоксиметилцеллюлозу, магния алюминия силикат (VEEGUM®), натрия лаурилсульфат, четвертичные соединения аммония и т.д. и/или их комбинации.

[00525] В качестве примера, поверхностно-активные агенты и/или эмульгаторы включают, без ограничений, природные эмульгаторы (например, акация, агар, альгиновая кислота, натрия альгинат, трагакант, карраген, холестерин, ксантан, пектин, желатин, яичный желток, казеин, ланолин, холестерин, воск и лецитин), коллоидные глины (например, бентонит [алюминия кремния силикат] и VEEGUM® [магния алюминия силикат]), длинноцепочечные производные аминокислот, высокомолекулярные спирты

(например, стеариловый спирт, цетиловый спирт, олеиловый спирт, триацетинмоноостеарат, этиленгликоль дистеарат, глицерилмоноостеарат и пропиленгликоль моноостеарат, поливиниловый спирт), карбомеры (например, карбоксиполиметилен, полиакриловая кислота, полимер акриловой кислоты и карбоксивиниловый полимер), каррагенан, производные целлюлозы (например, натрий карбоксиметилцеллюлоза, порошкообразная целлюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилцеллюлоза), жирнокислотные эфиры сорбитана (например, полиоксиэтиленсорбитан монолаурат [TWEEN® 20], полиоксиэтиленсорбитан [TWEEN® 60], полиоксиэтиленсорбитан моноолеат [TWEEN® 80], сорбитан монопальмитат [SPAN® 40], сорбитан моноостеарат [SPAN® 60], сорбитан тристеарат [SPAN® 65], глицерилмоноолеат, сорбитан моноолеат [SPAN® 80]), эфиры полиоксиэтилена (например, полиоксиэтилена моноостеарат [MYRJ® 45], полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло, полиэтоксифирированное касторовое масло, полиоксиметиленстеарат и SOLUTOL®), жирнокислотные эфиры сахарозы, жирнокислотные эфиры полиэтиленгликоля (например, CREMOPHOR®), эфиры полиоксиэтилена, (например, лауриловый эфир полиоксиэтилена [BR1J® 30]), поли(винил-пирролидон), диэтиленгликоль монолаурат, триэтанолламин олеат, натрия олеат, калия олеат, этилолеат, олеиновую кислоту, этиллаурат, натрия лаурилсульфат, PLUORINC® F 68, POLOXAMER® 188, цетримония бромид, цетилпиридиния хлорид, бензалкония хлорид, докузат натрия и т.д. и/или их комбинации.

[00526] В качестве примера, связующие агенты включают, без ограничений, крахмал (например, кукурузный крахмал и крахмальную пасту); желатин; сахара (например, сахарозу, глюкозу, декстрозу, декстрин, патоку, лактозу, лактитол, маннит); природные и синтетические камеди (например, акацию, натрия альгинат, экстракт ирландского моха, камедь панвара (panwar), камедь гхатти, гуммиарабик, карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, целлюлозы ацетат, поли(винилпирролидон), магния алюминия силикат (VEEGUM®) и арабогалактан лиственницы); альгинаты; полиэтиленоксид; полиэтиленгликоль; неорганические соли кальция; кремниевую кислоту; полиметакрилаты; воски; воду; спирт; и т.д.; и их комбинации.

[00527] В качестве примера, консерванты могут включать, без ограничений, антиоксиданты, хелатные агенты, противомикробные консерванты, противогрибковые консерванты, спиртовые консерванты, кислотные консерванты и/или другие консерванты. В качестве примера, антиоксиданты включают, без ограничений, альфа-токоферол, аскорбиновую кислоту, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, монотиоглицерин, калия метабисульфит, пропионовую кислоту, пропилгаллат, натрия аскорбат, натрия бисульфит, натрия метабисульфит и/или натрия сульфит. В качестве примера, хелатные агенты включают этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТК), лимонной кислоты моногидрат, динатрия эдетат, дикалия эдетат, этилендиаминтетрауксусную кислоту, фумаровую кислоту, яблочную кислоту, фосфорную кислоту, натрия эдетат, винную кислоту и/или тринатрия эдетат. В качестве примера, противомикробные консерванты включают, без ограничений, бензалкония хлорид, бензэтония хлорид, бензиловый спирт, бронопол, цетримид, цетилпиридиния хлорид, хлоргексидин, хлорбутанол, хлоркрезол, хлорксиленол, крезол, этиловый спирт, глицерин, гексетидин, имидмочевину, фенол, феноксиэтанол, фенилэтиловый спирт, фенилртути нитрат, пропиленгликоль и/или тимеросал. В качестве примера, противогрибковые консерванты включают, без

ограничений, бутилпарабен, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бензойную кислоту, гидроксibenзойную кислоту, калия бензоат, калия сорбат, натрия бензоат, натрия пропионат и/или сорбиновую кислоту. В качестве примера, спиртовые консерванты включают, без ограничений, этанол, полиэтиленгликоль, фенол, фенольные соединения, бисфенол, хлорбутанол, гидроксibenзоат и/или фенилэтиловый спирт. В качестве примера, кислотные консерванты включают, без ограничений, витамин А, витамин С, витамин Е, бета-каротин, лимонную кислоту, уксусную кислоту, дегидроуксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, сорбиновую кислоту и/или фитиновую кислоту. Другие консерванты включают, без ограничений, токоферол, токоферола ацетат, детероксим мезилат, цетримид, бутилированный гидроксianизол (БГА), бутилированный гидрокситолуол (БГТ), этилендиамин, натрия лаурилсульфат (НЛС), натрия лаурилэфирсульфат (НЛЭС), натрия бисульфит, натрия метабисульфит, калия сульфит, калия метабисульфит, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, метилпарабен, GERMALL® 115, GERMABEN® II, NEOLONE™, KATHON™ и/или EUXYL®.

[00528] В качестве примера, буферизующие агенты включают, без ограничений, цитратные буферные растворы, ацетатные буферные растворы, фосфатные буферные растворы, аммония хлорид, кальция карбонат, кальция хлорид, кальция цитрат, кальция глюбионат, кальция глюцептат, кальция глюконат, d-глюконовую кислоту, кальция глицерофосфат, кальция лактат, пропановую кислоту, кальция леулинат, пентановую кислоту, двухосновный кальция фосфат, фосфорную кислоту, трехосновный кальция фосфат, кальция гидрофосфат, калия ацетат, калия хлорид, калия глюконат, калиевые смеси, двухосновный калия фосфат, одноосновный калия фосфат, смеси калия фосфата, натрия ацетат, натрия бикарбонат, натрия хлорид, натрия цитрат, натрия лактат, двухосновный натрия фосфат, одноосновный натрия фосфат, смеси натрия фосфата, трометамин, магния гидроксид, алюминия гидроксид, альгиновую кислоту, апирогенную воду, изотонический раствор соли, раствор Рингера, этиловый спирт и т.д. и/или их комбинации.

[00529] В качестве примера, смазывающие агенты включают, без ограничений, магния стеарат, кальция стеарат, стеариновую кислоту, кремния диоксид, тальк, мальт, глицерилбегенат, гидрогенизированные растительные масла, полиэтиленгликоль, натрия бензоат, натрия ацетат, натрия хлорид, лейцин, магния лаурилсульфат, натрия лаурилсульфат и т.д. и их комбинации.

[00530] В качестве примера, масла включают, без ограничений, миндальное, масло абрикосовых косточек, авокадо, бабассу, бергамота, семян черной смородины, бораго, можжевельника, ромашки, канолы, тмина, карнаубы, касторовое, коричное, масло какао, кокосовое, печени трески, кофе, кукурузное, семян хлопка, эму, эвкалипта, вечерней примулы, рыбий жир, масло льна, гераниол, масло бутылочной тыквы, виноградных косточек, фундука, иссопа, изопропилмиристат, жожоба, лакового дерева, лавандина, лаванды, лимона, лицей кубеба, ореха макадамии, мальвы, семян манго, семян пенника лугового, норки, мускатного ореха, оливковое, апельсина, атлантического большеголова, пальмовое, пальмоядровое, персиковых косточек, арахисовое, семян мака, семян тыквы, рапсовое, коричневого риса, розмарина, сафлоровое, сандалового дерева, саскуаны (sasquana), ароматических трав, облепихи крушиновидной, кунжутное, масло ши, силиконовое, соевое, подсолнечниковое, чайного дерева, чертополоха, тсубаки (tsubaki), ветивера, грецкого ореха и зародышей пшеницы. В качестве примера, масла включают, без ограничений, бутилстеарат, каприлтриглицерид, каприновый триглицерид, циклометикон, диэтилсебацат, диметикон 360, изопропилмиристат, минеральное масло, октилдодеканол, олеиловый спирт, силиконовое масло и/или их

комбинации.

[00531] Вспомогательные вещества, такие как масло какао и суппозиторные воски, красители, покрывающие агенты, подсластители, вкусовые добавки и/или ароматизаторы, могут присутствовать в композиции, на усмотрение разработчика рецептуры.

5 Доставка

[00532] Настоящий документ охватывает доставку модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или ммРНК для любых терапевтических, фармацевтических, диагностических целей или целей визуализации, любым подходящим способом, с учетом
10 возможного научного прогресса в сфере доставки лекарственных средств. Доставка может осуществляться непосредственно или в виде лекарственной формы.

Непосредственная доставка

[00533] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетку непосредственно. В
15 настоящем документе под «непосредственной» подразумевается доставка модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или ммРНК без агентов, которые способствуют трансфекции. Например, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК, доставляемые в клетку, могут не содержать дополнительных модификаций. Такие модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК
20 без дополнительных модификаций могут быть доставлены в клетку с использованием способов введения, известных из уровня техники и раскрытых в настоящем документе.

Доставка в виде лекарственной формы

[00534] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК по настоящему изобретению могут быть созданы с применением способов, раскрытых в
25 настоящем документе. Препараты могут содержать модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК, которые могут быть дополнительно модифицированными и/или немодифицированными. Кроме того, препараты могут содержать, без ограничений, проникающие в клетку агенты, фармацевтически приемлемый носитель, агент доставки, биоэродирующий или биосовместимый полимер,
30 растворитель и депо для доставки с контролируемым высвобождением. Модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК в составе препарата могут быть доставлены в клетку с использованием способов доставки, известных из уровня техники и раскрытых в настоящем документе.

[00535] Кроме того, составы могут быть разработаны для непосредственной доставки
35 в орган или ткань любым из нескольких способов, известных из уровня техники, в том числе, без ограничений, прямое пропитывание или погружение, с помощью катетера, в гелях, порошках, мазях, кремах, гелях, лосьонах и/или каплях, путем использования субстратов, таких как ткань или биоразлагаемые материалы, покрытые или пропитанные композициями, и т.п.

40 Введение

[00536] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК по настоящему изобретению могут быть введены любым способом, который дает терапевтически эффективный результат. Указанные способы включают, без ограничений, энтеральный, гастроэнтеральный, эпидуральный, пероральный, трансдермальный,
45 эпидуральный (перидуральный), интрацеребральный (в мозг), интрацеребровентрикулярный (в желудочки мозга), накожный (нанесение на кожу), внутрикожный (непосредственно в кожу), подкожный (под кожу), назальное введение (через нос), внутривенный (в вену), внутриартериальный (в артерию), внутримышечный

(в мышцу), внутрисердечный (в сердце), внутрикостную инфузию (в костный мозг), интратекальный (в спинной канал), внутривентрикулярный (инфузия или инъекция в брюшную полость), внутривентрикулярную инфузию, в стекловидное тело (через глаз), интракавернозную инъекцию (в основание пениса), интравагинальное введение, 5 внутриматочное, экстра-амниотическое введение, трансдермальное (диффузия сквозь интактную кожу для системного распределения), трансмукозально (диффузия сквозь слизистую оболочку), инсуффляцию (вдыхание через нос), сублингвальное, сублабиальное, в слюне, в глазных каплях (на конъюнктиву) или в ушных каплях. В конкретных вариантах реализации составы могут вводиться таким способом, который 10 позволяет проникновение сквозь гематоэнцефалический барьер, сосудистый барьер или другой эпителиальный барьер. Неограничивающие способы введения модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК по настоящему изобретению раскрыты ниже.

Парентеральное и инъекционное введение

15 [00537] Жидкие лекарственные формы для парентерального введения включают, без ограничений, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и/или эликсиры. В дополнение к активным ингредиентам, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, широко применяемые 20 в данной области, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутандиол, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли, жирнокислотные эфиры сорбитана 25 и их смеси. Кроме инертных разбавителей, составы для перорального введения могут содержать адъюванты, такие как увлажнители, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, вкусовые добавки и/или ароматизаторы. В некоторых вариантах реализации для парентерального введения составы смешивают с солюбилизаторами, такими как CREMOPHOR®, спирты, масла, модифицированные масла, гликоли, 30 полисорбаты, циклодекстрины, полимеры и/или их комбинации.

[00538] Инъекционные препараты, например, стерильные инъекционные водные или масляные суспензии могут быть созданы в соответствии с уровнем техники с использованием пригодных диспергирующих агентов, увлажняющих агентов и/или 35 суспендирующих агентов. Стерильные инъекционные препараты могут представлять собой стерильные инъекционные растворы, суспензии и/или эмульсии в нетоксичных, приемлемых для парентерального введения разбавителях и/или растворителях, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут применяться, - вода, раствор Рингера, Фарм. США, и изотонический раствор натрия хлорида. Стерильные, нелетучие масла традиционно используются в 40 качестве растворителя или среды суспендирования. Для этой цели может быть использовано любое нелетучее прозрачное масло, в том числе, синтетические моно- или диглицериды. В приготовлении инъекционных форм могут применяться жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

[00539] Инъекционные препараты могут быть стерилизованы, например, фильтрацией 45 сквозь задерживающий бактерии фильтр и/или введением стерилизующих агентов в форму стерильных твердых составов, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде перед использованием.

[00540] Для пролонгации эффекта активного ингредиента, часто является желательным замедлить абсорбцию активного ингредиента после подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто применением жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала со слабой растворимостью в воде. Скорость абсорбции лекарственного средства в дальнейшем будет зависеть от его скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. Альтернативно, замедленная абсорбция парентерально введенной лекарственной формы достигается растворением или суспендированием лекарственного средства в масляном носителе. Инъекционные формы депо получают путем формирования матриц микрокапсулы лекарственного средства в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства к полимеру и природы конкретно используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Инъекционные препараты депо получают путем захвата лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

Ректальное и вагинальное введение

[00541] Составы для ректального или вагинального введения обычно представляют собой суппозитории, которые могут быть получены смешиванием составов с пригодными нераздражающими вспомогательными веществами, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или суппозиторный воск, который находится в твердом состоянии при комнатной температуре, но становится жидким при температуре тела, и, таким образом, плавится в прямой кишке или полости влагалища и высвобождает активный ингредиент.

Пероральное введение

[00542] Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают, без ограничений, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и/или эликсиры. В дополнение к активным ингредиентам, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, широко применяемые в данной области, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли, жирнокислотные эфиры сорбитана и их смеси. Кроме инертных разбавителей, составы для перорального введения могут содержать адъюванты, такие как увлажнители, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, вкусовые добавки и/или ароматизаторы. В некоторых вариантах реализации для парентерального введения, составы смешивают с солюбилизаторами, такими как CREMOPHOR®, спирты, масла, модифицированные масла, гликоли, полисорбаты, циклодекстрины, полимеры и/или их комбинации.

[00543] Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах, активный ингредиент смешан по меньшей мере с одним инертным, фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, таким как натрия цитрат или дикальция фосфат и/или наполнители или расширители (например, различные виды крахмала, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота), связующие агенты {например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон,

сахароза и акация), влагоудерживающие вещества { например, глицерин), дезинтегранты (например, агар, кальция карбонат, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и натрия карбонат), удерживающие в растворе агенты (например, парафин), ускорители абсорбции (например, четвертичные соединения аммония), увлажнители (например, цетиловый спирт и глицерин моностеарат), абсорбенты (например, каолин и бентонитовая глина) и смазывающие вещества (например, тальк, кальция стеарат, магния стеарат, твердые полиэтиленгликоли, натрия лаурилсульфат) и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль, лекарственная форма может содержать буферизирующие агенты.

10 Местное или трансдермальное применение

[00544] Как раскрыто в настоящем документе, составы, содержащие модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или ммРНК по изобретению, могут быть созданы для местного применения. Кожа может быть идеальной мишенью для доставки, поскольку она легко доступна. Экспрессия гена может быть ограничена не только кожей, что потенциально позволяет избежать неспецифичной токсичности, но также конкретными слоями и типами клеток в пределах кожи.

[00545] Участок кожной экспрессии доставленного состава будет зависеть от способа доставки нуклеиновой кислоты. В общем, рассматриваются три способа доставки модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или ммРНК в кожу: (i) местное нанесение (например, для местного/регионального лечения); (ii) внутрикожная инъекция (например, для местного/регионального лечения); и (iii) системная доставка (например, для лечения дерматологических заболеваний, которые поражают кожные и внекожные участки). Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК могут быть доставлены в кожу с помощью нескольких различных подходов, известных из уровня техники. Большинство подходов для местной доставки продемонстрировали свою эффективность для доставки ДНК, например, без ограничений, местное нанесение некатийонного комплекса липосома-ДНК, катийонного комплекса липосома-ДНК, опосредованный частицами (генное ружье), опосредованная проколами трансфекция генов и вирусные подходы к доставке. После доставки нуклеиновой кислоты, генные продукты были обнаружены во множестве различных типов кожных клеток, в том числе, без ограничений, базальных кератиноцитах, клетках сальных железы, дермальных фибробластах и дермальных макрофагах.

[00546] В одном варианте реализации изобретения предлагаются различные повязки (например, повязки на раны) или бандажи (например, адгезивные бандажи) для традиционного и/или эффективного осуществления способов по настоящему изобретению. Типично, повязки или бандажи могут содержать достаточные количества фармацевтических составов и/или модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или ммРНК, раскрытых в настоящем документе, чтобы позволить пользователю осуществить различные схемы лечения субъекта(ов).

40 [00547] В одном варианте реализации изобретения предлагаются составы на основе модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или ммРНК для доставки в виде более, чем одной инъекции.

[00548] В одном варианте реализации, перед местным и/или трансдермальным применением, по меньшей мере один участок ткани, например, кожи, может быть обработан с помощью устройства и/или раствора, которые может увеличивать проницаемость. В одном варианте реализации ткань может быть обработана абразивным устройством для повышения проницаемости кожи (см. Патентную публикацию США №20080275468; включена в настоящий документ в полном объеме

посредством ссылки). В другом варианте реализации ткань может быть обработана усиливающим ультразвуковым устройством. Усиливающее ультразвуковое устройство может включать, без ограничений, устройства, раскрытые в Публикации США №20040236268 и патентах США №№6491657 и 6234990; каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Способы повышения проницаемости ткани раскрыты в Публикациях США №№20040171980 и 20040236268 и патенте США №6190315; каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00549] В одном варианте реализации устройство может использоваться для повышения проницаемости ткани, перед доставкой препаратов модифицированных мРНК, раскрытых в настоящем документе. Проницаемость кожи может быть измерена способами, известными из уровня техники и/или раскрытыми в патенте США №6190315; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В качестве неограничивающего примера, препарат модифицированной мРНК может быть доставлен способами доставки лекарственного средства, раскрытыми в патенте США №6190315; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00550] В другом неограничивающем примере, ткань может быть обработана эвтектической смесью местноанестезирующих средств (ЭМЛА) в форме крема перед, в ходе и/или после обработки ткани устройством, которое может повышать проницаемость. Katz et al. (Anesth Analg (2004); 98:371-76; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки) показали, что применение крема ЭМЛА в сочетании с обработкой низкой интенсивности, поверхностная кожная анестезия развивается уже через 5 минут после предварительной обработки ультразвуком низкой интенсивности.

[00551] В одном варианте реализации усилители могут быть нанесены на ткань перед, в ходе и/или после обработки ткани с целью повышения проницаемости. Усилители включают, без ограничений, усилители транспорта, усилители физических свойств и усилители образования пор. Неограничивающие примеры усилителей раскрыты в патенте США №6190315; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00552] В одном варианте реализации устройство может использоваться для повышения проницаемости ткани перед доставкой препаратов модифицированной мРНК, раскрытых в настоящем документе, которые могут дополнительно содержать вещество, вызывающее иммунный ответ. В другом неограничивающем примере, препарат, содержащий вещество, которое вызывает иммунный ответ, может быть доставлен способами, раскрытыми в Публикациях США №№20040171980 и 20040236268; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00553] Лекарственные формы для местного и/или трансдермального применения состава могут включать мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, ингаляционные формы и/или пластыри. В общем, активный ингредиент предварительно смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом и/или любыми необходимыми консервантами и/или буферными веществами, которые могут потребоваться.

[00554] Дополнительно, данное изобретение охватывает применение трансдермальных пластырей, которые часто обладают дополнительным преимуществом контролируемой доставки соединения в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены, например, путем растворения и/или диспергирования соединения в соответствующей

среде. Альтернативно или дополнительно, скорость может контролироваться с помощью контролирующей скоростью мембраны и/или путем диспергирования соединения в полимерной матрице и/или геле.

5 [00555] Препараты, пригодные для местного применения, включают, без ограничений, жидкие и/или полужидкие препараты, такие как линименты, лосьоны, эмульсии масло-в-воде и/или вода-в-масле, например, кремы, мази и/или пасты и/или растворы и/или суспензии. Применяемые местно препараты, например, могут содержать от
10 приблизительно 0,1% до приблизительно 10% масс активного ингредиента, хотя концентрация активного ингредиента может быть настолько высокой, чтобы достигать предела растворимости активного ингредиента в растворителе. Кроме того, препараты для местного применения могут содержать один или более дополнительных ингредиентов, раскрытых в настоящем документе.

Введение в форме депо

15 [00556] Как раскрыто в настоящем документе, в некоторых вариантах реализации состав вводят в депо для пролонгированного высвобождения. В общем, происходит нацеливание на конкретный орган или ткань («ткань-мишень») для введения.

[00557] В некоторых аспектах изобретения, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК пространственно удерживаются в пределах или
20 поблизости ткани-мишени. Раскрыт способ доставки состава в ткань-мишень субъекта-млекопитающего посредством приведения ткани-мишени (которая содержит одну или более клеток-мишеней) в контакт с составом в таких условиях что состав, в частности, компонент(ы) нуклеиновой кислоты в составе, в значительной степени удерживаются в ткани-мишени, т.е. по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 или более чем 99,99% состава удерживается в ткани-мишени.

25 Предпочтительно, степень удерживания определяют, измеряя количество нуклеиновой кислоты, присутствующей в составе, которая входит в одну или более клеток-мишеней. Например, по меньшей мере 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 или более чем 99,99% нуклеиновых кислот, введенных субъекту, присутствуют в клетках на протяжении периода времени после введения. Например, внутримышечную
30 инъекцию субъекту-млекопитающему выполняют с использованием водного состава, содержащего рибонуклеиновую кислоту и реактив трансфекции, и удерживание состава определяют, измеряя количество рибонуклеиновой кислоты, присутствующей в мышечных клетках.

[00558] Аспекты изобретения направлены на способы доставки состава к ткани-мишени субъекта-млекопитающего, путем приведения ткани-мишени (содержащей
35 одну или более клеток-мишеней) в контакт с составом, в таких условиях, что состав в значительной степени удерживается в ткани-мишени. Состав содержит эффективное количество молекул нуклеиновой кислоты или мРНК, таким образом, что целевой полипептид вырабатывается по меньшей мере в одной клетке-мишени. В общем, составы
40 содержат проникающий в клетки агент, хотя «непосредственно» вводимая нуклеиновая кислота (например, нуклеиновые кислоты без проникающего в клетки агента или другого агента) также включена, и фармацевтически приемлемый носитель.

[00559] В некоторых обстоятельствах, количество белка, вырабатываемого клетками в ткани, желательно увеличить. Предпочтительно, такое увеличение выработки белка
45 пространственно ограничено клетками в пределах ткани-мишени. Таким образом, раскрыты способы увеличения выработки целевого белка в ткани субъекта-млекопитающего. Раскрыт состав, который содержит модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или мРНК, отличающийся тем, что определена единица

количества состава для выработки целевого полипептида в значительном проценте клеток, содержащихся в предварительно определенном объеме ткани-мишени.

[00560] В некоторых вариантах реализации состав включает несколько различных модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК, где одна или более одной модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК кодирует целевой полипептид. Необязательно, состав также содержит проникающий в клетки агент, способствующий внутриклеточной доставке состава. Проводят определение дозы состава, необходимой для выработки целевого полипептида в значительном проценте клеток, содержащихся в предварительно определенном объеме ткани-мишени (в основном, без индуцирования значимой выработки целевого полипептида в ткани, смежной с предварительно определенным объемом, или дистальной по отношению к ткани-мишени). После такого определения, определенную дозу вводят непосредственно в ткань субъекта-млекопитающего.

[00561] В одном варианте реализации изобретения раскрыты модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК для доставки в виде более, чем одной инъекции или в виде инъекций разделенных доз.

[00562] В одном варианте реализации объект изобретения может удерживаться вблизи ткани-мишени с использованием одноразового резервуара для лекарственного средства небольшого размера, пластырного насоса или осмотического насоса.

Неограничивающие примеры пластырных насосов включают производимые и/или продаваемые BD®, (Франклин Лейке, Нью-Джерси), Insulet Corporation (Бедфорд, Массачусетс), SteadyMed Therapeutics (Сан Франциско, Калифорния), Medtronic (Миннеаполис, Миннесота) (например, MiniMed), UniLife (Йорк, Пенсильвания), Valeritas (Бриджуотер, Нью-Джерси) и SpringLeaf Therapeutics (Бостон, Массачусетс).

Неограничивающий пример осмотического насоса включает производимые DURECT® (Купертино, Калифорния) (например, DUROS® и ALZET®).

Легочное введение

[00563] Фармацевтический состав может быть получен, упакован и/или продан в форме, пригодной для легочного введения через буккальную полость. Такой препарат может содержать сухие частицы, которые содержат активный ингредиент, и диаметр которых составляет от приблизительно 0,5 нм до приблизительно 7 нм или от приблизительно 1 нм до приблизительно 6 нм. Для таких составов подходит форма сухих порошков для введения с использованием устройства, содержащего резервуар для сухого порошка, на который может быть направлена струя пропеллента с целью диспергирования порошка, и/или с использованием самодвижущейся емкости для отпуска растворителя/порошка, такой как устройство, содержащее активный ингредиент в герметизированной емкости, в растворенной и/или суспендированной в низкокипящем пропелленте форме. Такие порошки содержат частицы, где диаметр по меньшей мере 98% масс частиц составляет более 0,5 нм, и диаметр по меньшей мере 95% частиц (по количеству) составляет менее 7 нм. Альтернативно, диаметр по меньшей мере 95% масс частиц составляет более 1 нм, и диаметр по меньшей мере 90% частиц (по количеству) составляет менее 6 нм. Составы в форме сухого порошка могут содержать твердый разбавитель в форме тонкого порошка, такой как сахар, и традиционно поставляются в однократной форме.

[00564] Низкокипящие пропелленты, в общем, включают жидкие пропелленты с температурой кипения ниже 65°F при атмосферном давлении. В общем, пропеллент может составлять от 50% до 99,9% масс состава, и активный ингредиент может составлять от 0,1% до 20% масс состава. Пропеллент может содержать дополнительные

ингредиенты, такие как жидкий неионный и/или твердый анионный поверхностно-активный агент и/или твердый разбавитель (порядок размера частиц которого может быть таким же, как и частиц, содержащих активный ингредиент).

5 [00565] В качестве неограничивающего примера, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены в состав для легочной доставки способами, раскрытыми в патенте США №8257685; включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

10 [00566] Фармацевтический состав для легочной доставки может доставлять активный ингредиент в форме капелек раствора и/или суспензии. Такие препараты могут быть получены, упакованы и/или проданы в форме водных и/или разбавленных спиртовых растворов и/или суспензий, необязательно стерильных, содержащих активный ингредиент, и традиционно могут быть введены с использованием любого устройства для небулайзинга и/или аэрозольного распыления. Такие препараты могут содержать один или более дополнительных ингредиентов в том числе, без ограничений, вкусовую 15 добавку, такую как сахаринат натрия, летучее масло, буферизующий агент, поверхностно-активный агент и/или консервант, такой как метилгидроксibenзоат. Средний диаметр капелек, доставленных таким способом введения, может находиться в интервале от приблизительно 0,1 нм до приблизительно 200 нм.

Интраназальное, назальное и буккальное введение

20 [00567] Препараты, раскрытые в настоящем документе, как пригодные для легочной доставки, пригодны для интраназальной доставки фармацевтического состава. Другим препаратом, пригодным для интраназального введения, является грубый порошок, содержащий активный ингредиент, средний размер частиц которого составляет от приблизительно 0,2 мкм до 500 мкм. Такой препарат вводят способом быстрого 25 вдыхания в нос, т.е. быстрой ингаляцией на вдохе из емкости с порошком, находящейся близко к носу.

[00568] Препараты, пригодные для назального введения, например, могут содержать настолько малое количество как приблизительно 0,1% масс, и настолько большое количество, как 100% масс активного ингредиента, и могут содержать один или более 30 дополнительных ингредиентов, раскрытых в настоящем документе. Фармацевтический состав может быть получен, упакован и/или продан в форме, пригодной для буквального введения. Такие препараты, например, могут приобретать форму таблеток и/или леденцов, полученных с применением традиционных способов и, например, могут содержать от 0,1% до 20% масс активного ингредиента, тогда как оставшаяся часть 35 состоит из растворимого и/или разлагаемого в ротовой полости состава и, необязательно, одного или более дополнительных ингредиентов, раскрытых в настоящем документе. Альтернативно, препараты, пригодные для буккального введения, могут содержать порошок и/или аэрозольный и/или распыленный раствор и/или суспензию, содержащую активный ингредиент. Средний размер частицы и/или капельки в таких 40 порошкообразных, аэрозольных и/или аэрозольных препаратах, при диспергировании, может находиться в интервале от приблизительно 0,1 нм до приблизительно 200 нм, и они могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, раскрытых в настоящем документе.

Введение в глаза

45 [00569] Фармацевтический состав может быть получен, упакован и/или продан в форме, пригодной для введения в глаза. Такие препараты, например, могут приобретать форму глазных капель, в том числе, например, 0,1/1,0% масс раствор и/или суспензия активного ингредиента в водном или масляном жидком вспомогательном веществе.

Такие капли дополнительно могут содержать буферизирующие агенты, соли и/или один или более любых других дополнительных ингредиентов, раскрытых в настоящем документе. Другие пригодные препараты для введения в глаза включают содержащие активный ингредиент в микрокристаллической форме и/или в виде липосомального

5 препарата. Ушные капли и/или глазные капли находятся в пределах настоящего изобретения. Может быть получено устройство в виде многослойной тонкой пленки, содержащее фармацевтический состав для доставки в глаз и/или окружающую ткань.

Введение полезной нагрузки: обнаружимые агенты и терапевтические агенты

[00570] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК, раскрытых

10 в настоящем документе, могут применяться во множестве различных сценариев, в которых желательна доставка вещества («полезная нагрузка») к биологической мишени, например доставка обнаружимых веществ для определения мишени или доставка терапевтического агента. Способы обнаружения могут включать, без ограничений, способы визуализации *in vitro* и *in vivo*, например, иммуногистохимию,

15 биоломинесцентную интроскопию (БЛИ), магнитную резонансную томографию (МРТ), позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), электронную микроскопию, рентгеновскую компьютерную томографию, изображение комбинационного рассеяния, оптическую когерентную томографию, абсорбционное формирование изображений, термическое формирование изображений, формирование изображений на основе

20 отражения флуоресценции, флуоресцентную микроскопию, флуоресцентную молекулярную томографию, ядерную магнитно-резонансную томографию, рентгенографию, ультразвуковую визуализацию, фотоакустическую визуализацию, лабораторные анализы, или любую ситуацию, где требуется введение метки/окрашивание/визуализация.

[00571] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или ммРНК могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать линкер и полезную нагрузку в

25 любой пригодной ориентации. Например, линкер, содержащий два конца, используют для присоединения одного из концов к полезной нагрузке, и другого конца к нуклеиновому основанию, например, в положениях С-7 или С-8 дезаза-аденозина или

30 дезаза-гуанозина или в положениях N-3 или С-5 цитозина или урацила. Полинуклеотид по изобретению может содержать более чем одну полезную нагрузку (например, метку и ингибитор транскрипции), а также расщепляемый линкер.

[00572] В одном варианте реализации модифицированный нуклеотид представляет собой модифицированный 7-дезаза-аденозина трифосфат, где один из концов

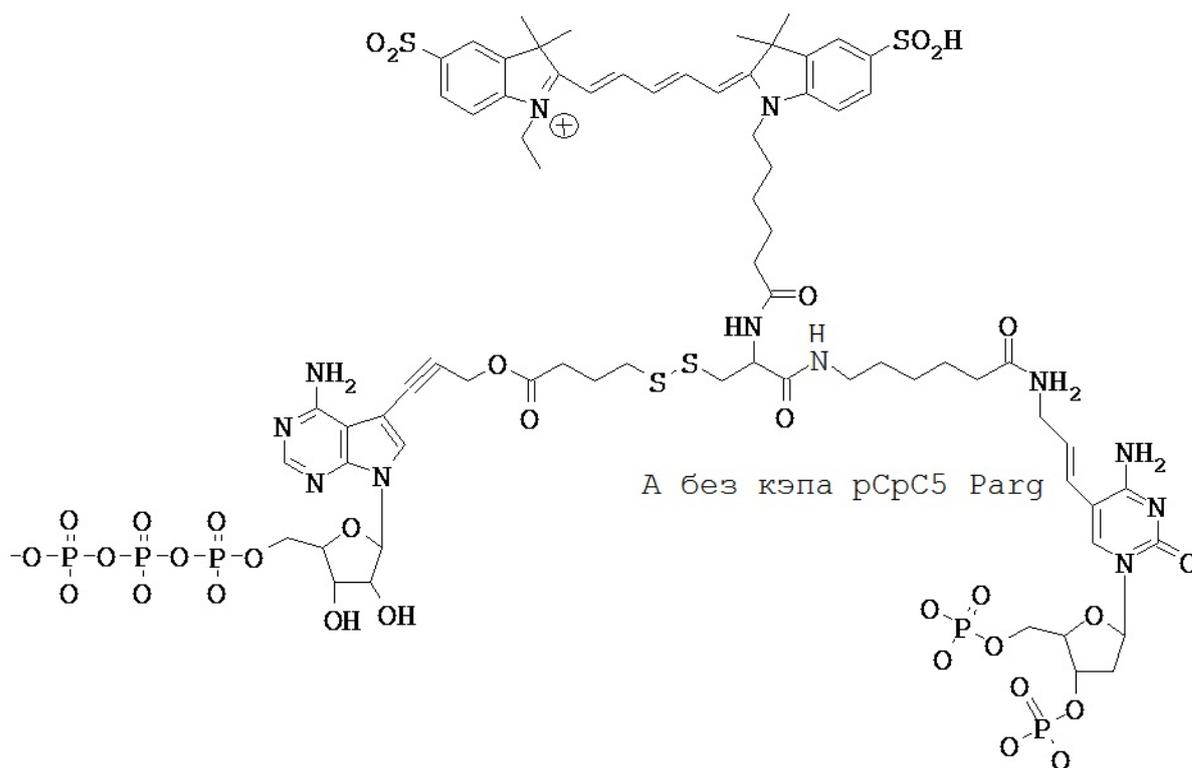
35 расщепляемого линкера присоединен к положению С7 7-дезаза-аденина, а другой конец линкера присоединен к ингибитору (например, к положению С5 нуклеинового основания на цитидине), и метка (например, Су5) присоединена к центру линкера (см., например, соединение 1 A*pCp C5 Parg без кэпа на Фиг. 5 и колонки 9 и 10 патента США №7994304; включен в настоящий документ посредством ссылки). После введения

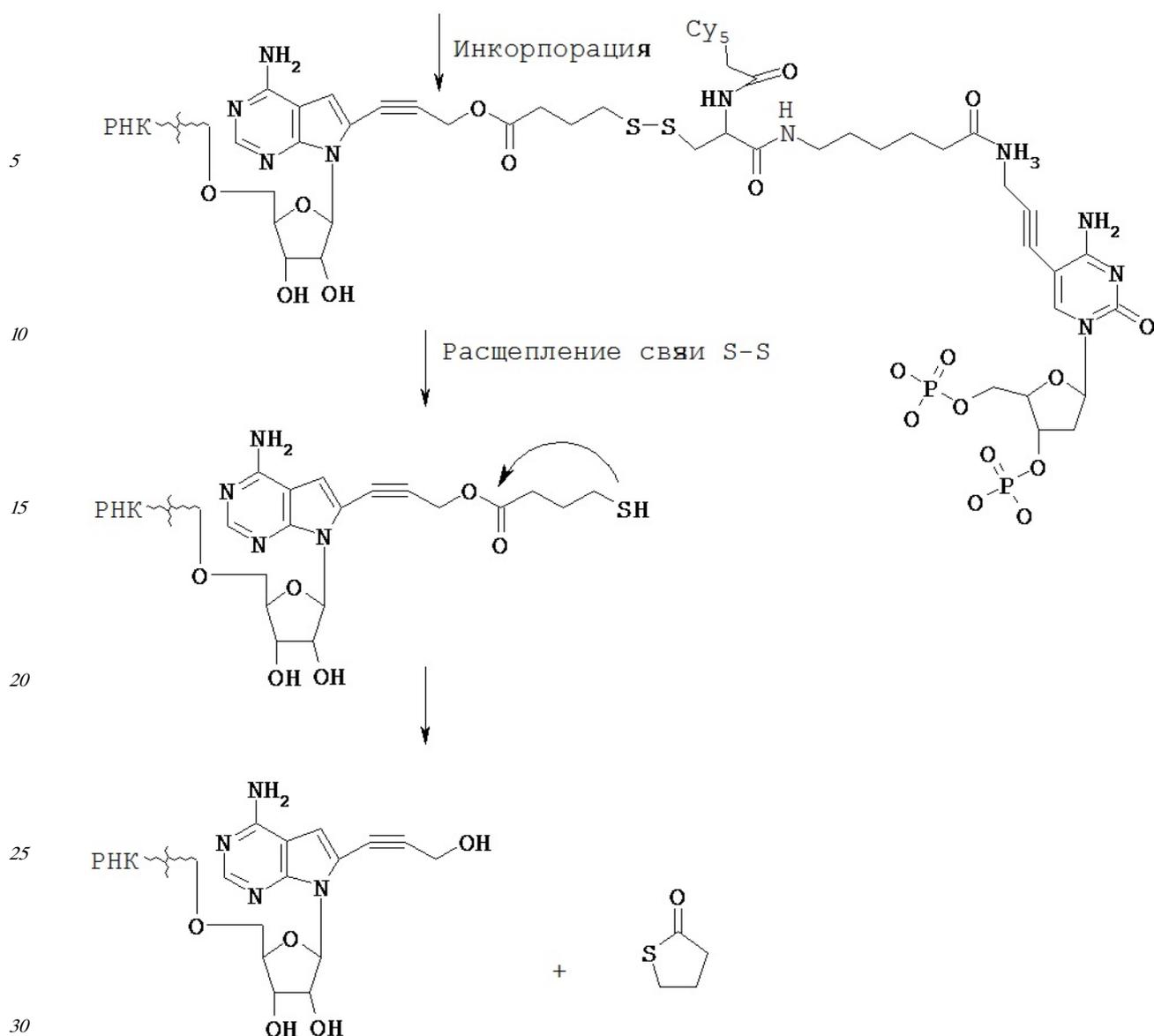
40 модифицированного 7-дезаза-аденозинтрифосфата в кодирующий участок, полученный полинуклеотид содержит расщепляемый линкер, присоединенный к метке и ингибитору (например, ингибитор полимеразы). После расщепления линкера (например, в восстановительных условиях для восстановления линкера, содержащего расщепляемый дисульфидный фрагмент), высвобождаются метка и ингибитор. Дополнительное

45 количество линкеров и полезной нагрузки (например, терапевтические агенты, обнаружимые метки и проникающая в клетку полезная нагрузка) раскрыты в настоящем документе.

[00573] На Схеме 12 ниже проиллюстрирован пример модифицированного нуклеотида,

где нуклеиновое основание аденин присоединено к линкеру при С-7 атоме углерода 7-дезааденина. Кроме того, на Схеме 12 проиллюстрирован модифицированный нуклеотид с линкером и полезной нагрузкой, например, обнаружимый агент, введенный на 3' конце мРНК. Расщепление дисульфида и 1,2-присоединение тиольной группы к пропаргилловому эфиру высвобождает обнаружимый агент. Остаток структуры (изображенный, например, как рArC5Parg на Схеме 12) представляет собой ингибитор. Обоснование структуры модифицированных нуклеотидов состоит в том, что присоединенный ингибитор стерически препятствует способности полимеразы ввести второе основание. Таким образом, критичной является достаточная длина линкера для осуществления данной функции, а также положение ингибитора в стереохимической ориентации, которая ингибирует или препятствует присоединению второго и последующих нуклеотидов к растущей полинуклеотидной цепи.





[00574] Например, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для перепрограммирования индуцированных полипотентных стволовых клеток (клеток ИПС), что позволяет непосредственно отслеживать трансфицированные клетки, в сравнении с общим количеством клеток в кластере. В другом примере, лекарственное средство, которое может быть присоединено к модифицированным молекулам нуклеиновой кислоты или мРНК посредством линкера и может содержать флуоресцентную метку, может применяться для отслеживания лекарственного средства *in vivo*, например, внутриклеточно. Другие примеры включают, без ограничений, применение модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК в целях обратной доставки лекарственного средства в клетки.

[00575] Модифицированные молекулы нуклеиновых кислот или мРНК, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для внутриклеточного нацеливания полезной нагрузки, например, обнаружимого или терапевтического агента, на конкретную органеллу. В качестве примера, внутриклеточные мишени могут включать, без ограничений, ядерную локализацию для последующего процессинга мРНК или присоединения последовательности ядерной локализации (ПЯЛ) к мРНК, содержащей ингибитор.

[00576] Кроме того, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для доставки терапевтических агентов в клетки или ткани, например, в организм живых животных. Например, модифицированные нуклеиновые кислоты или мРНК, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для доставки высокополярных химиотерапевтических агентов, чтобы вызывать гибель раковых клеток. Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот или мРНК, присоединенные к терапевтическому агенту посредством линкера, могут облегчать проникновение партнера, позволяя терапевтическому агенту попадать в клетку и достигать внутриклеточной мишени.

[00577] В одном из примеров, линкер присоединен в положении 2' рибозного кольца и/или в положении 3' и/или 5' модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК (см., например, Международную публикацию WO 2012030683; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Линкер может представлять собой любой линкер, раскрытый в настоящем документе, известный из уровня техники и/или раскрытый в Международной публикации № WO 2012030683; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00578] В другом примере, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК могут содержать вирусный ингибиторный пептид (ВИП), присоединенный к модифицированным молекулам нуклеиновой кислоты или мРНК посредством расщепляемого линкера. Расщепляемый линкер может высвобождать ВИЛ и краситель в клетке. В другом примере, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК могут быть присоединены посредством линкера к АДФ-рибозилату, который ответственен за действие некоторых бактериальных токсинов, таких как токсин холеры, токсин дифтерии и токсин коклюша. Указанные белки токсинов представляют собой АДФ-рибозилтрансферазы, которые модифицируют белки-мишени в клетках человека. Например, АДФ-рибозилаты белков G токсина холеры модифицируют клетки человека, вызывая массивную секрецию жидкости из выстилки тонкого кишечника, что приводит к опасной для жизни диарее.

[00579] В некоторых вариантах реализации полезная нагрузка может быть терапевтическим агентом, таким как цитотоксин, радиоактивный ион, химиотерапевтический или другой терапевтический агент. Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который может быть вредным для клеток. Примеры включают, без ограничений, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенипозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацендион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин, майтанзиноиды, например, майтанзинол (см. патент США №5208020; включен в настоящий документ в полном объеме), рэчелмицин (CC-1065, см. патенты США №№5475092, 5585499 и 5846545, все из которых включены в данное описание посредством ссылки) и их аналоги или гомологи. Радиоактивные ионы включают, без ограничений, йод (например, йод 125 или йод 131), стронций 89, фосфор, палладий, цезий, иридий, фосфат, кобальт, иттрий 90, самарий 153 и празеодимий. Другие терапевтические агенты включают, без ограничений, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил дакарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, рэчелмицин (CC-1065), мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиаминоплатину (II) (ДДП или цисплатин), антрациклины (например,

даунорубицин (ранее носил название дауномицина) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее носил название актиномицина), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМЦ)) и антимиотические агенты (например, винкристин, винбластин, таксол и майтанзиноиды).

- 5 [00580] В некоторых вариантах реализации полезная нагрузка может представлять собой обнаружимый агент, такой как различные органические молекулы небольшого размера, неорганические соединения, наночастицы, ферменты или субстраты ферментов, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы (например, люминол), биолюминесцентные материалы (например, люцифераза, люциферин и экворин),
- 10 хемилюминесцентные материалы, радиоактивные материалы (например, ^{18}F , ^{67}Ga , $^{81\text{m}}\text{Kr}$, ^{82}Rb , ^{111}In , ^{123}I , ^{133}Xe , ^{201}Tl , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^3H или $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (например, в виде пертехнецата (технецат (VII), TcO_4^-)) и контрастные агенты (например, золото (например, наночастицы золота), гадолиний (например, хелатированный Gd), железа оксиды (например, суперпарамагнитный железа оксид (СПЖО), наночастицы монокристаллического железа оксида (МЖОнч) и ультрамалые частицы суперпарамагнитного железа оксида (ПЖОум)), хелаты марганца (например, Mn-дипиридоксил дифосфат), бария сульфат, йодированная контрастная среда (йогексол), микропузырьки или перфторуглероды). Такие оптически обнаружимые метки включают,
- 15 например, без ограничений, 4-ацетиамидо-4'-изотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота; акридин и производные (например, акридин и акридина изотиоцианат); 5-(2'-аминоэтил)аминонафталин-1-сульфоновая кислота (ЭДАНК); 4-амино-N-[3-винилсульфонил]фенил]нафталимид-3,5-дисульфонат; N-(4-анилино-1-нафтил) малеинимид; антраниламид; BODIPY; бриллиантовый желтый; кумарин и производные (например, кумарин, 7-амино-4-метилкумарин (АМС, Coumarin 120) и 7-амино-4-трифторметилкумарин (Coumarin 151)); цианиновые красители; цианозин; 4',6-диаминидино-2-фенилиндол (ДАФИ); 5',5"-дибромпирогаллол-сульфонафталин (бромпирогаллоловый красный); 7-диэтиламино-3-(4'-изотиоцианатофенил)-4-метилкумарин; диэтилентриамин пентаацетат; 4,4'-диизотиоцианатодигидро-стильбен-
- 20 2,2'-дисульфоновую кислоту; 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновую кислоту; 5-[диметиламино]-нафтален-1-сульфонилхлорид (ДНС, данзилхлорид); 4-диметиламинофенилазофенил-4'-изотиоцианат (ДАФИТЦ); эозин и производные (например, эозин и эозина изотиоцианат); эритрозин и производные (например, эритрозин В и эритрозина изотиоцианат); этидий; флуоресцеин и производные (например, 5-карбоксифлуоресцеин (FAM), 5-(4,6-дихлортриазин-2-ил)аминофлуоресцеин (ДТАФ), 2',7'-диметокси-4'5'-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, X-родамин-5-(и -6)-изотиоцианат (QFITC или XRITC) и флуоресцамин); 2-[2-[3-[[1,3-дигидро-1,1-диметил-3-(3-сульфопропил)-2H-бенз[e]индол-2-илиден] этилиден]-2-[4-(этоксикарбонил)-1-пиперазинил]-1-циклопентен-1-ил]этенил]-1,1-
- 30 диметил-3-(3-сульфопропил)-1H-бенз[e]индолия гидроксид, внутренняя соль, соединение с n,n-диэтилэтанаминном (1:1) (IR144); 5-хлор-2-[2-[3-[(5-хлор-3-этил-2(3H)-бензотиазол-илиден)этилиден]-2-(дифениламино)-1-циклопентен-1-ил]этенил]-3-этилбензотиазолия перхлорат (IR140); малахитовый зеленый изотиоцианат; 4-метилумбеллиферон ортокрезолфталеин; нитротирозин; парарозанилин; феноловый красный; В-фикоэритрин;
- 45 о-фталдиальдегид; пирен и производные (например, пирен, пирена бутират и сукцинимидил 1-пирен); квантовые примеси бутирата; реакционноспособный красный 4 (Cibacron™ бриллиантовый красный 3B-A); родамин и производные (например, 6-карбокси-X-родамин (ROX), 6-карбоксиродамин (R6G), лиссамин родамин В

сульфонилхлорид родарнин (Rhod), родамин В, родамин 123, родамин Х изотиоцианат, сульфородамин В, сульфородамин 101, сульфонилхлоридные производные сульфородамина 101 (техасский красный), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксихлородамин (ТАМРА), тетраметилродамин и тетраметилродамина изотиоцианат (ТРИТЦ));
 5 рибофлавин; розоловая кислота; хелатные производные тербия; цианин-3 (Cy3); цианин-5 (Cy5); цианин-5,5 (Cy5,5), цианин-7 (Cy7); IRD 700; IRD 800; Alexa 647; La Jolta голубой; фталоцианин; и нафталоцианин.

[00581] В некоторых вариантах реализации обнаружимый агент может представлять собой необнаружимый прекурсор, который становится обнаружимым после активации
 10 (например, флуорогенные тетразин-флуорофоровые конструкторы (например, тетразин-BODIPY FL, тетразин-Орегонский Зеленый 488 или тетразин-BODIPY TMR-X) или активируемые ферментом флуорогенные агенты (например, PROSENSE® (VisEn Medical))). Анализы *in vitro*, в которых могут применяться меченные ферментом составы включают, без ограничений, твердофазные иммуноферментные анализы (ТИФА),
 15 иммунопреципитационные анализы, иммунофлуоресценцию, иммуноферментные анализы (ИФА), радиоиммуноанализы (РИА) и вестерн-блоттинг.

Комбинации

[00582] Молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК могут применяться в сочетании с одним или более других терапевтических, профилактических, диагностических или
 20 контрастных агентов. Выражение «в комбинации с» не обязательно обозначает, что агенты должны вводиться в одно и то же время и/или в одном препарате для совместной доставки, хотя такие способы доставки находятся в пределах настоящего документа. Составы могут быть введены одновременно с, до или после введения одного или более других желательных терапевтических средств или проведения медицинских процедур.
 25 В общем, каждый агент будет вводиться в дозе и/или по расписанию, определенному для данного агента. В некоторых вариантах реализации настоящий документ охватывает доставку фармацевтических, профилактических, диагностических или контрастных составов в сочетании с агентами, которые могут улучшать их биодоступность, снижать и/или модифицировать их метаболизм, подавлять их экскрецию и/или модифицировать
 30 их распределение в пределах организма. В качестве неограничивающего примера, молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК могут применяться в сочетании с фармацевтическим агентом для лечения рака или для контроля гиперпролиферирующих клеток. В патенте США №7964571, который включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки, раскрыта комбинированная терапия для лечения солидной
 35 первичной или метастазированной опухоли с применением фармацевтического состава, содержащего ДНК плазмиду, кодирующую интерлейкин-12, с липополимером, а также введение по меньшей мере одного противоракового агента или химиотерапевтического средства. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты и мРНК по настоящему изобретению, которые кодируют антипролиферативные молекулы, могут быть введены
 40 в фармацевтический состав с липополимером (см., например, Публикацию США №20110218231; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки; заявлен фармацевтический состав, содержащий ДНК плазмиду, которая кодирует антипролиферативную молекулу, и липополимер), который может вводиться по меньшей мере с одним химиотерапевтическим или противораковым агентом.

Проникающая в клетку полезная нагрузка

[00583] В некоторых вариантах реализации модифицированные нуклеотиды и модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые введены в нуклеиновую кислоту, например, РНК или мРНК, также могут содержать полезную нагрузку, которая

может представлять собой проникающий в клетку фрагмент или агент, улучшающий внутриклеточную доставку составов. Например, составы могут содержать, без ограничений, последовательность проникающего в клетку пептида, который облегчает доставку во внутриклеточное пространство, например, полученный из ВИЧ пептид ТАТ, пенетратины, транспортаны или полученные из hCT проникающие в клетку пептиды, см., например, Caron et al., (2001) Mol Ther. 3(3):310-8; Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL 2002); El-Andaloussi et al., (2005) Curr Pharm Des. 11(28):3597-611; и Deshayes et al., (2005) Cell Mol Life Sci. 62(16): 1839-49; все из которых включены в данное описание посредством ссылки. Кроме того, могут быть разработаны составы, содержащие проникающий в клетку агент, например, липосомы, которые улучшают доставку составов во внутриклеточное пространство.

Биологические мишени

[00584] Модифицированные нуклеотиды и модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе, которые введены в нуклеиновую кислоту, например, РНК или мРНК, могут применяться для доставки полезной нагрузки к любой биологической мишени, для которой специфичный лиганд существует или может быть сгенерирован. Лиганд может связываться с биологической мишенью ковалентно или нековалентно.

[00585] Примеры биологических мишеней включают, без ограничений, биополимеры, например, антитела, нуклеиновые кислоты, такие как РНК и ДНК, белки, ферменты; примеры белков включают, без ограничений, ферменты, рецепторы и ионные каналы. В некоторых вариантах реализации мишень может представлять собой маркер, специфичный для вида тканей или клеток, например, белок, который экспрессируется конкретно на выбранном типе тканей или клеток. В некоторых вариантах реализации мишень может быть рецептором, таким как, без ограничений, рецепторы плазматической мембраны и ядерные рецепторы; более конкретные примеры включают, без ограничений, сочетанные с белком G рецепторы, белки клеточной поры, белки-переносчики, экспрессируемые на поверхности антитела, белки антигена лейкоцитов человека, белки основного комплекса гистосовместимости и рецепторы фактора роста.

Дозы

[00586] В настоящем изобретении раскрываются способы, которые включают введение модифицированных мРНК и кодируемых ими белков или комплексов в соответствии с изобретением субъекту, который нуждается в этом. Нуклеиновые кислоты, белки или комплексы или фармацевтические, контрастные, диагностические или профилактические составы на их основе, могут быть введены субъекту с использованием любого количества и любого способа введения, эффективного с точки зрения профилактики, лечения, диагностики или визуализации заболевания, расстройства и/или состояния (например, заболевания, расстройства и/или состояния, связанного с ухудшением оперативной памяти). Точное необходимое количество будет варьировать от одного субъекта к другому, в зависимости от биологического вида, возраста и общего состояния здоровья субъекта, тяжести заболевания, конкретного состава, схемы введения, механизма действия и т.п. Составы в соответствии с изобретением типично вводят в дозированную лекарственную форму для легкости введения и однородности дозирования. Однако, следует понимать, что общая суточная доза составов по настоящему изобретению может быть определена лечащим врачом по своему усмотрению. Конкретный терапевтически эффективный, профилактически эффективный или подходящий для визуализации уровень дозы для любого конкретного больного будет зависеть от различных факторов, в том числе, подлежащего лечению расстройства

и его тяжести; активности конкретно применяемого соединения; конкретно применяемого состава; возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона больного; времени введения, способа введения и скорости экскреции конкретно применяемого соединения; продолжительности лечения; лекарственных средств, применяемых в сочетании или параллельно с конкретно применяемым соединением; и т.п. факторов, хорошо известных в области медицины.

[00587] В некоторых вариантах реализации составы в соответствии с данным изобретением могут вводиться в дозах, достаточных для доставки от приблизительно 0,0001 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,005 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,005 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг массы тела субъекта в сутки, один или более раз в сутки, с получением желательного терапевтического, диагностического, профилактического эффекта или эффекта визуализации. Желательные дозы могут вводиться 3 раза в сутки, 2 раза в сутки, 1 раз в сутки, через день, каждый 3-й день, 1 раз в неделю, через неделю, каждые 3 недели или каждые 4 недели. В некоторых вариантах реализации желательные дозы могут быть доставлены в виде множественных доз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более доз).

[00588] В соответствии с данным изобретением, было обнаружено, что введение ммРНК в схеме с разделенными дозами приводит к более высоким уровням белков у субъекта-млекопитающего. В настоящем документе «разделенная доза» обозначает деление одинарной или общей суточной дозы на две или более доз, например, введение двух или более одинарных доз. В настоящем документе «одинарная доза» представляет собой дозу любого терапевтического средства, вводимую однократно/за один раз/одним способом/в одном месте введения, т.е., посредством одинарного акта введения. В настоящем документе «общая суточная доза» представляет собой количество, введенное или назначенное для введения в течение 24 час. Оно может быть введено в виде одинарной дозы. В одном варианте реализации ммРНК по настоящему изобретению вводят субъекту в виде разделенных доз. ммРНК может быть введена только в буферном растворе или в составе, раскрытом в настоящем документе.

35 Лекарственные формы

[00589] Фармацевтический состав, раскрытый в настоящем документе, может быть введен в лекарственную форму, раскрытую в настоящем документе, например, для местного, интраназального, интратрахеального или инъекционного (например, внутривенного, внутриглазного, в стекловидное тело, внутримышечного, внутрисердечного, внутрибрюшинного, подкожного) введения.

Жидкие лекарственные формы

[00590] Жидкие лекарственные формы для парентерального введения включают, без ограничений, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и/или эликсиры. Кроме активных ингредиентов, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, широко применяемые в данной области, в том числе, без ограничений, воду или другие растворители, солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-

бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и жирнокислотные эфиры сорбитана, а также их смеси. В некоторых вариантах реализации для парентерального введения составы могут быть смешаны с солюбилизаторами, такими как CREMOPHOR®, спирты, масла, модифицированные масла, гликоли, полисорбаты, циклодекстрины, полимеры и/или их комбинации.

Инъекционные формы

[00591] Инъекционные препараты, например, стерильные водные или масляные суспензии для инъекций, могут быть созданы в соответствии с уровнем техники, и могут содержать пригодные диспергирующие агенты, увлажнители и/или суспендирующие агенты. Стерильные инъекционные препараты могут представлять собой стерильные инъекционные растворы, суспензии и/или эмульсии в нетоксических, приемлемых для парентерального введения разбавителях и/или растворителях, например, раствор в 1,3-бутандиоле. Приемлемые носители и растворители, которые могут использоваться, включают, без ограничений, воду, раствор Рингера, Фарм. США, и изотонический раствор натрия хлорида. Стерильные, нелетучие масла традиционно используются в качестве растворителя или среды суспендирования. Для этой цели может быть использовано любое прозрачное нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, могут применяться в приготовлении инъекционных форм.

[00592] Инъекционные препараты могут быть стерилизованы, например, фильтрацией сквозь задерживающий бактерии фильтр и/или введением стерилизующих агентов в форме стерильных твердых составов, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде перед использованием.

[00593] Для пролонгации эффекта активного ингредиента, может быть желательным замедлить абсорбцию активного ингредиента после подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто применением жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала со слабой растворимостью в воде. В дальнейшем, скорость абсорбции модифицированной мРНК будет зависеть от ее скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера и формы кристаллов.

Альтернативно, замедление абсорбции парентерально введенной модифицированной мРНК может быть достигнуто посредством растворения или суспендирования модифицированной мРНК в масляном носителе. Инъекционные формы депо получают формированием микроинкапсулирующих матриц модифицированной мРНК в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения модифицированной мРНК к полимеру и природы конкретно используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения модифицированной мРНК. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают, без ограничений, поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Инъекционные препараты депо могут быть получены посредством захвата модифицированной мРНК в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

Легочные

[00594] Препараты, раскрытые в настоящем документе, как пригодные для легочной доставки, также могут применяться для интраназальной доставки фармацевтического состава. Другим препаратом, пригодным для интраназального введения, является грубый порошок, содержащий активный ингредиент, средний размер частиц которого

составляет от приблизительно 0,2 мкм до 500 мкм. Такой препарат может вводиться способом быстрого вдыхания в нос, т.е. быстрой ингаляцией на вдохе из емкости с порошком, находящейся близко к носу.

[00595] Препараты, пригодные для назального введения, например, могут содержать настолько малое количество как приблизительно 0,1% масс, и настолько большое количество, как 100% масс активного ингредиента, и могут содержать один или более дополнительных ингредиентов, раскрытых в настоящем документе. Фармацевтический состав может быть получен, упакован и/или продан в форме, пригодной для буккального введения. Такие препараты, например, могут приобретать форму таблеток и/или леденцов, полученных с применением традиционных способов и, например, могут содержать от 0,1% до 20% масс активного ингредиента, тогда как оставшаяся часть состоит из растворимого и/или разлагаемого в ротовой полости состава и, необязательно, одного или более дополнительных ингредиентов, раскрытых в настоящем документе. Альтернативно, препараты, пригодные для буккального введения, могут содержать порошок и/или аэрозольный и/или распыленный раствор и/или суспензию, содержащую активный ингредиент. Средний размер частицы и/или капельки в таких порошкообразных, аэрозольных и/или аэрозольных препаратах, при диспергировании, может находиться в интервале от приблизительно 0,1 нм до приблизительно 200 нм, и они могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, раскрытых в настоящем документе.

[00596] Общие соображения относительно состава и/или производства фармацевтических агентов можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

25 Покрытия или оболочки

[00597] Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть получены с использованием покрытий и оболочек, таких как кишечнорастворимые покрытие и другие виды покрытий, хорошо известных из уровня техники в области фармацевтической рецептуры. Они могут необязательно содержать замутнители, и могут быть такого состава, чтобы высвободить активный ингредиент (ы) только или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, в замедленной форме. Примеры внедренных составов, которые могут применяться, включают полимерные субстанции и воски. Твердые составы подобного типа могут применяться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах, с использованием таких вспомогательных веществ как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярных полиэтиленгликолей и т.п.

Свойства фармацевтических составов

[00598] Фармацевтические составы, раскрытые в настоящем документе, могут быть охарактеризованы одним или более из следующих свойств:

40 Биодоступность

[00599] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК, при введении в состав с агентом доставки, как раскрыто в настоящем документе, могут демонстрировать повышение биодоступности, по сравнению с составом без агента доставки, как раскрыто в настоящем документе. В настоящем документе термин «биодоступность» обозначает системную доступность данного количества модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, введенной млекопитающему. Биодоступность можно оценить путем измерения площади под кривой (AUC) или максимальной концентрации в сыворотке или плазме (C_{max}) неизменной формы

соединения после его введения млекопитающему. AUC представляет собой определение площади под кривой на графике, где концентрация соединения в сыворотке или плазме нанесена по оси ординат (ось Y) против времени по оси абсцисс (ось X). В общем, AUC для конкретного соединения может быть вычислена с применением способов, известных среднему специалисту в данной области, и как раскрыто в G.S. Banker, Modern Pharmaceuticals, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 72, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996; включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00600] Значение C_{\max} представляет собой максимальную концентрацию соединения, достигаемую в сыворотке или плазме млекопитающего после введения соединения млекопитающему. Значение C_{\max} для конкретного соединения может быть измерено с применением способов, известных среднему специалисту в данной области. Выражения «увеличение биодоступности» или «улучшение фармакокинетики» в настоящем документе обозначают, что системная доступность первой модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, измеренная как AUC, C_{\max} или C_{\min} у млекопитающего, будет выше в случае совместного введения с агентом доставки, как раскрыто в настоящем документе, чем в отсутствие такого совместного введения. В некоторых вариантах реализации биодоступность модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты может увеличиваться по меньшей мере приблизительно на 2%, по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или приблизительно на 100%.

Терапевтическое окно

[00601] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот и ммРНК, при введении в состав с агентом доставки, как раскрыто в настоящем документе, могут демонстрировать увеличение терапевтического окна введенного состава на основе модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, по сравнению с терапевтическим окном введенного состава на основе модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты без агента доставки, как раскрыто в настоящем документе. В настоящем документе «терапевтическое окно» обозначает интервал концентрации в плазме или интервал уровней терапевтически активной субстанции в месте действия, с высокой вероятностью оказания терапевтического эффекта. В некоторых вариантах реализации терапевтическое окно модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, при совместном введении с агентом доставки, как раскрыто в настоящем документе, может увеличиваться по меньшей мере приблизительно на 2%, по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по

меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или приблизительно на 100%.

5 Объем распределения

[00602] Молекулы модифицированных нуклеиновых кислот, при введении в состав с агентом доставки, как раскрыто в настоящем документе, могут демонстрировать улучшенный объем распределения (V_{dist}), например, уменьшенный или направленный, по сравнению с модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты без агента доставки, как раскрыто в настоящем документе. Объем распределения (V_{dist}) соотносит количество лекарственного средства в организме с концентрацией лекарственного средства в крови или плазме. В настоящем документе термин «объем распределения» обозначает объем жидкости, который потребовался бы, чтобы вместить общее количество лекарственного средства в организме с той же концентрацией, что и в крови или плазме: V_{dist} равен количеству лекарственного средства в организме/концентрацию лекарственного средства в крови или плазме. Например, для дозы 10 мг и концентрации в плазме 10 мг/л, объем распределения будет составлять 1 л. Объем распределения отображает степень, до которой лекарственное средство присутствует во внесосудистой ткани. Большой объем распределения отображает тенденцию соединения связываться с компонентами ткани, по сравнению со связыванием с белками плазмы. В клинике, V_{dist} может использоваться для определения нагрузочной дозы с целью достижения фазы плато концентрации. В некоторых вариантах реализации объем распределения модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, при совместном введении с агентом доставки, как раскрыто в настоящем документе, может уменьшаться по меньшей мере приблизительно на 2%, по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%.

Биологический эффект

35 [00603] В одном варианте реализации биологический эффект модифицированной мРНК, введенной животным, можно квалифицировать посредством анализа экспрессии белка в организме животных. Экспрессия белка может быть определена в результате анализа биологического образца, полученного от млекопитающего, которому была введена модифицированная мРНК по настоящему изобретению. В одном варианте реализации может быть предпочтительной экспрессия белка, кодируемого модифицированной мРНК, введенной млекопитающему, по меньшей мере 50 пг/мл. Например, экспрессия белка 50-200 пг/мл для белка, кодируемого модифицированной мРНК, введенной млекопитающему, может рассматриваться как терапевтически эффективное количество белка в организме млекопитающего.

45 Обнаружение модифицированных нуклеиновых кислот масс-спектрометрией

[00604] Масс-спектрометрия (МС) представляет собой метод анализа, который может предоставить информацию относительно структуры и молекулярной массы/концентрации молекул после их превращения в ионы. Вначале молекулы ионизируют

для получения положительных или отрицательных зарядов, после чего их пропускают сквозь анализатор массы, т.е., различные зоны детектора, в соответствии с их соотношением массы/заряда (m/z).

[00605] Масс-спектрометрию осуществляют с использованием масс-спектрометра, который содержит источник ионов для ионизации фракционированного образца и получения заряженных молекул для дополнительного анализа. Например, ионизация образца может осуществляться посредством ионизации электрораспылением (ИЭР), химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД), фотоионизации, электронной ионизации, бомбардировки быстрыми атомами (ББА)/вторичной ионизации в жидкости (ВИЖ), матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ), полевой ионизации, полевой десорбции, ионизации термораспылением/плазмараспылением и ионизации пучком частиц. Квалифицированному специалисту будет понятно, что выбор способа ионизации может быть определен с учетом анализируемого вещества, которое подлежит измерению, вида образца, вида детектора, выбора положительного против отрицательного режима и т.д.

[00606] После ионизации образца, полученные таким образом положительно или отрицательно заряженные ионы могут быть проанализированы для определения соотношения массы и заряда (т.е., m/z). Пригодные анализаторы для определения соотношения массы и заряда включают квадрупольные анализаторы, анализаторы с ионными ловушками и времяпролетные анализаторы. Ионы могут быть обнаружены с применением нескольких режимов обнаружения. Например, выбранные ионы могут быть обнаружены (т.е., с применением режима селективного мониторинга ионов (СМИ)) или, альтернативно, ионы могут быть обнаружены с применением режима сканирования, например, мониторинг множественных реакций (ММР) или мониторинг выбранной реакции (МБР).

[00607] Мониторинг множественных реакций -жидкостная хроматография (ЖХ-МС/ММР), в сочетании с разведением меченных стандартными изотопами стандартных образцов пептида показал себя как эффективный способ верификации белков (например, Keshishian et al., Mol Cell Proteomics 2009 8:2339-2349; Kuhn et al., Clin Chem 2009 55:1108-1117; Lopez et al., Clin Chem 2010 56:281-290; каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В отличие от ненаправленной масс-спектрометрии, обычно применяемой в исследованиях по разработке биомаркеров, методы направленной МС представляют собой базирующиеся на пептидной последовательности режимы МС, которые фокусируют полномасштабные аналитические возможности прибора на десятках или сотнях выбранных пептидов в сложной смеси. При ограничении обнаружения и фрагментации только пептидами, образованными из целевых белков, чувствительность и воспроизводимость резко повышаются, по сравнению с исследовательским режимом МС. Данный метод количественного определения белков на основе масс-спектрометрического мониторинга множественных реакций (ММР) может существенно влиять на открытие и количественное определение биомаркеров с помощью быстрого, направленного, мультиплексного построения профиля экспрессии белка для клинических образцов.

[00608] В одном варианте реализации биологический образец, который может содержать по меньшей мере один белок, кодируемый по меньшей мере одной модифицированной мРНК по настоящему изобретению, может быть проанализирован методом ММР-МС. Количественное определение биологического образца может дополнительно включать, без ограничений, меченные изотопами пептиды или белки в качестве внутренних стандартов.

[00609] В соответствии с настоящим изобретением, биологический образец, после получения от субъекта, может быть обработан ферментным расщеплением. В настоящем документе термин «расщепление» обозначает разрушение с образованием более коротких пептидов. В настоящем документе выражение «обработка образца с расщеплением белков» обозначает такой способ манипулирования образцом, при котором белки в образце разрушаются. Указанные ферменты включают, без ограничений, трипсин, эндопротеиназу Glu-C и химопритсин. В одном варианте реализации биологический образец, который может содержать по меньшей мере один белок, кодируемый по меньшей мере одной модифицированной мРНК по настоящему изобретению, может быть расщеплен с использованием ферментов.

[00610] В одном варианте реализации биологический образец, который может содержать белок, кодируемый модифицированной мРНК по настоящему изобретению, может быть проанализирован на предмет содержания белка с применением ионизации электрораспылением. В масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ИЭР) (МСИЭР) электрическая энергия применяется, чтобы способствовать переносу ионов из раствора в газообразную фазу, после чего их анализируют масс-спектрометрией. Образцы могут быть проанализированы с применением методов, известных из уровня техники (например, Ho et al., Clin Biochem Rev. 2003 24(1):3-12; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Ионизированные молекулы, содержащиеся в растворе, могут быть перенесены в газообразную фазу с помощью тонкодисперсного распыления заряженных капелек, испарения растворителя и выброса ионов из заряженных капелек с образованием тумана из капелек с высоким зарядом. Туман из капелек с высоким зарядом может быть проанализирован с применением по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 анализаторов массы, таких как, без ограничений, квадрупольный анализатор массы. Далее метод масс-спектрометрии может включать стадию очистки. В качестве неограничивающего примера, первый квадруполь может быть настроен таким образом, чтобы отбирать единичное соотношение m/z , т.е., он может отфильтровывать молекулярные ионы с другим соотношением m/z , что может позволить исключить сложные и требующие времени методики очистки образца перед анализом методом МС.

[00611] В одном варианте реализации биологический образец, который может содержать белок, кодируемый модифицированной мРНК по настоящему изобретению, может быть проанализирован на предмет содержания белка в системе тандемной МСИЭР (например, МС/МС). В качестве неограничивающих примеров, капельки могут быть проанализированы с использованием сканирования продукта (или дочернего сканирования), сканирования прекурсора (родительского сканирования), потери нейтральных частиц или мониторинга множественных реакций.

[00612] В одном варианте реализации биологический образец, который может содержать белок, кодируемый модифицированной мРНК по настоящему изобретению, может быть проанализирован с применением масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ) (МСМАЛДИ). МАЛДИ предлагает неразрушительное испарение и ионизацию молекул большого и небольшого размера, таких как белки. В анализе МАЛДИ, анализируемое вещество вначале сокристаллизуют со значительным молярным избытком матричного соединения, которое может также включать, без ограничений, абсорбирующую ультрафиолет слабую органическую кислоту. Неограничивающие примеры матриц, используемых в МАЛДИ представляют собой α -циано-4-гидроксикоричную кислоту, 3,5-диметокси-4-

гидроксикоричную кислоту и 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. Лазерное облучение смеси анализируемое вещество-матрица может приводить к испарению матрицы и анализируемого вещества. Индуцированная лазером десорбция обеспечивает высокие выходы иона интактного анализируемого вещества и позволяет проводить измерение веществ с высокой точностью. Образцы могут быть проанализированы с применением способов, известных из уровня техники (например, Lewis, Wei and Siuzdak, Encyclopedia of Analytical Chemistry 2000:5880-5894; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В качестве неограничивающих примеров, используемые в анализе МАЛДИ анализаторы массы могут включать линейный времяпролетный (ВПЛ), ВПЛ рефлектрон или анализатор массы с Фурье преобразованием.

[00613] В одном варианте реализации смесь анализируемое вещество-матрица может быть получена с применением метода высушенной капельки. Биологический образец смешивают с матрицей с образованием насыщенного раствора матрицы, в котором соотношение матрицы к образцу составляет приблизительно 5000:1. Затем аликвоте (приблизительно 0,5-2,0 мкл) насыщенного раствора матрицы дают высохнуть с образованием смеси анализируемое вещество-матрица.

[00614] В одном варианте реализации смесь анализируемое вещество-матрица может быть образована с применением метода тонкого слоя. Вначале образуется гомогенная пленка матрицы, после чего наносят образец, который может абсорбироваться матрицей с образованием смеси анализируемое вещество-матрица.

[00615] В одном варианте реализации смесь анализируемое вещество-матрица может быть получена с применением метода толстого слоя. Получают гомогенную пленку матрицы с добавлением в матрицу нитроцеллюлозы. После получения однородного слоя матрицы с нитроцеллюлозой наносят образец, который абсорбируется в матрицу с образованием смеси анализируемое вещество-матрица.

[00616] В одном варианте реализации смесь анализируемое вещество-матрица может быть получена с применением метода сэндвича. Тонкий слой кристаллов матрицы получают, как в методе тонкого слоя, с последующим добавлением капелек водной трифторуксусной кислоты, образца и матрицы. Далее образец абсорбируется в матрицу с образованием смеси анализируемое вещество-матрица.

Применение модифицированных молекул нуклеиновой кислоты Терапевтические агенты

[00617] Модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты и белки, транслированные из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящем документе, могут применяться в качестве терапевтических агентов. Например, модифицированная молекула нуклеиновой кислоты, раскрытая в настоящем документе, может быть введена субъекту, причем модифицированная молекула нуклеиновой кислоты транслируется *in vivo* с образованием терапевтического пептида в организме субъекта. Соответственно, в настоящем документе раскрыты составы, способы, наборы и реактивы для лечения или профилактики заболевания или состояний у человека и других млекопитающих. Активные терапевтические агенты согласно настоящему документу включают, без ограничений, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты клетки или транслированные из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты полипептиды, транслированные из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты полипептиды и клетки, которые контактировали с клетками, содержащими модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или полипептиды, транслированные из модифицированных молекул нуклеиновой кислоты.

[00618] В некоторых вариантах реализации раскрыты терапевтические составы, которые могут содержать одну или более модифицированных молекул нуклеиновой кислоты, содержащую транслируемые участки, вместе с белком, который индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность. В настоящем документе
5 «транслируемые участки» кодируют белок или белки, которые могут усиливать иммунитет субъекта. Например, в настоящем документе раскрыты терапевтические средства, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих трастузумаб и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). Конкретно, такие комбинированные терапевтические средства могут быть пригодными для применения
10 у больных Her2+ раком молочной железы, у которых развилась индуцированная резистентность к трастузумабу (см., например, Albrecht, Immunotherapy. 2(6):795-8 (2010); включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

[00619] Дополнительно раскрыты способы индукции трансляции рекомбинантного полипептида в популяции клеток с использованием модифицированных молекул
15 нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящем документе. Такая трансляция может происходить *in vivo*, *ex vivo*, *in culture* или *in vitro*. Популяция клеток может быть приведена в контакт с эффективным количеством состава, содержащего нуклеиновую кислоту, которая содержит по меньшей мере одну модификацию нуклеозида и транслируемый участок, кодирующий рекомбинантный полипептид. Популяция может
20 быть приведена в контакт в таких условиях, что нуклеиновая кислота может локализоваться в одной или более клеток популяции, и рекомбинантный полипептид может транслироваться в клетку из нуклеиновой кислоты.

[00620] Эффективное количество состава может быть предложено на основе, по меньшей мере частично, вида ткани-мишени, клетки-мишени, способа введения,
25 физических характеристик нуклеиновой кислоты (например, размер и степень модификации нуклеозидов) и других определяющих факторов. В общем, эффективное количество состава обеспечивает эффективную выработку белка в клетке, предпочтительно более эффективную, чем в случае состава, содержащего соответствующую немодифицированную молекулу нуклеиновой кислоты. Повышение
30 эффективности может быть продемонстрировано увеличением трансфекции клеток (т.е., процента клеток, трансфицированных нуклеиновой кислотой), увеличением трансляции белка из нуклеиновой кислоты, уменьшением разложения нуклеиновой кислоты (что демонстрируется, например, увеличением продолжительности трансляции белка из модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты) или снижением
35 природного иммунного ответа клетки-хозяина.

[00621] Аспекты настоящего документа направлены на способы индуцирования трансляции рекомбинантного полипептида *in vivo* в организме субъекта-млекопитающего, который в этом нуждается. В этом отношении, эффективное количество состава, содержащего нуклеиновую кислоту, которая содержит по меньшей
40 мере одну модификацию нуклеозида и транслируемый участок, кодирующий рекомбинантный полипептид, может быть введено субъекту с помощью способов доставки, раскрытых в настоящем документе. Нуклеиновая кислота может быть доставлена в таком количестве и в таких условиях, что нуклеиновая кислота локализуется в клетке субъекта, и рекомбинантный полипептид может быть
45 транслирован в клетке из нуклеиновой кислоты. Клетка, в которой локализуется нуклеиновая кислота, или ткань, в которой присутствует клетка, может быть мишенью в одном или более циклов введения нуклеиновой кислоты.

[00622] Другие аспекты настоящего документа относятся к трансплантации клеток,

содержащих модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, субъекту-млекопитающему. Введение клеток субъектам-млекопитающим известно средним специалистам из уровня техники и включает, без ограничений, локальную имплантацию (например, местное или подкожное введение), доставку в орган или системную инъекцию (например, внутривенная инъекция или ингаляция) и введение клеток в фармацевтически приемлемый носитель. Составы, содержащие модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, разрабатывают для внутримышечного, трансартериального, внутрибрюшинного, внутривенного, интраназального, подкожного, эндоскопического, трансдермального или интратекального введения. В некоторых вариантах реализации составы могут быть разработаны для замедленного высвобождения.

[00623] Субъект, которому может быть введен терапевтический агент, страдает от или может быть подвержен риску развития заболевания, расстройства или патологического состояния. Раскрыты способы идентификации, диагностики и классификации субъектов на этом основании, что может включать клиническую диагностику, уровни биомаркеров, полигеномное исследование ассоциаций (ПГИА) и другие способы, известные из уровня техники.

[00624] В некоторых вариантах реализации введенная модифицированная молекула нуклеиновой кислоты направляет выработку одного или более рекомбинантных полипептидов, обеспечивающих функциональную активность, которая могла в существенной мере отсутствовать в клетке, где рекомбинантный полипептид может быть транслирован. Например, отсутствующая функциональная активность по своей природе может быть ферментной, структурной или генно-регуляторной.

[00625] В других вариантах реализации введение модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты направляет выработку одного или более рекомбинантных полипептидов, заменяющих полипептид (или несколько полипептидов), который может в существенной мере отсутствовать в клетке, где может быть транслирован рекомбинантный полипептид. Такое отсутствие может быть результатом генетической мутации кодирующего гена или его регуляторного пути. Альтернативно, функция рекомбинантного полипептида антагонистична по отношению к активности эндогенного белка, присутствующего в клетке, на ее поверхности, или секретирующегося из клетки. Обычно, активность эндогенного белка может быть вредна для субъекта, например, вследствие мутации эндогенного белка, которая ведет к изменению активности или локализации. Дополнительно, рекомбинантный полипептид проявляет антагонизм, прямо или косвенно, в отношении активности биологического фрагмента, присутствующего в клетке, на ее поверхности или секретирующегося из клетки. Примеры антагонизируемых биологических фрагментов включают, без ограничений, липиды (например, холестерин), липопротеин (например, липопротеин низкой плотности), нуклеиновую кислоту, углевод или низкомолекулярный токсин.

[00626] Рекомбинантные белки, раскрытые в настоящем документе, могут быть сконструированы для локализации в пределах клетки, потенциально в пределах конкретного отсека, такого как ядро, или сконструированы для секреции из клетки или транслокации на плазматической мембране клетки.

[00627] Как раскрыто в настоящем документе, полезным признаком модифицированных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является способность снижать природный иммунный ответ клетки на экзогенную нуклеиновую кислоту. Раскрыты способы осуществления титрования, уменьшения или устранения иммунного ответа в клетке или популяции клеток. В некоторых вариантах реализации клетка может быть приведена в контакт с первым

составом, который содержит первую дозу первой экзогенной нуклеиновой кислоты, в том числе, транслируемый участок и по меньшей мере одну модификацию нуклеозида, и может быть определен уровень природного иммунного ответа клетки на первую экзогенную нуклеиновую кислоту. Затем, клетка может быть приведена в контакт со вторым составом, содержащим вторую дозу первой экзогенной нуклеиновой кислоты, причем вторая доза содержит меньшее количество первой экзогенной нуклеиновой кислоты, по сравнению с первой дозой. Альтернативно, клетка может быть приведена в контакт с первой дозой второй экзогенной нуклеиновой кислоты. Вторая экзогенная нуклеиновая кислота может содержать один или более модифицированных нуклеозидов, которые могут быть такими же или отличными, по сравнению с первой экзогенной нуклеиновой кислотой, или, альтернативно, вторая экзогенная нуклеиновая кислота может не содержать модифицированных нуклеозидов. Стадии контакта клетки с первым составом и/или вторым составом могут повторяться один или более раз. Дополнительно, эффективность выработки белка (например, трансляции белка) в клетке может быть необязательно определена, и клетка может быть повторно трансфицирована первым и/или вторым составом, до тех пор, пока не будет достигнута целевая эффективность выработки белка.

Терапевтические средства для заболеваний и состояний

[00628] В настоящем документе раскрыты способы лечения или профилактики симптома заболеваний, характеризующихся отсутствующей или aberrантной активностью белка, путем обеспечения отсутствующей активности белка или преодоления aberrантной активности белка. Благодаря быстрому началу выработки белка после введения модифицированной мРНК, по сравнению с вирусными ДНК векторами, соединения в соответствии с настоящим документом конкретно предпочтительны для лечения острых заболеваний, таких как сепсис, инсульт и инфаркт миокарда. Более того, аккуратное титрование белка может быть достижимо с применением модифицированной мРНК по настоящему изобретению, поскольку модифицированная мРНК может быть способна изменять скорости транскрипции и, таким образом, вызывать изменения в экспрессии гена.

[00629] Заболевания, характеризующиеся нарушенной или aberrантной активностью белка включают, без ограничений, рак и пролиферативные заболевания, генетические заболевания (например, цистофиброз), аутоиммунные заболевания, диабет, нейродегенеративные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания и метаболические заболевания. В настоящем документе раскрыт способ лечения таких состояний или заболеваний у субъекта путем введения нуклеиновой кислоты или терапевтических средств на основе клеток, содержащих модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе, причем модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют белок, который противодействует или иным способом преодолевает aberrантную белковую активность, присутствующую в клетке субъекта. Конкретные примеры дисфункции белка включают, без ограничений, варианты с бессмысленными мутациями цистофиброзного гена регулятора трансмембранной проводимости (ЦФТП), который продуцирует вариант белка ЦФТП с нарушенной функцией, вызывающий цистофиброз.

[00630] Множество заболеваний может характеризоваться отсутствующей (или в значительной степени сниженной, таким образом, что белок не осуществляет свою функцию должным образом) активностью белка. Такие белки могут отсутствовать или быть в значительной степени нефункциональными.

[00631] Таким образом, раскрыты способы лечения цистофиброза у субъекта-

млекопитающего путем приведения клетки субъекта в контакт с модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей транскрибируемый участок, который кодирует функциональный полипептид ЦФТП, в таких условиях, что эффективное количество полипептида ЦФТП присутствует в клетке. Предпочтительными клетками-мишенями являются эпителиальные клетки, например, легкого, и способы введения определяются с учетом ткани-мишени; т.е., для легочной доставки, молекулы РНК вводят в составы для ингаляций.

[00632] В другом варианте реализации раскрыт способ лечения гиперлипидемии у субъекта путем введения в популяцию клеток субъекта модифицированной молекулы мРНК, кодирующей Сортилин, белок, недавно описанный в исследованиях генома, что облегчает гиперлипидемию у субъекта. Ген SORT1 кодирует трансмембранный белок транс-Гольджи сети (ТГС) под названием Сортилин. В генетических исследованиях было показано, что у 1 из 5 индивидуумов присутствует полиморфизм одинарного нуклеотида, rs12740374, в локусе 1p13 гена SORT1, что вызывает предрасположенность к низким уровням липопротеина низкой плотности (ЛПНП) и липопротеина очень низкой плотности (ЛПОНП). Каждая копия минорной аллели, присутствующая приблизительно у 30% людей, меняет уровень холестерина ЛПНП на 8 мг/дл, тогда как две копии минорной аллели, присутствующие приблизительно у 5% населения, снижают уровень холестерина ЛПНП на 16 мг/дл. Кроме того, показано, что у носителей минорной аллели также на 40% снижен риск инфаркта миокарда. Функциональные исследования *in vivo* на мышах охарактеризовали чрезмерную экспрессию SORT1 в ткани печени у мышей как ведущую к значительно более низким уровням холестерина ЛПНП, со снижением вплоть до 80%, в то время как сайленсинг SORT1 повышает уровень холестерина ЛПНП приблизительно на 200% (Musunuru K et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. Nature 2010; 466: 714-721; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки).

Способы доставки нуклеиновой кислоты в клетку

[00633] Раскрытые в настоящем документе способы улучшают доставку нуклеиновой кислоты в популяцию клеток, *in vivo*, *ex vivo* или *in culture*. Например, культура клеток, содержащая множество клеток-хозяев (например, эукариотные клетки, такие как дрожжевые клетки или клетки млекопитающих) может быть приведена в контакт с композицией, содержащей модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит по меньшей мере одну модификацию нуклеозида и, необязательно, транскрибируемый участок. Состав, в общем, может дополнительно содержать реактив трансфекции или другое соединение, которое может повышать эффективность захвата модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты клетками-хозяевами. Модифицированная молекула нуклеиновой кислоты может демонстрировать повышенное удерживание в популяции клеток, по сравнению с соответствующей немодифицированной молекулой нуклеиновой кислоты. Удерживание модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты может превышать удерживание немодифицированной молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации оно превышает по меньшей мере приблизительно на 50%, 75%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200% или более чем 200% удерживание немодифицированной молекулы нуклеиновой кислоты. Такое преимущество в удерживании может быть достигнуто с помощью одного круга трансфекции модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты или может быть получено после повторных кругов трансфекции.

[00634] В некоторых вариантах реализации модифицированная молекула нуклеиновой кислоты может быть доставлена в популяцию клеток-мишеней с помощью одной или

более дополнительных нуклеиновых кислот. Такая доставка может осуществляться одновременно, или доставка модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты происходит перед доставкой одной или более дополнительных нуклеиновых кислот. Дополнительная одна или более нуклеиновых кислот может представлять собой модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или немодифицированную молекулу нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что начальное присутствие модифицированных молекул нуклеиновой кислоты может в существенной мере не вызывать природного иммунного ответа в популяции клеток и, более того, что природный иммунный ответ может не активироваться и позже в присутствии немодифицированных молекул нуклеиновой кислоты. С этой точки зрения, модифицированная нуклеиновая кислота сама по себе может не содержать транслируемого участка, если белок, присутствие которого в популяции клеток желательно, транслируется из немодифицированных молекул нуклеиновой кислоты.

Нацеливающие фрагменты

[00635] В некоторых вариантах реализации раскрыты модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые экспрессируют связывающегося с белком партнера или рецептор на поверхности клетки, функция которого может состоять в нацеливании клетки на конкретное тканевое пространство или во взаимодействии с конкретным фрагментом, *in vivo* или *in vitro*. Пригодные связывающиеся с белком партнеры включают, без ограничений, антитела и их функциональные фрагменты, платформенные белки или пептиды. Дополнительно, модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты могут использоваться, чтобы направлять синтез и внеклеточную локализацию липидов, углеводов или других биологических фрагментов.

Перманентный сайленсинг экспрессии гена

[00636] Способ эпигенетического сайленсинга экспрессии гена у субъекта-млекопитающего, включающий нуклеиновую кислоту, в которой транслируемый участок кодирует полипептид или полипептиды, способные направлять специфичное для конкретной последовательности метилирование H3 гистона для инициации образования гетерохроматина и уменьшения транскрипции гена для конкретных генов с целью сайленсинга гена. Например, мутация с приобретением функции в гене Янускиназы 2 ответственна за семейство миелопролиферативных заболеваний.

Экспрессия лиганда или рецептора на поверхности клетки

[00637] В некоторых аспектах и вариантах реализации аспектов, раскрытых в настоящем документе, модифицированная РНК может применяться для экспрессии лиганда или рецептора лиганда на поверхности клетки (например, хоминговый фрагмент). Фрагмент лиганда или рецептора лиганда, присоединенный к поверхности клетки, может позволить клетке осуществить желательное биологическое взаимодействие с тканью или агентом *in vivo*. Лиганд может представлять собой антитело, фрагмент антитела, аптамер, пептид, витамин, углевод, белок или полипептид, рецептор, например, рецептор на поверхности клетки, молекулу адгезии, гликопротеин, остаток сахара, терапевтический агент, лекарственное средство, гликозаминогликан или любую их комбинацию. Например, лиганд может быть антителом, которое распознает специфичный для раковых клеток антиген, что делает клетку способной предпочтительно взаимодействовать с опухолевыми клетками и позволяет опухоль-специфичную локализацию модифицированной клетки. Лиганд может придавать составу на основе клеток способность аккумулироваться в ткани, подлежащей лечению, поскольку предпочтительный лиганд может обладать способностью взаимодействовать с молекулой-мишенью на внешней поверхности ткани, подлежащей лечению. В общем,

предпочтительны лиганды с ограниченной перекрестной реактивностью в отношении других тканей.

[00638] В некоторых случаях, лиганд может выполнять роль хомингового фрагмента, который позволяет клетке нацеливаться на конкретную ткань или взаимодействовать с конкретным лигандом. Такие хоминговые фрагменты могут включать, без ограничений, любого члена конкретной пары связывания, антитела, моноклональные антитела или их производные или аналоги, в том числе, без ограничений: фрагменты Fv, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv), фрагменты Fab', фрагменты F(ab')₂, однодоменные антитела, верблюдообразованные антитела и фрагменты антител, гуманизированные антитела и фрагменты антител, а также поливалентные версии перечисленного; поливалентные связывающиеся реагенты, в том числе, без ограничений: моноспецифичные или биспецифичные антитела, такие как стабилизированные дисульфидной связью фрагменты Fv, тандемы scFv (фрагменты (SCFV)₂), диатела, триатела или тетратела, которые типично представляют собой соединенные ковалентной связью или стабилизированные иным способом (т.е., стабилизированные с помощью лейцинового zipper или спирали) фрагменты scFv; и другие хоминговые фрагменты включают, например, аптамеры, рецепторы и слитые белки.

[00639] В некоторых вариантах реализации хоминговый фрагмент может представлять собой связанное с поверхностью антитело, которое может позволять регулировку специфичности нацеливания клетки. Это особенно полезно, поскольку дает возможность получать высокоспецифичные антитела против целевого эпитопа для желательного сайта нацеливания. В одном варианте реализации множественные антитела экспрессируются на поверхности клетки, и каждое антитело может обладать собственной специфичностью в отношении желательной мишени. Такие подходы могут повышать avidность и специфичность хоминговых взаимодействий.

[00640] Квалифицированный специалист может выбрать любой хоминговый фрагмент на основе желательной локализации или функции клетки, например, лиганд эстрогенового рецептора, такой как тамоксифен, может нацеливать клетки на клетки эстроген-зависимого рака молочной железы, которые содержат повышенное количество рецепторов эстрогена на поверхности клетки. Другие неограничивающие примеры взаимодействия лиганд/рецептор включают CCR1 (например, для лечения воспаленных тканей сустава или мозга при ревматоидном артрите и/или множественном склерозе), CCR7, CCR8 (например, нацеливание на ткань лимфатического узла), CCR6, CCR9, CCR10 (например, для нацеливания на ткань кишечника), CCR4, CCR10 (например, для нацеливания на кожу), CXCR4 (например, для общего усиления трансмиграции), HCELL (например, для лечения воспаления и воспалительных расстройств, костный мозг), альфа4бета7 (например, для нацеливания на слизистую оболочку кишечника), VLA-4/VCAM-1 (например, нацеливание на эндотелий). В общем, любой рецептор, принимающий участие в нацеливании (например, метастаз рака) может быть пригодным для использования в способах и составах, раскрытых в настоящем документе.

Медиаторы гибели клеток

[00641] В одном варианте реализации состав на основе модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты может применяться для индукции апоптоза в клетке (например, раковой клетке) путем повышения экспрессии рецептора смерти, лиганда рецептора смерти или их комбинации. Данный способ может применяться для индукции гибели клетки в любой целевой клетке, и особенно пригоден для лечения рака, при котором клетки уклоняются от природных апоптотических сигналов.

[00642] Апоптоз может быть индуцирован множеством независимых путей проведения

сигнала, которые сходятся в финальный эффекторный механизм, состоящий из множественных взаимодействий между несколькими «рецепторами смерти» и их лигандами, которые принадлежат к суперсемейству рецептор/лиганд опухолевого некротического фактора (TNF). Лучше всего описаны рецепторы смерти CD95 («Fas»), TNFR1 (p55), рецептор смерти 3 (DR3 или Apo3/TRAMO), DR4 и DR5 (apo2-TRAIL-R2). Конечный эффекторный механизм апоптоза может представлять собой активацию серии протеиназ, названных каспазами. Активация указанных каспаз приводит к расщеплению серии жизненно важных клеточных белков и гибели клетки. Молекулярный механизм индуцированного рецепторами смерти/лигандами апоптоза хорошо известен из уровня техники. Например, опосредованный Fas/FasL апоптоз вызывается связыванием 3-х молекул FasL, что вызывает тримеризацию рецептора Fas через C-концевые домены смерти (ДС), которые, в свою очередь, осуществляют рекрутинг адаптерного белка FADD (Fas-связанный белок с доменом смерти) и Каспазы-8. Олигомеризация данного трехмолекулярного комплекса, Fas/FAIDD/каспаза-8, приводит к протеолитическому расщеплению профермента каспазы-8 до активной каспазы-8, которая, в свою очередь, инициирует процесс апоптоза посредством активации других каспаз, расположенных ниже в биохимическом пути, в том числе, каспазы-3. Лиганды смерти, в целом, являются апоптотическими, если они образуют тримеры или структуры более высокого порядка. Как мономеры, они могут служить антиапоптотическими агентами, конкурируя с тримерами за связывание с рецепторами смерти.

[00643] В одном варианте реализации состав на основе модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты кодирует рецептор смерти (например, Fas, TRAIL, TRAMO, TNFR, TLR и т.д.). Клетки, в которых индуцирована экспрессия рецептора смерти путем трансфекции модифицированной РНК, становятся уязвимыми к гибели, вызванной лигандом, который активирует указанный рецептор. Подобным образом, клетки с индуцированной экспрессией лиганда смерти, например, на поверхности клеток, будут вызывать гибель клеток, содержащих рецептор, при контакте трансфицированной клетки с клеткой-мишенью. В другом варианте реализации состав на основе модифицированной РНК кодирует лиганд рецептора смерти (например, FasL, TNF и т.д.). В другом варианте реализации состав на основе модифицированной РНК кодирует каспазу (например, каспазу 3, каспазу 8, каспазу 9 и т.д.). Если раковые клетки часто проявляют неспособность надлежащим образом дифференцироваться в непролиферирующую или контролируемо пролиферирующую форму, в другом варианте реализации, состав на основе синтетической, модифицированной РНК кодирует рецептор смерти и пригодный активирующий лиганд. В другом варианте реализации состав на основе синтетической, модифицированной РНК кодирует фактор дифференциации, который, при экспрессии в раковой клетке, такой как раковая стволовая клетка, будет вызывать дифференциацию клетки до непатогенного или не самовосстанавливающегося фенотипа (например, уменьшать скорость роста клетки, снижать интенсивность деления клетки и т.д.) или индуцировать переход клетки в клеточную фазу покоя (например, фазу отдыха G₀).

[00644] Специалисту в данной области будет понятно, что применение методов индукции апоптоза может потребовать соответствующего нацеливания модифицированных молекул нуклеиновой кислоты, например, на опухолевые клетки, с целью предупреждения нежелательного распространения гибели клеток. Таким образом, можно использовать механизм доставки (например, присоединенный лиганд или антитело, нацеленную липосому и т.д.), распознающий раковый антиген таким образом, что модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты экспрессируются

только в раковых клетках.

Наборы и устройства

Наборы

[00645] В изобретении раскрыто множество наборов для традиционного и/или эффективного осуществления способов по настоящему изобретению. Обычно, наборы будут содержать достаточные дозы и/или количество компонентов, что позволит пользователю проводить неоднократное лечение субъекта(ов) и/или проводить неоднократные эксперименты.

[00646] В одном из аспектов данного изобретения раскрыты наборы для выработки белка, содержащие первую модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или мРНК, содержащую транскрибируемый участок. Набор может дополнительно содержать упаковку и инструкции и/или агент доставки с образованием состава лекарственной формы. Агент доставки может включать раствор соли, буферный раствор, липидоид или любой агент доставки, раскрытый в настоящем документе.

[00647] В одном варианте реализации буферный раствор может содержать натрия хлорид, кальция хлорид, фосфат и/или ЭДТА. В другом варианте реализации буферный раствор может содержать, без ограничений, раствор соли, раствор соли с 2 мМ кальция, 5% раствор сахарозы, 5% раствор сахарозы с 2 мМ кальция, 5% раствор маннита, 5% раствор маннита с 2 мМ кальция, раствор Рингера с лактатом, раствор натрия хлорида, раствор натрия хлорида с 2 мМ кальция и маннозу (см., например, Публикацию США №20120258046; включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В другом варианте реализации буферные растворы могут быть осаждены или лиофилизированы. Количество каждого компонента может варьировать, чтобы создать возможность систематического, воспроизводимого получения раствора соли с более высокой концентрацией или простых буферных препаратов. Кроме того, порядок компонентов может варьировать с целью повышения стабильности модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и мРНК в буферном растворе на протяжении периода времени и/или в различных условиях.

[00648] В одном из аспектов данного изобретения предлагаются наборы для выработки белка, которые содержат: модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или мРНК, содержащую транскрибируемый участок, в количестве, эффективном для выработки желательного количества белка, кодируемого транскрибируемым участком, при введении в клетку-мишень; вторую модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или мРНК, содержащую ингибитор нуклеиновой кислоты, в количестве, эффективном для ингибирования в существенной мере природного иммунного ответа клетки; а также упаковку и инструкции.

[00649] В одном из аспектов данного изобретения раскрыты наборы для выработки белка, содержащие молекулу модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК, которая содержит транскрибируемый участок, причем для нуклеиновой кислоты характерно сниженное разложение клеточной нуклеазой, а также упаковку и инструкции.

[00650] В одном из аспектов данного изобретения раскрыты наборы для выработки белка, содержащие модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или мРНК, которая содержит транскрибируемый участок, причем для нуклеиновой кислоты характерно сниженное разложение клеточной нуклеазой, и клетку млекопитающего, пригодную для трансляции транскрибируемого участка первой нуклеиновой кислоты.

Устройства

[00651] В настоящем изобретении раскрыты устройства, в которые могут быть введены модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК, которые

кодируют целевые полипептиды. Указанные устройства содержат в форме стабильного препарата реагенты для синтеза нуклеиновой кислоты в препарате, доступном для немедленной доставки субъекту, который в этом нуждается, например, больному-человеку. Неограничивающие примеры такого целевого полипептида включают фактор роста и/или стимулятор ангиогенеза для заживления ран, пептидный антибиотик, способствующий контролю инфекции, и антиген для быстрой стимуляции иммунного ответа на недавно идентифицированный вирус.

[00652] В некоторых вариантах реализации устройство представляет собой автоматическое устройства, необязательно с возможностью беспроводного удаленного доступа для получения инструкций относительно синтеза и/или анализа полученной модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК. Устройство дает возможность мобильного синтеза по меньшей мере одной модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты или мРНК, и предпочтительно неограниченного количества различных модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК. В некоторых вариантах реализации устройство может транспортироваться одним или небольшой группой индивидуумов. В других вариантах реализации устройства масштабировано таким образом, чтобы соответствовать размерам стола или рабочего места. В других вариантах реализации устройство масштабировано таким образом, чтобы соответствовать размерам небольшого чемодана, рюкзака или объекта подобного размера.

[00653] В другом варианте реализации устройство может быть предназначено для размещения у постели больного или представлять собой карманное устройство. В дополнительных вариантах реализации устройство масштабировано таким образом, чтобы вмещаться в транспортное средство такое как автомобиль, большая грузовая машина или машина скорой помощи, или военное транспортное средство, такое как танк или персональное транспортное средство. Информация, необходимая для генерации модифицированной мРНК, кодирующей целевой полипептид, находится на машинно-считываемом носителе, присутствующем в устройстве.

[00654] В одном варианте реализации устройство может применяться для оценки уровней белка, который был введен в форме модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК. Устройство может содержать набор для анализа крови, мочи или другой биологической жидкости.

[00655] В некоторых вариантах реализации устройство способно коммуницировать (например, посредством беспроводной связи) с базой данных последовательностей нуклеиновых кислот и полипептидов. Устройство содержит по меньшей мере один блок образца для вставки в одну или более емкостей для образцов. Такие емкости для образцов могут принять любое количество материалов в жидкой или иной форме, например, шаблон ДНК, нуклеотиды, ферменты, буферы и другие реагенты. Кроме того, емкости для образцов также можно нагревать и охлаждать путем приведения в контакт с блоком для образцов. Блок для образцов, в общем, коммуникативно связан с основой устройства посредством одного или более контрольных электронных модулей по меньшей мере для одного блока образца. Блок образца предпочтительно содержит нагревательный модуль, причем такой нагревательный модуль может нагревать и/или охлаждать емкости с образцом и их содержимое до температуры от приблизительно -20С до свыше +100С. Основа устройства коммуникативно связана с источником электроэнергии, таким как аккумулятор или внешний источник электроэнергии. Кроме того, устройство оборудовано средствами для хранения и распределения материалов для синтеза РНК.

[00656] Блок образцов необязательно содержит модуль для разделения синтезированных нуклеиновых кислот. Альтернативно, устройство содержит модуль разделения, функционально связанный с блоком образцов. Предпочтительно, устройство оборудовано средствами для анализа синтезированной нуклеиновой кислоты. Такой анализ включает идентичность последовательности (демонстрируемую, например, посредством гибридизации), отсутствие нежелательных последовательностей, измерение целостности синтезированной мРНК (например, методом микроструйной вискозиметрии в сочетании со спектрофотометрией) и концентрации и/или активности модифицированной РНК (например, методом спектрофотометрии).

[00657] В некоторых вариантах реализации устройство объединено со средствами обнаружения патогенов, присутствующих в биологическом материале, полученном от субъекта, например, системой IBIS PLEX-ID (Abbott, Эбботт Парк, Иллинойс) для идентификации микроорганизмов.

[00658] Пригодные устройства для использования с целью внутрикожной доставки фармацевтических составов, раскрытых в настоящем документе, включают устройства с короткими иглами, такие как раскрытые в патентах США №№4886499; 5190521; 5328483; 5527288; 4270537; 5015235; 5141496; и 5417662; каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Составы для внутрикожного введения могут быть введены с помощью устройств, которые ограничивают глубину эффективного проникновения в кожу, таких как раскрытые в публикации РСТ WO 99/34850 (включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки) и их функциональные эквиваленты. Пригодными являются струйные инъекционные устройства, которые доставляют жидкие составы в кожу посредством струйного инжектора и/или с помощью иглы, которая прокалывает роговой слой и образует струю, достигающую дермы. Струйные инъекционные устройства раскрыты, например, в патентах США №№5480381; 5599302; 5334144; 5993412; 5649912; 5569189; 5704911; 5383851; 5893397; 5466220; 5339163; 5312335; 5503627; 5064413; 5520639; 4596556; 4790824; 4941880; 4940460; и публикациях РСТ WO 97/37705 и WO 97/13537; каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки. Пригодными являются баллистические устройства для доставки порошка/частиц, в которых применяется сжатый газ для ускорения проникновения вакцины в порошкообразной форме сквозь верхние слои кожи в дерму. Альтернативно или дополнительно, традиционные шприцы могут применяться в классическом методе внутрикожного введения Манту.

[00659] В некоторых вариантах реализации устройство может представлять собой насос или содержать катетер для введения соединений или составов по изобретению сквозь гематоэнцефалический барьер. Такие устройства включают, без ограничений, герметизированное устройство для интраназального введения, ионофоретические устройства, многослойные микроструйные устройства и т.п. Такие устройства могут быть портативными или стационарными. Они могут быть имплантируемыми или присоединяемыми к телу извне, или могут быть комбинацией обоих.

[00660] Устройства для введения могут применяться для доставки модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК по настоящему изобретению в соответствии с однократными, многократными схемами или схемами с разделенными дозами, раскрытыми в настоящем документе. Такие устройства раскрыты ниже.

[00661] Способ и устройства, известные из уровня техники для введения множественных доз в клетки, органы и ткани, предусмотрены для использования в сочетании со способами и составами, раскрытыми в настоящем документе, в качестве вариантов реализации настоящего изобретения. Это включает, например, способы и

устройства с несколькими иглами, гибридные с использованием, например, люменов или катетеров, а также устройства с использованием механизмов, приводимых в действие теплом, электрическим током или облучением.

5 [00662] В соответствии с настоящим изобретением, такие устройства для введения множественных доз могут применяться для доставки одинарных, множественных или разделенных доз, предусмотренных в настоящем документе.

[00663] Способ доставки терапевтических агентов в солидную ткань раскрыт Bahrami с соавт. и описан, например, в Патентной публикации США №20110230839, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Bahrami, массивом игл оборудуют устройство, которое доставляет в значительной 10 степени равные количества жидкости в любой участок указанной солидной ткани, вдоль длины каждой иглы.

[00664] Устройство для доставки биологического материала сквозь биологическую ткань раскрыто Kodgule с соавт. и описано, например, в Патентной публикации США 15 №20110172610, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Kodgule, множественными полыми микроиглами, изготовленными из одного или более металлов, с внешним диаметром от приблизительно 200 мкм до приблизительно 350 мкм и длиной по меньшей мере 100 мкм оборудовано устройство, которое доставляет пептиды, белки, углеводы, молекулы нуклеиновой 20 кислоты, липиды и другие фармацевтически активные ингредиенты или их комбинации.

[00665] Доставочный зонд для доставки терапевтического агента в ткань раскрыт Gunday с соавт. и описан, например, в Патентной публикации США №20110270184, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Gunday, множественными иглами оборудовано устройство, которое 25 перемещает присоединенные капсулы между активированным положением и инактивированным положением, чтобы вынудить выход агента из капсулы через иглы.

[00666] Мульти-инъекционный медицинский аппарат раскрытых Assaf и описан, например, в Патентной публикации США №20110218497, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Assaf, 30 множественными иглами оборудовано устройство, содержащее камеру, которая соединена с одной или более из указанных игле, и средства для непрерывного заполнения камеры медицинской жидкостью после каждой инъекции.

[00667] В одном варианте реализации модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или ммРНК вводят подкожно или внутримышечно, по меньшей мере через 3 35 иглы, в 3 различных, необязательно смежных участках, одновременно или в пределах периода 60 минут (например, введение в 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 участков одновременно или в пределах периода 60 минут). Разделенные дозы могут быть введены одновременно в смежную ткань с использованием устройств, раскрытых в Патентных публикациях США №№20110230839 и 20110218497, каждая из которых включена в настоящий 40 документ в полном объеме посредством ссылки.

[00668] По меньшей мере частично имплантируемая система для инъекционного введения субстанции в организм больного, в частности, система стимуляции эрекции пениса, раскрыта Forsell и описана, например, в Патентной публикации США №20110196198, содержание которой включено в данное описание в полном объеме 45 посредством ссылки. Как указано Forsell, множественными иглами оборудовано устройство, которое имплантируется, вместе с одним или более хомутов, смежно с левым и правым кавернозными телами больного. Также имплантируются резервуар и насос для поставки лекарственного средства сквозь иглы.

[00669] Способ трансдермального введения терапевтически эффективного количества железа раскрыт Verenson и описан, например, в Патентной публикации США №20100130910, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Verenson, множественные иглы могут использоваться для создания множественных микроканалов в роговом слое для повышения эффективности трансдермальной доставки ионов железа на ионофоретическом пластыре.

[00670] Способ введения биологического материала сквозь биологическую ткань раскрыт Kodgule с соавт. и описан, например, в Патентной публикации США №20110196308, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Kodgule, множественными биоразлагаемыми микроиглами, содержащими терапевтически активный ингредиент, оборудовано устройство, которое доставляет белки, углеводы, молекулы нуклеиновой кислоты, липиды и другие фармацевтически активные ингредиенты или их комбинации.

[00671] Трансдермальный пластырь, содержащий состав на основе ботулинического токсина, раскрыт Donovan и описан, например, в Патентной публикации США №20080220020, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Donovan, множественными иглами снабжен пластырь, который доставляет ботулинический токсин под роговой слой сквозь указанные иглы, которые выпускают его сквозь роговой слой без повреждения кровеносного сосуда.

[00672] Одноразовый резервуар небольшого размера для лекарственного средства или пластырный насос, который может удерживать приблизительно 0,2-15 мл жидких препаратов, может размещаться на коже и доставлять состав непрерывно подкожно, с использованием небольших отверстий (например, калибра 26-34). В качестве неограничивающих примеров, пластырный насос может быть размером 50 мм × 76 мм × 20 мм с пружинной оттяжкой и содержать иглу калибра 30-34 (BD™ Microinfuser, Франклин Лейке, Нью-Джерси), 41 мм × 62 мм × 17 мм с резервуаром емкостью 2 мл для доставки лекарственного средства, такого как инсулин (OMNIPOD®, Insulet Corporation, Бедфорд, Массачусетс) или диаметром 43-60 мм, толщиной 10 мм, с резервуаром емкостью 0,5-10 мл (PATCHPUMP®, SteadyMed Therapeutics, Сан Франциско, Калифорния). Кроме того, пластырный насос может снабжаться электричеством от батареи и/или аккумулятора.

[00673] Криозонд для введения активного агента в участок криогенной терапии раскрыт Toubia и описан, например, в Патентной публикации США №20080140061, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Toubia, зонд, который получает активный агент в камеру и вводит агент в ткань, оборудован множественными иглами.

[00674] Способ лечения или профилактики воспаления или улучшения здоровья суставов раскрыт Stock с соавт. и описан, например, в Патентной публикации США №20090155186, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Stock, устройство, с помощью которого вводят состав, содержащий соединения, модулирующие трансдукцию сигнала, оборудовано множественными иглами.

[00675] Мульти-инъекционная система раскрыта Kimmell с соавт. и описана, например, в Патентной публикации США №20100256594, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Kimmell, устройство для введения лекарственного средства в роговой слой с помощью игл оборудовано множественными иглами.

[00676] Способ доставки интерферонов во внутрикожный отсек раскрыт Dekker с

соавт. и описан, например, в Патентной публикации США №20050181033, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Dekker, множественными иглами с отверстием, эффективная высота которого составляет 0-1 мм, оборудовано устройство для улучшения фармакокинетики и биодоступности посредством доставки субстанции на глубину от 0,3 мм до 2 мм.

[00677] Способ введения генов, ферментов и биологических агентов в клетки ткани раскрыт Desai и описан, например, в Патентной публикации США №20030073908, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Desai, множественными иглами оборудовано устройство, которое вставляют в тело, и доставку жидкого лекарственного средства осуществляют сквозь указанные иглы.

[00678] Способ лечения сердечных аритмий клетками фибробластов раскрыт Lee с соавт. и описан, например, в Патентной публикации США №20040005295, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Lee, множественными иглами оборудовано устройство для введения клеток фибробластов в локальный участок ткани.

[00679] Способ с использованием управляемого магнитами насоса для лечения опухоли мозга раскрыт Shachar с соавт. и описан, например, в патентах США №№7799012 (способ) и 7799016 (устройство), содержание которых включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Shachar, множественными иглами оборудован насос, который выталкивает лекарственное средство сквозь иглы с контролируемой скоростью.

[00680] Способы лечения функциональных расстройств мочевого пузыря у самок млекопитающих раскрыты Versi с соавт. и описаны, например, в патенте США №8029496, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Versi, массивом микроигл оборудовано устройство для доставки терапевтического агента сквозь иглы непосредственно в треугольник мочевого пузыря.

[00681] Микроигольное устройство для трансдермального транспорта раскрыто Angel с соавт. и описано, например, в патенте США №7364568, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Angel, множественными иглами оборудовано устройство, которое переносит субстанцию в поверхность тела сквозь иглы, которые вставлены в поверхность с различных направлений. Микроигольное устройство для трансдермального транспорта может представлять собой систему твердых микроигл или систему полых микроигл. В качестве неограничивающего примера, емкость системы твердых микроигл может составлять 0,5 мг, т.е., 300-1500 твердых микроигл на см², высотой приблизительно 150-700 мкм, покрытые лекарственным средством. Микроиглы проникают в роговой слой и остаются в коже на короткое время (например, от 20 с до 15 минут). В другом примере, емкость системы полых микроигл для доставки жидких препаратов составляет до 3 мл, с использованием 15-20 микроигл на см², высотой приблизительно 950 мкм. Микроиглы проникают в кожу и позволяют жидкому препарату вытекать из устройства в кожу. Система полых микроигл может доставлять препарат в течение 1-30 минут, в зависимости от объема и вязкости состава.

[00682] Устройство для подкожной инфузии раскрыто Dalton с соавт. и описано, например, в патенте США №7150726, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Dalton, множественными иглами оборудовано устройство для введения жидкости сквозь иглы в подкожную ткань.

[00683] Устройство и способ для внутрикожной доставки вакцин и агентов генной терапии сквозь микроканюлю раскрыты Mikszta с соавт. и описаны, например, в патенте США №7473247, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Mitszta, по меньшей мере одной поллой микроиглой оборудовано устройство для введения вакцин в кожу субъекта на глубину от 0,025 мм до 2 мм.

[00684] Способ доставки инсулина раскрыт Pettis с соавт. и описан, например, в патенте США №7722595, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Pettis, двумя иглами оборудовано устройство, в котором обе иглы одновременно вставляются в кожу, первая на глубину менее 2,5 мм для введения инсулина во внутрикожный отсек, и вторая на глубину более 2,5 мм, но менее 5,0 мм для введения инсулина в подкожный отсек.

[00685] Введение инъекцией в кожу под вакуумом раскрыто Kochamba с соавт. и описано, например, в патенте США №6896666, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Kochamba, устройство для инъекционного введения жидкости ниже слоя кожи оборудовано множественными иглами, относительно смежными друг по отношению к другу.

[00686] Устройство для отбора образцов или доставки субстанции сквозь кожу раскрыто Down с соавт. и описано, например, в патенте США №6607513, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Down, устройство оборудовано множественными модулями, проникающими в кожу, длиной от приблизительно 100 мкм до приблизительно 2000 мкм, калибра 30-50.

[00687] Устройство для доставки вещества в кожу раскрыто Palmer с соавт. и описано, например, в патенте США №6537242, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Palmer, массивом микроигл оборудовано устройство, в котором используется натяжная сборка для улучшения контакта игл с кожей, что обеспечивает более однородную доставку вещества.

[00688] Перфузионное устройство для локализованной доставки лекарственного средства раскрыто Zamoyski и описан, например, в патенте США №6468247, содержание которого включено в данное описание в полном объеме, посредством ссылки. Как указано Zamoyski, множественными гиподермическими иглами оборудовано устройство для инъекционного введения содержимого гиподермических игл в ткань, по мере обратного хода указанных гиподермических игл.

[00689] Способ улучшения транспорта лекарственных средств и биологических молекул сквозь ткань посредством улучшения взаимодействия между микроиглами и кожей человека раскрыт Prausnitz с соавт. и описан, например, в патенте США №6743211, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Prausnitz, множественными микроиглами оборудовано устройство, которое может присутствовать на более жесткой и менее деформируемой поверхности, на которую воздействуют микроиглы.

[00690] Устройство для введения лекарственных средств в органы раскрыто Ting с соавт. и описано, например, в патенте США №6077251, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Ting, множественными иглами с боковыми отверстиями для более эффективного введения оборудовано устройство, которое посредством выдвигания и обратного хода указанных игл наружу и внутрь камеры игл вынуждает лекарственное средство выходить из резервуара в указанные иглы, и осуществляет инъекционное введение указанного

лекарственного средства в орган-мишень.

[00691] Многоигольный держатель и многоканальный порт для подкожной инфузии раскрыт Brown и описан, например, в патенте США №4695273, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Brown, множественные иглы на держателе игл вставляются в перегородку инфузионного порта и соединяются с изолированными камерами в указанном инфузионном порту.

[00692] Двойной гиподермический шприц раскрыт Horn и описан, например, в патенте США №3552394, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Horn, две иглы, которыми оборудовано устройство, размещены на расстоянии менее 68 мм и могут иметь различную конфигурацию и длину, что позволяет осуществлять инъекции на различную глубину.

[00693] Шприц со множественными иглами и несколькими отделениями для жидкости раскрыт Hershberg и описан, например, в патенте США №3572336, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Hershberg, множественными иглами оборудован шприц, содержащий несколько отделений для жидкости и позволяющий одновременно вводить несовместимые лекарственные средства, которые нельзя смешивать для одной инъекции.

[00694] Хирургический инструмент для внутрикожных инъекций жидкостей раскрыт Eliscu с соавт. и описан, например, в патенте США №2588623, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Eliscu, множественными иглами оборудован инструмент для инъекционного введения жидкостей, внутрикожного с широким разбросом.

[00695] Аппарат для одновременной доставки вещества в несколько протоков молочной железы раскрыт Hung и описан, например, в EP 1818017, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Hung, множественными люменами оборудовано устройство, которое вставляется в устья сетей протоков и доставляет жидкости в сети протоков.

[00696] Катетер для введения лекарственных средств в ткань сердца или других органов раскрыт Tkebuchava и описан, например, в WO 2006138109, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Tkebuchava, присутствуют две изогнутых иглы, которые проникают в стенку органа по сглаженной траектории.

[00697] Устройства для доставки лекарственных средств раскрыты Mckay с соавт. и описаны, например, в WO 2006118804, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Mckay, множественными иглами с несколькими устьями на каждой игле оборудовано устройство для облегчения регионарной доставки в ткань, например, внутреннее пространство межпозвонкового диска.

[00698] Способ непосредственной доставки иммуномодулирующего вещества во внутрикожное пространство кожи млекопитающих раскрыт Pettis и описан, например, в WO 2004020014, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Pettis, множественными иглами оборудовано устройство для введения вещества сквозь иглы на глубину от 0,3 мм до 2 мм.

[00699] Способы и устройства для введения веществ по меньшей мере в два отсека кожи для системной абсорбции и улучшения фармакокинетики раскрыты Pettis с соавт. и описаны, например, в WO 2003094995, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Pettis, множественными иглами длиной от приблизительно 300 мкм до приблизительно 5 мм оборудовано

устройство для одновременного введения во внутрикожный и подкожный отсеки ткани.

[00700] Устройство для доставки лекарственного средства, оборудованное иглами и роллером, раскрыто Zimmerman с соавт. и описано, например, в WO 2012006259, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Zimmerman, множественными полыми иглами, размещенными в роллере, оборудовано устройство для введения содержимого резервуара сквозь иглы по мере вращения роллера.

[00701] Устройство для доставки лекарственного средства, такое как стент, известно из уровня техники и описано, например, в Публикациях США №№ US 20060020329, US 20040172127 и US 20100161032; содержание которых включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Составы на основе модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и мРНК, раскрытых в настоящем документе, могут быть доставлены с использованием стентов. Дополнительно, стенты, применяемые в настоящем изобретении, могут обеспечивать возможность доставки множества модифицированных молекул нуклеиновой кислоты и/или составов с одной и той же или различной скоростью доставки. Неограничивающие примеры производителей стентов включают CORDIS® (Майами, Флорида) (CYPHER®), Boston Scientific Corporation (Натик, Массачусетс) (TAXUS®), Medtronic (Миннеаполис, Миннесота) (ENDEAVOUR®) и Abbott (Эбботт Парк, Иллинойс) (XIENCE V®).

Способы и устройства с использованием катетеров и/или люменов

[00702] Способы и устройства с использованием катетеров и люменов могут применяться для введения мРНК по настоящему изобретению в однодозовых, многодозовых схемах или схемах с разделенными дозами. Такие способы и устройства раскрыты ниже.

[00703] Доставка с помощью катетера скелетных миобластов в миокард пораженного сердца раскрыта Jacoby с соавт. и описана, например, в Патентной публикации США №20060263338, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Jacoby, множественными иглами оборудовано устройство, по меньшей мере часть которого вставляют в кровеносный сосуд, и доставляют состав, содержащий клетки, сквозь иглы в локализованный участок сердца субъекта.

[00704] Аппарат для лечения астмы с применением нейротоксина раскрыт Deem с соавт. и описан, например, в Патентной публикации США №20060225742, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Deem, множественными иглами оборудовано устройство для введения нейротоксина сквозь иглы в ткань бронхов.

[00705] Способ введения многокомпонентных терапевтических средств раскрыт Nayak и описан, например, в патенте США №7699803, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Nayak, множественными инъекционными канюлями может быть оборудовано устройство, в котором высота паза используется для контроля глубины доставки терапевтической субстанции в ткань.

[00706] Хирургическое устройство для иссечения канала и доставки по меньшей мере одного терапевтического агента в желательный участок ткани раскрыто McIntyre с соавт. и описано, например, в патенте США №8012096, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано McIntyre, множественными иглами оборудовано устройство для отпуска терапевтического агента в участок ткани, окружающий канал, которое является особенно пригодным для

операций по трансмиокардиальной реваскуляризации.

[00707] Способы лечения функциональных расстройств мочевого пузыря у самок млекопитающих раскрыты Versi с соавт. и описаны, например, в патенте США №8029496, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Versi, массивом микроигл оборудовано устройство для введения терапевтического агента сквозь иглы непосредственно в треугольник мочевого пузыря.

[00708] Устройство и способ для доставки жидкости в гибкий биологический барьер раскрыты Yeshurun с соавт. и описаны, например, в патентах США №7998119 (устройство) и 8007466 (способ), содержание которых включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Yeshurun, микроиглы на устройстве проникают и выдвигаются в гибкий биологический барьер, и жидкость вводится инъекционным способом сквозь отверстия в полых микроиглах.

[00709] Способ введения вещества эпикардиальной инъекцией в участок ткани сердца с эпикардиальной поверхностью, с распределением в пределах туловища, раскрыт Bonner с соавт. и описан, например, в патенте США №7628780, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Bonner, устройства оборудованы удлиненными стволами и дистальными инъекционными головками для направления игл в ткань и инъекционного введения лекарственных средств в ткань сквозь иглы.

[00710] Устройство для закрытия прокола раскрыто Nielsen с соавт. и описано, например, в патенте США №7972358, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Nielsen, множественными иглами оборудовано устройство для введения запечатывающего агента в ткань, окружающую канал прокола.

[00711] Способ миогенеза и ангиогенеза раскрыт Chiu с соавт. и описан, например, в патенте США №6551338, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Chiu, от 5 до 15 иглами с максимальным диаметром по меньшей мере 1,25 мм и длиной, эффективной для осуществления прокола на глубину 6-20 мм, оборудовано устройство, которое вставляется поблизости миокарда и доставляет экзогенный ангиогенный или миогенный фактор в указанный миокард сквозь каналы, которые представляют собой по меньшей мере некоторые из указанных игл.

[00712] Способ лечения ткани предстательной железы раскрыт Bolmsj с соавт. и описан, например, в патенте США №6524270, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Bolmsj, устройство, оборудованное катетером, который вставляется сквозь уретру, снабжено по меньшей мере одним полым наконечником, выдвигаемым в окружающую ткань предстательной железы. Вяжущее и анальгетическое лекарственное средство вводится сквозь указанный наконечник в указанную ткань предстательной железы.

[00713] Способ инфузии жидкостей в участок внутри кости раскрыт Findlay с соавт. и описан, например, в патенте США №6761726, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Findlay, множественными иглами оборудовано устройство, которое обеспечивает возможность проникновения сквозь твердую оболочку материала, покрытую слоем мягкого материала, и доставки жидкости на предварительно определенное расстояние под указанную твердую оболочку материала.

[00714] Устройство для инъекции лекарственных средств в стенку сосуда раскрыто

Vigil с соавт. и описано, например, в патенте США №5713863, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Vigil, множественные инжекторы смонтированы на каждой из гибких трубок в устройстве для введения жидкого лекарственного средства сквозь многоканальный катетер, в
5 указанные гибкие трубки и наружу из указанных инжекторов для инфузии в стенку сосуда.

[00715] Катетер для доставки терапевтических и/или диагностических агентов в ткань, окружающую каналы тела, раскрыт Faxon с соавт. и описан, например, в патенте США №5464395, содержание которого включено в данное описание в полном объеме
10 посредством ссылки. Как указано Faxon, по меньшей мере одной игольчатой канюлей оборудован катетер для доставки желательных агентов в ткань сквозь указанные иглы, которые выдвигаются наружу из катетера.

[00716] Баллонные катетеры для доставки терапевтических агентов раскрыты Orr и описаны, например, в WO 2010024871, содержание которой включено в данное описание
15 в полном объеме посредством ссылки. Как указано Orr, множественными иглами оборудованы устройства для доставки терапевтических агентов на различную глубину в пределах ткани. В другом аспекте баллоны, из которых вымывается лекарственное средство, могут применяться для доставки составов, раскрытых в настоящем документе. Баллоны, из которых вымывается лекарственное средство, могут применяться в способах
20 воздействия на пораженный участок, таких как, без ограничений, внутривенный рестеноз, лечение поражения извилистых сосудов, бифуркационного поражения, поражения бедренной/подколенной артерии и поражения, расположенного ниже колена.

[00717] Устройство для доставки терапевтических агентов (например, модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или мРНК) в ткань вблизи просвета
25 раскрыто Perry с соавт. и описано, например, в Патентной публикации США № US 20100125239, содержание которой включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Как указано Perry, катетер оборудован баллоном, который может быть покрыт терапевтическим агентом с помощью способов, известных из уровня техники и раскрытых Perry. При расширении баллона, терапевтический агент будет
30 контактировать с окружающей тканью. Устройство может быть дополнительно снабжено источником нагревания для изменения температуры покрытия на баллоне с целью высвобождения терапевтического агента в ткань.

Способы и устройства с применением электрического тока

[00718] Способы и устройства с применением электрического тока могут применяться
35 для доставки мРНК по настоящему изобретению в соответствии с однократными, многократными схемами или схемами с разделенными дозами, раскрытыми в настоящем документе. Такие способы и устройства раскрыты ниже.

[00719] Устройство для терапии электроиндукцией коллагена раскрыто Marquez и описано, например, в Патентной публикации США №20090137945, содержание которой
40 включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Marquez, множественными иглами оборудовано устройство, которое повторно прокалывает кожу и втягивает внутрь кожи порцию вещества, которая предварительно была нанесена на кожу.

[00720] Электрокинетическая система раскрыта Etheredge с соавт. и описана, например,
45 в Патентной публикации США №20070185432, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Etheredge, микроиглами оборудовано устройство, которое с помощью электрического тока доставляет лекарственное средство сквозь иглы в целевой участок, подлежащий лечению.

[00721] Ионофоретическое устройство раскрыто Matsumura с соавт. и описано, например, в патенте США №7437189, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Matsumura, множественными иглами оборудовано устройство для доставки ионизируемого лекарственного средства в живой организм с высокой скоростью или высокой эффективностью.

[00722] Внутрикожная доставка биологически активных агентов безыгольной инъекцией и электропорацией раскрыта Hoffmann с соавт. и описана, например, в патенте США №7171264, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Hoffmann, одним или более безыгольных инжекторов оборудовано устройство для электропорации, и комбинация безыгольной инъекции и электропорации достаточна для введения агента в клетки кожи, мышцы или слизистой оболочки.

[00723] Способ опосредованной электропермеабиллизацией внутриклеточной доставки раскрыт Lundkvist с соавт. и описан, например, в патенте США №6625486, содержание которого включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Lundkvist, парой игольных электродов оборудован катетер. Указанный катетер размещают в просвете сосуда, с последующим выдвиганием указанных игольных электродов, которые проникают в ткань, окружающую указанный просвет. Затем устройство вводит агент сквозь по меньшей мере один из указанных игольных электродов и воздействует электрическим полем, образованным указанной парой игольных электродов, чтобы позволить указанному агенту пройти сквозь клеточные мембраны в клетки подлежащего лечению участка.

[00724] Система доставки для трансдермальной иммунизации раскрыта Levin с соавт. и описана, например, в WO 2006003659, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Levin, множественными электродами оборудовано устройство для воздействия электрической энергией в пространстве между электродами с целью генерации микроканалов в коже и облегчения трансдермальной доставки.

[00725] Способ доставки радиочастотной энергии в кожу раскрыт Schomacker и описан, например, в WO 2011163264, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Как указано Schomacker, множественными иглами оборудовано устройство, которое использует вакуум с целью приведения кожи в контакт с пластиной таким образом, что иглы проникают в кожу сквозь отверстия в пластине и доставляют радиочастотную энергию.

35 Определения

[00726] В различных местах настоящего описания, заместители в соединениях по настоящему изобретению раскрыты в группах или интервалах. Конкретно предусматривается, что настоящий документ включает все и каждую отдельную подкомбинацию членов таких групп и интервалов. Например, термин «C₁₋₆алкил» конкретно предназначен индивидуально раскрывать метил, этил, C₃алкил, C₄алкил, C₅алкил и C₆алкил.

[00727] Около: в настоящем документе термин «около» обозначает +/-10% от указанного значения.

[00728] Вводимый в комбинации: в настоящем документе термин «вводимый в комбинации» или «сочетанное введение» обозначает, что два или более агентов (например, модифицированная нуклеиновая кислота или мРНК, кодирующая противомикробный полипептид (например, антибактериальный полипептид), например,

противомикробный полипептид, раскрытый в настоящем документе, и противомикробный агент (например, противомикробный полипептид или низкомолекулярное противомикробное соединение, раскрытое в настоящем документе)) вводят субъекту в одно и то же время или в пределах такого интервала, что может происходить наложение эффектов каждого из агентов в организме больного. В некоторых вариантах реализации их вводят с интервалом приблизительно 60, 30, 15, 10, 5 или 1 минута. В некоторых вариантах реализации введение агентов осуществляется достаточно близко во времени, чтобы достигнуть комбинированного (например, синергетического) эффекта.

[00729] Животное: в настоящем документе, термин «животное» обозначает любого члена царства животных. В некоторых вариантах реализации «животное» обозначает людей на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации «животное» обозначает негуманоидных животных на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации негуманоидное животное является млекопитающим (например, грызун, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, овца, теленок, примат или свинья). В некоторых вариантах реализации животные включают, без ограничений, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб и червей. В некоторых вариантах реализации животное является трансгенным животным, генно-модифицированным животным или клоном.

[00730] Целевые антигены или желательные антигены: в настоящем документе термины «целевые антигены» или «желательные антигены» включают белки и другие биомолекулы, раскрытые в настоящем документе, с которыми иммуноспецифично связываются антитела и их фрагменты, мутанты, варианты и модификации, раскрытые в настоящем документе. Примеры целевых антигенов включают, без ограничений, инсулин, инсулиноподобный фактор роста, hGH, tPA, цитокины, такие как интерлейкины (IL), например, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, интерферон (IFN) альфа, IFN бета, IFN гамма, IFN омега или IFN тау, опухолевый некротический фактор (TNF), например, TNF альфа и TNF бета, TNF гамма, TRAIL; G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 и VEGF.

[00731] Приблизительно: в настоящем документе, термин «приблизительно» или «около», в применении к одному или более целевых значений, обозначает значение, подобное исходному референтному значению. В некоторых вариантах реализации термин «приблизительно» или «около» обозначает интервал значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любом направлении (более чем или менее чем) от указанного референтного значения, если не указано иное или если иное не диктуется контекстом (за исключением случаев, где такое число будет превышать 100% возможного значения).

[00732] Связанный (ассоциированный) с: в настоящем документе термин «связанный (ассоциированный) с», «конъюгированный», «соединенный», «присоединенный» и «привязанный», при применении в отношении двух или более фрагментов, означает, что фрагменты физически связаны или соединены друг с другом, непосредственно или посредством одного или более дополнительных фрагментов, которые служат линкерными агентами, с образованием структуры, которая является достаточно стабильной, таким образом, что фрагменты остаются физически соединенными в условиях применения структуры, например, физиологических условиях. «Соединение (ассоциация)» не обязательно жестко ограничивается ковалентной химической связью. Оно может указывать на ионную или водородную связь или гибридационное

соединение, достаточно стабильное для того, чтобы «соединенные (ассоциированные)» молекулы оставались физически соединенными.

[00733] Бифункциональный: в настоящем документе термин «бифункциональный» обозначает любое вещество, молекулу или фрагмент, способный осуществлять или поддерживать по меньшей мере две функции. Функции могут быть направлены на достижение одного и того же результата или различных результатов. Строение, которое обеспечивает функцию, может быть одинаковым или различным. Например, бифункциональная модифицированная РНК по настоящему изобретению может кодировать цитотоксичный пептид (первая функция), тогда как нуклеозиды, содержащиеся в кодирующей РНК, сами по себе являются цитотоксичными (вторая функция). В данном примере, доставка бифункциональной модифицированной РНК в раковую клетку будет приводить к выработке не только пептидной или белковой молекулы, которая может облегчать или лечить рак, но будет также доставлять полезную нагрузку цитотоксичных нуклеозидов в клетку, таким образом, что это будет вести к разложению, вместо трансляции модифицированной РНК.

[00734] Биосовместимый: в настоящем документе термин «биосовместимый» обозначает совместимость с живыми клетками, тканями, органами или системами, с невысоким или отсутствующим риском повреждения, токсичности или отторжения иммунной системой.

[00735] Биоразлагаемый: в настоящем документе, термин «биоразлагаемый» обозначает способность к разложению на нетоксичные продукты в условиях живых организмов.

[00736] Биологически активный: в настоящем документе выражение «биологически активный» обозначает характеристику любого вещества, которое проявляет активность в биологической системе и/или организме. Например, вещество, которое, при введении в организм, оказывает биологическое воздействие на этот организм, рассматривается как биологически активное. В конкретных вариантах реализации модифицированная нуклеиновая кислота или ммРНК по настоящему изобретению может рассматриваться как биологически активная, если даже часть модифицированной нуклеиновой кислоты или ммРНК является биологически активной или имитирует активность, которая считается биологически релевантной.

[00737] Химические термины: ниже приведены определения различных химических терминов от «ацила» до «тиола».

[00738] Термин «ацил» в настоящем документе обозначает водород или алкильную группу (например, галогеналкильную группу), как определено в настоящем документе, которая присоединена к родительской молекулярной группе посредством карбонильной группы, как определено в настоящем документе и проиллюстрировано примерами формула (т.е., карбоксиальдегидной группы), ацетила, пропионила, бутаноила и т.п. В качестве примера, незамещенные ацильные группы содержат от 1 до 7, от 1 до 11 или от 1 до 21 атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алкильная группа дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе.

[00739] Термин «ациламино» в настоящем документе обозначает ацильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе посредством аминогруппы, как определено в настоящем документе (т.е., $-N(R^{N1})-C(O)-R$, где R представляет собой H или необязательно замещенную C_{1-6} , C_{1-10} или C_{1-20} алкильную группу, и R^{N1} является таким, как определено в настоящем документе).

В качестве примера, незамещенные ациламиногруппы содержат от 1 до 41 атомов углерода (например, от 1 до 7, от 1 до 13, от 1 до 21, от 2 до 7, от 2 до 13, от 2 до 21 или от 2 до 41 атомов углерода). В некоторых вариантах реализации алкильная группа дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе, и/или аминогруппа представляет собой -NH_2 или $\text{-NHR}_{\text{N}1}$, где $\text{R}_{\text{N}1}$ независимо представляет собой OH , NO_2 , NH_2 , $\text{NR}_{\text{N}2}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{OR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{R}^{\text{N}2}$, $\text{SOR}^{\text{N}2}$, алкил или арил, и каждый $\text{R}^{\text{N}2}$ может быть H, алкилом или арилом.

[00740] Термин «ацилокси» в настоящем документе обозначает ацильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через атом кислорода (т.е., -O-C(O)-R , где R представляет собой H или необязательно замещенную C_{1-6} , C_{1-10} или C_{1-20} алкильную группу). В качестве примера, незамещенные ацилокси группы содержат от 1 до 21 атомов углерода (например, от 1 до 7 или от 1 до 11 атомов углерода). В некоторых вариантах реализации алкильная группа дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе, и/или аминогруппа представляет собой -NH_2 или $\text{-NHR}^{\text{N}1}$, где $\text{R}^{\text{N}1}$ независимо представляет собой OH , NO_2 , NH_2 , $\text{NR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{OR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{R}^{\text{N}2}$, $\text{SOR}^{\text{N}2}$, алкил или арил, и каждый $\text{R}^{\text{N}2}$ может быть H, алкилом или арилом.

[00741] Термин «алкарил» в настоящем документе обозначает арильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через алкиленовую группу, как определено в настоящем документе. В качестве примера, незамещенные алкарильные группы содержат от 7 до 30 атомов углерода (например, от 7 до 16 или от 7 до 20 атомов углерода, такие как C_{1-6} алкил- C_{6-10} арил, C_{1-10} алкил- C_{6-10} арил или C_{1-20} алкил- C_{6-10} арил). В некоторых вариантах реализации каждый из алкилена и арила может быть дополнительно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе для соответствующих групп. Другие группы, которым предшествует приставка «алкил-», определены таким же образом, причем «алк» обозначает C_{1-6} алкилен, если не указано иное, и присоединенная химическая структура является такой, как определено в настоящем документе.

[00742] Термин «алкциклоалкил» представляет циклоалкильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через алкиленовую группу, как определено в настоящем документе (например, алкиленовую группу, содержащую от 1 до 4, от 1 до 6, от 1 до 10 или от 1 до 20 атомов углерода). В некоторых вариантах реализации каждый из алкилена и циклоалкила может быть дополнительно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе для соответствующей группы.

[00743] Термин «алкенил» в настоящем документе обозначает одновалентные группы с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащие, если не указано иное, от 2 до 20 атомов углерода (например, от 2 до 6 или от 2 до 10 атомов углерода), которые содержат одну или более двойных углерод-углеродных связей и проиллюстрированы примерами этенила, 1-пропенила, 2-пропенила, 2-метил-1-пропенила, 1-бутенила, 2-бутенила и т.п. Алкенилы включают цис и транс изомеры. Алкенильные группы необязательно могут быть замещены 1, 2, 3 или 4 заместителями, которые независимо выбраны из амина, арила, циклоалкила или гетероциклила (например, гетероарила), как определено в настоящем документе, или любыми из приведенных в качестве примера алкильными заместителями, раскрытыми в настоящем документе.

[00744] Термин «алкенилокси» представляет химический заместитель формулы -OR, где R представляет собой C₂₋₂₀ алкенильную группу (например, C₂₋₆ или C₂₋₁₀алкенил), если не указано иное. В качестве примера, алкенилокси группы включают этенилокси, пропенилокси и т.п. В некоторых вариантах реализации алкенильная группа может
5 быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе (например, гидроксильной группой).

[00745] Термин «алкилгетероарил» обозначает гетероарильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через алкиленовую группу, как определено в настоящем документе. В качестве
10 примера, незамещенные алкилгетероарильные группы содержат от 2 до 32 атомов углерода (например, от 2 до 22, от 2 до 18, от 2 до 17, от 2 до 16, от 3 до 15, от 2 до 14, от 2 до 13 или от 2 до 12 атомов углерода, например, C₁₋₆алкил-C₁₋₁₂гетероарил, C₁₋₁₀алкил-C₁₋₁₂гетероарил или C₁₋₂₀алкил-C₁₋₁₂гетероарил). В некоторых вариантах
15 реализации каждый из алкилена и гетероарила может быть дополнительно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе для соответствующей группы. Алкилгетероарильные группы представляют собой подмножество алкилгетероциклических групп.

[00746] Термин «алкилгетероциклил» представляет гетероциклическую группу, как
20 определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через алкиленовую группу, как определено в настоящем документе. В качестве примера, незамещенные алкилгетероциклические группы содержат от 2 до 32 атомов углерода (например, от 2 до 22, от 2 до 18, от 2 до 17, от 2 до 16, от 3 до 15, от 2 до 14, от 2 до 13 или от 2 до 12 атомов углерода, например, C₁₋₆алкил-C₁₋₁₂гетероциклил, C₁₋₁₀алкил-C₁₋₁₂гетероциклил или C₁₋₂₀алкил-C₁₋₁₂гетероциклил). В некоторых вариантах
25 реализации каждый из алкилена и гетероциклила может быть дополнительно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе для соответствующей группы.

[00747] Термин «алкокси» обозначает химический заместитель формулы -OR, где R
30 представляет собой C₁₋₂₀ алкильную группу (например, C₁₋₆ или C₁₋₁₀алкил), если не указано иное. В качестве примера, алкоксигруппы включают метокси, этокси, пропокси (например, н-пропокси и изопропокси), трет-бутокси и т.п. В некоторых вариантах реализации алкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4
35 заместителями, как определено в настоящем документе (например, гидрокси или алкокси).

[00748] Термин «алкоксиалкокси» представляет алкоксигруппу, замещенную алкоксигруппой. В качестве примера, незамещенные алкоксиалкоксигруппы содержат
40 от 2 до 40 атомов углерода (например, от 2 до 12 или от 2 до 20 атомов углерода, например, C₁₋₆алкокси-C₁₋₆алкокси, C₁₋₁₀алкокси-C₁₋₁₀алкокси или C₁₋₂₀алкокси-C₁₋₂₀алкокси). В некоторых вариантах реализации каждая алкоксигруппа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

[00749] Термин «алкоксиалкил» представляет алкильную группу, замещенную
45 алкоксигруппой. В качестве примера, незамещенные алкоксиалкильные группы содержат от 2 до 40 атомов углерода (например, от 2 до 12 или от 2 до 20 атомов углерода, в том числе, C₁₋₆алкокси-C₁₋₆алкил, C₁₋₁₀алкокси-C₁₋₁₀алкил или C₁₋₂₀алкокси-C₁₋₂₀алкил). В некоторых вариантах реализации каждый из алкила и алкокси может быть

дополнительно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе для соответствующей группы.

[00750] Термин «алкоксикарбонил» в настоящем документе обозначает алкоксигруппу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через карбонильный атом углерода (например, $-C(O)-OR$, где R представляет собой H или необязательно замещенную C_{1-6} , C_{1-10} или C_{1-20} алкильную группу). В качестве примера, незамещенный алкоксикарбонил содержит от 1 до 21 атомов углерода (например, от 1 до 11 или от 1 до 7 атомов углерода). В некоторых вариантах реализации алкоксигруппа дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе.

[00751] Термин «алкоксикарбонилалкокси» в настоящем документе обозначает алкоксигруппу, как определено в настоящем документе, которая замещена алкоксикарбонильной группой, как определено в настоящем документе (например, $-O$ -алкил- $C(O)-OR$, где R представляет собой необязательно замещенную C_{1-6} , C_{1-10} или C_{1-20} алкильную группу). В качестве примера, незамещенный алкоксикарбонилалкоксигруппы содержит от 3 до 41 атомов углерода (например, от 3 до 10, от 3 до 13, от 3 до 17, от 3 до 21 или от 3 до 31 атома углерода, например, C_{1-6} алкоксикарбонил- C_{1-6} алкокси, C_{1-10} алкоксикарбонил- C_{1-10} алкокси или C_{1-20} алкоксикарбонил- C_{1-20} алкокси). В некоторых вариантах реализации каждая алкоксигруппа дополнительно и независимо замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе (например, гидроксигруппой).

[00752] Термин «алкоксикарбонилалкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, которая замещена алкоксикарбонильной группой, как определено в настоящем документе (например, -алкил- $C(O)-OR$, где R представляет собой необязательно замещенную C_{1-20} , C_{1-10} или C_{1-6} алкильную группу). В качестве примера, незамещенные алкоксикарбонилалкильные группы содержат от 3 до 41 атомов углерода (например, от 3 до 10, от 3 до 13, от 3 до 17, от 3 до 21 или от 3 до 31 атомов углерода, в том числе, C_{1-6} алкоксикарбонил- C_{1-6} алкил, C_{1-10} алкоксикарбонил- C_{1-10} алкил или C_{1-20} алкоксикарбонил- C_{1-20} алкил). В некоторых вариантах реализации каждая алкильная и алкоксигруппа дополнительно и независимо замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе (например, гидроксигруппой).

[00753] Термин «алкил» в настоящем документе обозначает включительно насыщенные группы с неразветвленной и разветвленной цепью, содержащие от 1 до 20 атомов углерода (например, от 1 до 10 или от 1 до 6), если не указано иное. Алкильные группы проиллюстрированы примерами метила, этила, n- и изо-пропила, n-, втор-, изо- и трет-бутила, неопентила и т.п., и могут быть необязательно замещены 1, 2, 3 или, в случае алкильных групп, содержащих два атома углерода или более, 4 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: (1) C_{1-6} алкокси; (2) C_{1-6} алкилсульфинила; (3) амино, как определено в настоящем документе (например, незамещенный амино (т.е., $-NH_2$) или замещенный амино (т.е., $-N(R^{N1})_2$, где R^{N1} является таким, как определено для амино); (4) C_{6-10} арил- C_{1-6} алкокси; (5) азидо; (6) галогена; (7) (C_{2-9} гетероцикл)окси; (8) гидрокси; (9) нитро; (10) оксо (например, карбоксиальдегид или ацил); (11) C_{1-7} спироциклила; (12) тиоалкокси; (13) тиола; (14)

$-\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}'}$, где $\text{R}^{\text{A}'}$ выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкила),
 (б) C_{2-20} алкенила (например, C_{2-6} алкенила), (в) C_{6-10} арила, (г) водорода, (д) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, (е) амино- C_{1-20} алкила, (ж) полиэтиленгликоля формулы $-(\text{CH}_2)_{s_2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s_1}(\text{CH}_2)_{s_3}\text{OR}'$, где s_1 равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4),
 5 каждое из s_2 и s_3 независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10) и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил и (з) амино-полиэтиленгликоля формулы $-\text{NR}^{\text{N}1}(\text{CH}_2)_{s_2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{s_1}(\text{CH}_2)_{s_3}\text{NR}^{\text{N}1}$, где s_1 равно
 10 целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из s_2 и s_3 независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый $\text{R}^{\text{N}1}$ независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил; (15) $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{B}'}\text{R}^{\text{C}'}$, где каждый из $\text{R}^{\text{B}'}$ и $\text{R}^{\text{C}'}$ независимо выбран
 15 из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C_{1-6} алкила, (в) C_{6-10} арила и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила; (16) $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{D}'}$, где $\text{R}^{\text{D}'}$ выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-6} алкила, (б) C_{6-10} арила, (в) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила и (г) гидрокси; (17) $-\text{SO}_2\text{NR}^{\text{E}'}\text{R}^{\text{F}'}$, где каждый из $\text{R}^{\text{E}'}$ и
 20 $\text{R}^{\text{F}'}$ независимо выбран из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C_{1-6} алкила, (в) C_{6-10} арила и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила; (18) $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{G}'}$, где $\text{R}^{\text{G}'}$ выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкила), (б) C_{2-20} алкенила (например, C_{2-6} алкенила),
 (в) C_{6-10} арила, (г) водорода, (д) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, (е) амино- C_{1-20} алкила, (ж)
 25 полиэтиленгликоля формулы $-(\text{CH}_2)_{s_2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s_1}(\text{CH}_2)_{s_3}\text{OR}'$, где s_1 равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из s_2 и s_3 независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10) и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил и (з) амино-полиэтиленгликоля формулы $-\text{NR}^{\text{N}1}$
 30 $(\text{CH}_2)_{s_2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{s_1}(\text{CH}_2)_{s_3}\text{NR}^{\text{N}1}$, где s_1 равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из s_2 и s_3 независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый $\text{R}^{\text{N}1}$ независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил;

35 (19) $-\text{NR}^{\text{H}'}\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{I}'}$, где $\text{R}^{\text{H}'}$ выбран из группы, состоящей из: (а1) водорода и (б1) C_{1-6} алкила, и $\text{R}^{\text{I}'}$ выбран из группы, состоящей из: (а2) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкила), (б2) C_{2-20} алкенила (например, C_{2-6} алкенила), (в2) C_{6-10} арила, (г2) водорода,
 (д2) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, (е2) амино- C_{1-20} алкила, (ж2) полиэтиленгликоля формулы $-(\text{CH}_2)_{s_2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s_1}(\text{CH}_2)_{s_3}\text{OR}'$, где s_1 равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из s_2 и s_3 независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или
 40 C_{1-20} алкил, и (з2) амино-полиэтиленгликоля формулы $-\text{NR}^{\text{N}1}(\text{CH}_2)_{s_2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{s_1}$
 45 $(\text{CH}_2)_{s_3}\text{NR}^{\text{N}1}$, где s_1 равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из s_2 и s_3 независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый $\text{R}^{\text{N}1}$ независимо представляет собой

водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил; (20) $-NR^J C(O)OR^{K'}$, где R^J выбран из группы, состоящей из: (а1) водорода и (б1) C_{1-6} алкила, и $R^{K'}$ выбран из группы, состоящей из: (а2) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкила), (б2) C_{2-20} алкенила (например, C_{2-6} алкенила), (в2) C_{6-10} арила, (г2) водорода, (д2) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, (е2) амино- C_{1-20} алкила, (ж2) полиэтиленгликоля формулы $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$, где s_1 равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из s_2 и s_3 независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил, и (з2) амино-полиэтиленгликоля формулы $-NR^{N1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N1}$, где s_1 равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из s_2 и s_3 независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил; и (21) амидина. В некоторых вариантах реализации каждая из указанных групп может быть дополнительно замещена, как раскрыто в настоящем документе. Например, алкиленовая группа в C_1 -алкариле может быть дополнительно замещена оксогруппой с получением соответствующего арилоильного заместителя.

[00754] Термин «алкилен» и приставка «алкил-» в настоящем документе обозначают насыщенную двухвалентную углеводородную группу, полученную из насыщенного углеводорода с неразветвленной или разветвленной цепью путем удаления двух атомов водорода и проиллюстрированную примерами метилена, этилена, изопропилена и т.п. Термин « C_{x-y} алкилен» и приставка « C_{x-y} алкил-» обозначают алкиленовые группы, содержащие от x до y атомов углерода. В качестве примера, значения для x представляют собой 1, 2, 3, 4, 5 и 6, и примеры значений для y представляют собой 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 (например, C_{1-6} , C_{1-10} , C_{2-20} , C_{2-6} , C_{2-10} или C_{2-20} алкилен). В некоторых вариантах реализации алкилен может быть дополнительно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе для алкильной группы.

[00755] Термин «алкилсульфинил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, присоединенную к родительской молекулярной группе через $-S(O)$ -группу. В качестве примера, незамещенные алкилсульфинильные группы содержат от 1 до 6, от 1 до 10 или от 1 до 20 атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

[00756] Термин «алкилсульфинилалкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, замещенную алкилсульфинильной группой. В качестве примера, незамещенные алкилсульфинилалкильные группы содержат от 2 до 12, от 2 до 20 или от 2 до 40 атомов углерода. В некоторых вариантах реализации каждая алкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

[00757] Термин «алкинил» в настоящем документе обозначает одновалентные группы с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащие от 2 до 20 атомов углерода (например, от 2 до 4, от 2 до 6 или от 2 до 10 атомов углерода), которые содержат тройную углерод-углеродную связь и проиллюстрированы примерами этинила, 1-пропина и т.п. Алкильные группы могут быть необязательно замещены 1, 2, 3 или

4 заместителями, которые независимо выбраны из арила, циклоалкила или гетероциклила (например, гетероарила), как определено в настоящем документе, или любыми из приведенных в качестве примера алкильных заместителей, раскрытых в настоящем документе.

5 [00758] Термин «алкинилокси» представляет химический заместитель формулы -OR, где R представляет собой C₂₋₂₀ алкинильную группу (например, C₂₋₆ или C₂₋₁₀ алкинил), если не указано иное. В качестве примера, алкинилокси группы включают этинилокси, пропинилокси и т.п. В некоторых вариантах реализации алкинильная группа может
10 быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе (например, гидроксигруппой).

[00759] Термин «амидин» в настоящем документе обозначает группу -C(=NH)NH₂.

[00760] Термин «амино» в настоящем документе обозначает -N(R^{N1})₂, где каждый R^{N1} независимо представляет собой H, OH, NO₂, N(R^{N2})₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, N-
15 защитную группу, алкил, алкенил, алкинил, алкокси, арил, алкарил, циклоалкил, алкилциклоалкил, карбоксиалкил, сульфоалкил, гетероциклил (например, гетероарил) или алкилгетероциклил (например, алкилгетероарил), где каждая из указанных R^{N1} групп может быть необязательно замещена, как определено в настоящем документе
20 для каждой группы; или два R^{N1} соединены с образованием гетероциклила или N-защитной группы, и где каждый R^{N2} независимо представляет собой H, алкил или арил. Аминогруппы по изобретению могут представлять собой незамещенный amino (т.е., -NH₂) или замещенный amino (т.е., -N(R^{N1})₂). В предпочтительном варианте, amino
25 представляет собой -NH₂ или -NHR^{N1}, где R^{N1} независимо представляет собой OH, NO₂, NH₂, NR₂^{N2}, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, алкил, карбоксиалкил, сульфоалкил или арил, и каждый R^{N2} может представлять собой H, C₁₋₂₀ алкил (например, C₁₋₆ алкил) или C<sub>6-
30 10</sub>арил.

[00761] Термин «аминокислота» в настоящем документе обозначает молекулу, содержащую боковую цепь, аминогруппу и кислотную группу (например, карбоксигруппу -CO₂H или сульфогруппу -SO₃H), где аминокислота присоединена к
35 родительской молекулярной группе через боковую цепь, аминогруппу или кислотную группу (например, боковую цепь). В некоторых вариантах реализации аминокислота присоединена к родительской молекулярной группе посредством карбонильной группы, где боковая цепь или аминогруппа присоединена к карбонильной группе. В качестве
40 примера, боковые цепи включают необязательно замещенный алкил, арил, гетероциклил, алкарил, алкилгетероциклил, аминоалкил, карбамоилалкил и карбоксиалкил. В качестве примера, аминокислоты включают аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, глютамин, глицин, гистидин, гидроксинорвалин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, норвалин, орнитин, фенилаланин, пролин, пирролизин, селеноцистеин, серии, таурин, треонин, триптофан, тирозин и валин.
45 Аминокислотные группы могут быть необязательно замещены 1, 2, 3 или, в случае аминокислотной группы, содержащей два атома углерода или более, 4 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: (1) C₁₋₆ алкокси; (2) C₁₋₆ алкилсульфинила; (3) amino, как определено в настоящем документе (например,

незамещенный амино (т.е., $-\text{NH}_2$) или замещенный амино (т.е., $-\text{N}(\text{R}^{\text{N1}})_2$, где R^{N1} является таким, как определено для амино); (4) C_{6-10} арил- C_{1-6} алкокси; (5) азидо; (6) галогена; (7) (C_{2-9} гетероцикл)окси; (8) гидрокси; (9) нитро; (10) оксо (например,

5 карбоксиальдегида или ацила); (11) C_{1-7} спироциклила; (12) тиоалкокси; (13) тиола; (14) $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$, где R^{A} выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкила), (б) C_{2-20} алкенила (например, C_{2-6} алкенила), (в) C_{6-10} арила, (г) водорода, (д) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, (е) амино- C_{1-20} алкила, (г) полиэтиленгликоля формулы $-(\text{CH}_2)_{s2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s1}$

10 $(\text{CH}_2)_{s3}\text{OR}'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой Н или C_{1-20} алкил, и (з) амино-полиэтиленгликоля формулы $-\text{NR}^{\text{N1}}(\text{CH}_2)_{s2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{NR}^{\text{N1}}$, где $s1$ равно

15 целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил; (15) $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{B}}\text{R}^{\text{C}}$, где каждый из R^{B} и R^{C} независимо выбран

20 из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C_{1-6} алкила, (в) C_{6-10} арила и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила; (16) $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{D}}$, где R^{D} выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-6} алкила, (б) C_{6-10} арила, (в) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила и (г) гидрокси; (17) $-\text{SO}_2\text{NR}^{\text{E}}\text{R}^{\text{F}}$, где каждый из R^{E} и

25 R^{F} независимо выбран из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C_{1-6} алкила, (в) C_{6-10} арила и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила; (18) $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{G}}$, где R^{G} выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкила), (б) C_{2-20} алкенила (например, C_{2-6} алкенила), (в) C_{6-10} арила, (г) водорода, (д) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, (е) амино- C_{1-20} алкила, (г)

30 полиэтиленгликоля формулы $-(\text{CH}_2)_{s2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{OR}'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой Н или C_{1-20} алкил, и (з) амино-полиэтиленгликоля формулы $-\text{NR}^{\text{N1}}$

35 $(\text{CH}_2)_{s2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{NR}^{\text{N1}}$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил;

40 (19) $-\text{NR}^{\text{H}}\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{I}}$, где R^{H} выбран из группы, состоящей из: (а1) водорода и (б1) C_{1-6} алкила, и R^{I} выбран из группы, состоящей из: (а2) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкила), (б2) C_{2-20} алкенила (например, C_{2-6} алкенила), (в2) C_{6-10} арила, (г2) водорода, (д2) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, (е2) амино- C_{1-20} алкила, (ж2) полиэтиленгликоля формулы

45 $-(\text{CH}_2)_{s2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{OR}'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой Н или

C_{1-20} алкил, и (32) амино-полиэтиленгликоля формулы $NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил; (20) $-NR^J C(O)OR^K$, где R^J выбран из группы, состоящей из: (а1) водорода и (б1) C_{1-6} алкила, и R^K выбран из группы, состоящей из: (а2) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкила), (б2) C_{2-20} алкенила (например, C_{2-6} алкенила), (в2) C_{6-10} арила, (г2) водорода, (д2) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, (ж2) амино- C_{1-20} алкила, (32) полиэтиленгликоля формулы $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и R' представляет собой H или C_{1-20} алкил, и (32) амино-полиэтиленгликоля формулы $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, где $s1$ равно целому числу от 1 до 10 (например, от 1 до 6 или от 1 до 4), каждое из $s2$ и $s3$ независимо равно целому числу от 0 до 10 (например, от 0 до 4, от 0 до 6, от 1 до 4, от 1 до 6 или от 1 до 10), и каждый R^{N1} независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-6} алкил; и (21) амидина. В некоторых вариантах реализации каждая из указанных групп может быть дополнительно замещена, как раскрыто в настоящем документе.

[00762] Термин «аминоалкокси» в настоящем документе обозначает алкоксигруппу, как определено в настоящем документе, замещенную аминогруппой, как определено в настоящем документе. Каждый алкил и амино может быть дополнительно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе для соответствующей группы (например, $CO_2R^{A'}$, где $R^{A'}$ выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-6} алкила, (б) C_{6-10} арила, (в) водорода и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, например, карбоксии).

[00763] Термин «аминоалкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, замещенную аминогруппой, как определено в настоящем документе. Каждый алкил и амино может быть дополнительно замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе для соответствующей группы (например, $CO_2R^{A'}$, где $R^{A'}$ выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-6} алкила, (б) C_{6-10} арила, (в) водорода и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила, например, карбоксии).

[00764] Термин «арил» в настоящем документе обозначает моно-, бициклическую или полициклическую систему карбоциклических колец, содержащую один или два ароматических кольца и проиллюстрированную примерами фенила, нафтила, 1,2-дигидронафтила, 1,2,3,4-тетрагидронафтила, антраценила, фенантренила, флуоренила, инданила, инденила и т.п., и может быть необязательно замещена 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: (1) C_{1-7} ацила (например, карбоксиальдегид); (2) C_{1-20} алкила (например, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси- C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкилсульфинил- C_{1-6} алкил, амино- C_{1-6} алкил, азидо- C_{1-6} алкил, (карбоксиальдегид)- C_{1-6} алкил, галоген- C_{1-6} алкил (например, перфторалкил), гидроксид- C_{1-6} алкил, нитро- C_{1-6} алкил или C_{1-6} тиоалкокси- C_{1-6} алкил); (3) C_{1-20} алкокси (например, C_{1-6} алкокси, такой как перфторалкокси); (4)

C_{1-6} алкилсульфинила; (5) C_{6-10} арила; (6) амино; (7) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила; (8) азидо; (9) C_{3-8} циклоалкила; (10) C_{1-6} алкил- C_{3-8} циклоалкила; (11) галогена; (12) C_{1-12} гетероциклила (например, C_{1-12} гетероарил); (13) (C_{1-12} гетероциклил)окси; (14) гидрокси; (15) нитро;

5 (16) C_{1-20} тиоалкоксо (например, C_{1-6} тиоалкоксо); (17) $-(CH_2)_qCO_2R^A$, где q равно целому числу от 0 до 4, и R^A выбран из группы, состоящей из: (а) C_{1-6} алкила, (б) C_{6-10} арила, (в) водорода и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила; (18) $-(CH_2)_qCONR^B R^C$, где q равно целому

10 числу от 0 до 4 и, где R^B и R^C независимо выбраны из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C_{1-6} алкила, (в) C_{6-10} арила и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$, где q равно целому числу от 0 до 4 и, где R^D выбран из группы, состоящей из: (а) алкила, (б) C_{6-10} арила и (в) алкил- C_{6-10} арила; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^E R^F$, где q равно целому числу

15 от 0 до 4, и где каждый из R^E и R^F независимо выбран из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C_{1-6} алкила, (в) C_{6-10} арила и (г) C_{1-6} алкил- C_{6-10} арила; (21) тиола; (22) C_{6-10} арилокси; (23) C_{3-8} циклоалкоксо; (24) C_{6-10} арил- C_{1-6} алкоксо; (25) C_{1-6} алкил- C_{1-12} гетероциклила (например, C_{1-6} алкил- C_{1-12} гетероарил); (26) C_{2-20} алкенила; и (27) C_{2-20} алкинила. В некоторых вариантах реализации каждая из указанных групп может

20 быть дополнительно замещена, как раскрыто в настоящем документе. Например, алкиленовая группа C_1 -алкарил или C_1 -алкилгетероциклил может быть дополнительно замещена оксогруппой с образованием соответствующего арилоильного и (гетероциклил)оильного заместителя.

25 [00765] Термин «арилалкоксо» в настоящем документе обозначает алкарильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через атом кислорода. В качестве примера, незамещенные алкоксиалкильные группы содержат от 7 до 30 атомов углерода (например, от 7 до 16

30 или от 7 до 20 атомов углерода, такие как C_{6-10} арил- C_{1-6} алкоксо, C_{6-10} арил- C_{1-10} алкоксо или C_{6-10} арил- C_{1-20} алкоксо). В некоторых вариантах реализации арилалкоксогруппа может быть замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

35 [00766] Термин «арилокси» представляет химический заместитель формулы $-OR'$, где R' представляет собой арильную группу, содержащую 6-18 атомов углерода, если не указано иное. В некоторых вариантах реализации арильная группа может быть замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

40 [00767] Термин «арилоил» в настоящем документе обозначает арильную группу, как определено в настоящем документе, которая присоединена к родительской молекулярной группе через карбонильную группу. В качестве примера, незамещенные арилоильные группы содержат от 7 до 11 атомов углерода. В некоторых вариантах реализации арильная группа может быть замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

45 [00768] Термин «азидо» обозначает группу $-N_3$, которая также может быть представлена как $-N=N=N$.

[00769] Термин «бициклический» в настоящем документе обозначает структуру, содержащую два кольца, которые могут быть ароматическими или неароматическими. Бициклические структуры включают спироциклические группы, как определено в

настоящем документе, и два кольца, которые объединены одним или более мостиков, где такие мостики могут содержать один атом или цепь из двух, трех или более атомов. В качестве примера, бициклические группы включают бициклическую карбоциклическую группу, где первое и второе кольцо представляют собой карбоциклические группы, как определено в настоящем документе; бициклические арильные группы, где первое и второе кольца представляют собой арильные группы, как определено в настоящем документе; бициклические гетероциклические группы, где первое кольцо представляет собой гетероциклическую группу, и второе кольцо представляет собой карбоциклическую (например, арильную) или гетероциклическую (например, гетероарильную) группу; и бициклические гетероарильные группы, где первое кольцо представляет собой гетероарильную группу, и второе кольцо представляет собой карбоциклическую (например, арильную) или гетероциклическую (например, гетероарильную) группу. В некоторых вариантах реализации бициклическая группа может быть замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе для циклоалкильных, гетероциклических и арильных групп.

[00770] Термины «карбоциклический» и «карбоциклический» в настоящем документе обозначают необязательно замещенную C₃₋₁₂ моноциклическую, бициклическую или трициклическую структуру, где кольца, которые могут быть ароматическими или неароматическими, образованы атомами углерода. Карбоциклические структуры включают циклоалкильные, циклоалкенильные и арильные группы.

[00771] Термин «карбамоил» в настоящем документе обозначает -C(O)-N(R^{N1})₂, где значение каждого R^{N1} приведено в определении «амино» в настоящем документе.

[00772] Термин «карбамоилалкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, замещенную карбамоильной группой, как определено в настоящем документе. Алкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе.

[00773] Термин «карбамил» в настоящем документе обозначает карбаматную группу структуры -NR^{N1}C(=O)OR или -OC(=O)N(R^{N1})₂, где значение каждого R^{N1} приведено в определении «амино» в настоящем документе, и R представляет собой алкил, циклоалкил, алкилциклоалкил, арил, алкарил, гетероциклический (например, гетероарил) или алкилгетероциклический (например, алкилгетероарил), как определено в настоящем документе.

[00774] Термин «карбонил» в настоящем документе обозначает C(O) группу, которая также может быть представлена как C=O.

[00775] Термин «карбоксиальдегид» представляет ацильную группу структуры -CHO.

[00776] Термин «карбокси» в настоящем документе обозначает -CO₂H.

[00777] Термин «карбоксиалкокси» в настоящем документе обозначает алкоксигруппу, как определено в настоящем документе, замещенную карбоксильной группой, как определено в настоящем документе. Алкоксигруппа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе для алкильной группы.

[00778] Термин «карбоксиалкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, замещенную карбоксильной группой, как определено в настоящем документе. Алкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе.

[00779] Термин «циано» в настоящем документе обозначает -CN группу.

[00780] Термин «циклоалкокси» представляет химический заместитель формулы -OR, где R представляет собой C₃₋₈ циклоалкильную группу, как определено в настоящем документе, если не указано иное. Циклоалкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе. В качестве

5

примера, незамещенные циклоалкоксигруппы содержат от 3 до 8 атомов углерода.

[00781] Термин «циклоалкил» в настоящем документе обозначает одновалентную насыщенную или ненасыщенную неароматическую циклическую углеводородную группу, содержащую от 3 до 8 атомов углерода, если не указано иное, и проиллюстрирован примерами циклопропила, циклобутила, циклопентила, циклогексила, циклогептила, бицикло[2.2.1]гептила и т.п. Если циклоалкильная группа содержит одну двойную углерод-углеродную связь, циклоалкильная группа может носить название «циклоалкенильной» группы. В качестве примера, циклоалкенильные группы включают циклопентенил, циклогексенил и т.п. Циклоалкильные группы по настоящему изобретению необязательно могут быть замещены: (1) C₁₋₇ацилом (например, карбоксиальдегид); (2) C₁₋₂₀алкилом (например, C₁₋₆алкил, C₁₋₆алкокси-C₁₋₆алкил, C₁₋₆алкил сульфинила-C₁₋₆алкил, amino-C₁₋₆алкил, азидо-C₁₋₆алкил, (карбоксиальдегид)-C₁₋₆алкил, галоген-C₁₋₆алкил (например, перфторалкил), гидрокси-C₁₋₆алкил, нитро-C₁₋₆алкил или C₁₋₆тиоалкокси-C₁₋₆алкил); (3) C₁₋₂₀алкокси (например, C₁₋₆алкокси, такой как перфторалкокси); (4) C₁₋₆алкилсульфинилом; (5) C₆₋₁₀арилом; (6) амино; (7) C₁₋₆алкил-C₆₋₁₀арилом; (8) азидо; (9) C₃₋₈циклоалкилом; (10) C₁₋₆алкил-C₃₋₈циклоалкилом; (11) галогеном; (12) C₁₋₁₂гетероциклилом (например, C₁₋₁₂гетероарилом); (13) (C₁₋₁₂гетероциклил)окси; (14) гидрокси; (15) нитро; (16) C₁₋₂₀тиоалкокси (например, C₁₋₆тиоалкокси); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'}, где q равно целому числу от 0 до 4, и R^{A'} выбран из группы, состоящей из: (а) C₁₋₆алкила, (б) C₆₋₁₀арила, (в) водорода и (г) C₁₋₆алкил-C₆₋₁₀арила; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'}R^{C'}, где q равно целому числу от 0 до 4, и где R^{B'} и R^{C'} независимо выбраны из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C₆₋₁₀алкила, (в) C₆₋₁₀арила и (г) C₁₋₆алкил-C₆₋₁₀арила; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'}, где q равно целому числу от 0 до 4, и где R^{D'} выбран из группы, состоящей из: (а) C₆₋₁₀алкила, (б) C₆₋₁₀арила и (в) C₁₋₆алкил-C₆₋₁₀арила; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'}R^{F'}, где q равно целому числу от 0 до 4, и где каждый из R^{E'} и R^{F'} независимо выбран из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C₆₋₁₀алкила, (в) C₆₋₁₀арила и (г) C₁₋₆алкил-C₆₋₁₀арила; (21) тиола; (22) C₆₋₁₀арилокси; (23) C₃₋₈циклоалкокси; (24) C₆₋₁₀арил-C₁₋₆алкокси; (25) C₁₋₆алкил-C₁₋₁₂гетероциклила (например, C₁₋₆алкил-C₁₋₁₂гетероарила); (26) оксо; (27) C₂₋₂₀алкенила; и (28) C₂₋₂₀алкинила. В некоторых вариантах реализации каждая из указанных групп может быть дополнительно замещена, как раскрыто в настоящем документе. Например, алкиленовая группа в C₁-алкариле или C₁-алкилгетероциклиле может быть дополнительно замещена оксогруппой, с получением соответствующего арилоильного и (гетероциклил)оильного заместителя.

45

[00782] Термин «диастереомер» обозначает стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, и не могут быть наложены друг на друга.

[00783] Термин «эффективное количество» агента в настоящем документе обозначает

количество, достаточное, чтобы получить предпочтительные или желательные результаты, например, клинические результаты, и, таким образом, «эффективное количество» зависит от контекста, в котором оно применяется. Например, в контексте введения агента для лечения рака, эффективное количество агента представляет собой, например, количество, достаточное для проведения лечения, как определено в настоящем документе, рака, по сравнению с ответом, полученным без введения агента.

[00784] Термин «энантиомер» в настоящем документе обозначает каждую отдельную оптически активную форму соединения по изобретению, с оптической чистотой или энантиомерным избытком (по данным стандартных для данной области методов) по меньшей мере 80% (т.е., по меньшей мере 90% одного энантиомера и не более 10% другого энантиомера), предпочтительно по меньшей мере 90% и, более предпочтительно, по меньшей мере 98%.

[00785] Термин «галоген» в настоящем документе обозначает галоген, выбранный из брома, хлора, йода или фтора.

[00786] Термин «галогеналкокси» в настоящем документе обозначает алкоксигруппу, как определено в настоящем документе, замещенную галогеном (т.е., F, Cl, Br или I). Галогеналкокси может быть замещен 1, 2, 3 или, в случае алкильных групп, содержащих два атома углерода или более, 4 атомами галогена. Галогеналкоксигруппы включают перфторалкокси (например, $-\text{OCF}_3$), $-\text{OCHF}_2$, $-\text{OCH}_2\text{F}$, $-\text{OCCl}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br})\text{CH}_3$ и $-\text{OCHICH}_3$. В некоторых вариантах реализации галогеналкоксигруппа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе для алкильных групп.

[00787] Термин «галогеналкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, замещенную галогеном (т.е., F, Cl, Br или I). Галогеналкил может быть замещен 1, 2, 3 или, в случае алкильных групп, содержащих два атома углерода или более, 4 атомами галогена. Галогеналкильные группы включают перфторалкилы (например, $-\text{CF}_3$), $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CCl}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br})\text{CH}_3$ и $-\text{CHICH}_3$. В некоторых вариантах реализации

галогеналкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе для алкильных групп.

[00788] Термин «гетероалкилен» в настоящем документе обозначает алкиленовую группу, как определено в настоящем документе, где 1 или 2 из составляющих ее атомов углерода заменены атомами азота, кислорода или серы. В некоторых вариантах реализации гетероалкиленовая группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе для алкиленовых групп.

[00789] Термин «гетероарил» в настоящем документе обозначает подмножество гетероциклилов, как определено в настоящем документе, которые являются ароматическими: т.е., они содержат $4n+2$ пи электронов в пределах моно- или полициклической системы колец. В качестве примера, незамещенные гетероарильные группы содержат от 1 до 12 (например, от 1 до 11, от 1 до 10, от 1 до 9, от 2 до 12, от 2 до 11, от 2 до 10 или от 2 до 9) атомов углерода. В некоторых вариантах, гетероарил замещен 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено для гетероциклильной группы.

[00790] Термин «гетероциклил» в настоящем документе обозначает 5-, 6- или 7-членное кольцо, если не указано иное, содержащее 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из группы, состоящей из: азота, кислорода и серы. 5-Членное кольцо содержит от 0 до 2 двойных связей, и 6-7-членные кольца содержат от 0 до 3 двойных связей. В качестве примера, незамещенные гетероциклильные группы содержат от 1

до 12 (например, от 1 до 11, от 1 до 10, от 1 до 9, от 2 до 12, от 2 до 11, от 2 до 10 или от 2 до 9) атомов углерода. Термин «гетероциклил» также обозначает гетероциклическое соединение, содержащее соединенную мостиком полициклическую структуру, в которой один или более атомов углерода и/или гетероатомов соединяют мостиком

5 моноциклические кольца-члены, например, хинуклидинильную группу. Термин «гетероциклил» включает бициклические, трициклические и тетрациклические группы, где любое из перечисленных выше гетероциклических колец конденсировано с 1, 2 или 3 карбоциклическими кольцами, например, арильным кольцом, циклогексановым

10 кольцом, циклогексеновым кольцом, циклопентановым кольцом, циклопентеновым кольцом или другим моноциклическим гетероциклическим кольцом, таким как индолил, хинолил, изохинолил, тетрагидрохинолил, бензофурил, бензотиенил и т.п. Примеры конденсированных гетероциклилов включают тропаны и 1,2,3,5,8,8а-

15 гексагидроиндолизин. Гетероциклические структуры включают пирролил, пирролинил, пирролидинил, пиразолил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолил, имидазолинил, имидазолидинил, пиридил, пиперидинил, гомопиперидинил, пиразинил, пиперазинил, пиримидинил, пиридазинил, оксазолил, оксазолидинил, изоксазолил, изоксазолидинил, морфолинил, тиоморфолинил, тиазолил, тиазолидинил, изотиазолил, изотиазолидинил, индолил, индазолил, хинолил, изохинолил, хиноксалинил, дигидрохиноксалинил,

20 хиназолинил, циннолинил, фталазинил, бензимидазолил, бензотиазолил, бензоксазолил, бензотиадиазолил, фурил, тиенил, тиазолидинил, изотиазолил, триазолил, тетразолил, оксадиазолил (например, 1,2,3-оксадиазолил), пуринил, тиадиазолил (например, 1,2,3-тиадиазолил), тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, дигидротиенил, дигидроиндолил, дигидрохинолил, тетрагидрохинолил, тетрагидроизохинолил, дигидроизохинолил, пиранил, дигидропиранил, дитиазолил, бензофуранил

25 изобензофуранил, бензотиенил и т.п., в том числе их дигидро- и тетрагидроформы, в которых одна или более двойных связей восстановлены и заменены атомами водорода. Другие примеры гетероциклилов включают: 2,3,4,5-тетрагидро-2-оксо-оксазолил; 2,3-дигидро-2-оксо-1Н-имидазолил; 2,3,4,5-тетрагидро-5-оксо-1Н-пиразолил (например, 2,3,4,5-тетрагидро-2-фенил-5-оксо-1Н-пиразолил); 2,3,4,5-тетрагидро-2,4-диоксо-1Н-

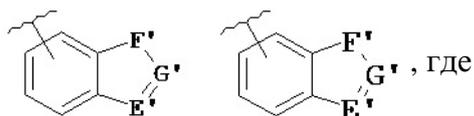
30 имидазолил (например, 2,3,4,5-тетрагидро-2,4-диоксо-5-метил-5-фенил-1Н-имидазолил); 2,3-дигидро-2-тиоксо-1,3,4-оксадиазолил (например, 2,3-дигидро-2-тиоксо-5-фенил-1,3,4-оксадиазолил); 4,5-дигидро-5-оксо-1Н-триазолил (например, 4,5-дигидро-3-метил-4-амино-5-оксо-1Н-триазолил); 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксопиридинил (например, 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3,3-диэтилпиридинил); 2,6-диоксо-пиперидинил (например,

35 2,6-диоксо-3-этил-3-фенилпиперидинил); 1,6-дигидро-6-оксопиримидинил; 1,6-дигидро-4-оксопиримидинил (например, 2-(метилтио)-1,6-дигидро-4-оксо-5-метилпиримидин-1-ил); 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксопиримидинил (например, 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3-этилпиримидинил); 1,6-дигидро-6-оксо-пиридазинил (например, 1,6-дигидро-6-оксо-3-этилпиридазинил); 1,6-дигидро-6-оксо-1,2,4-триазинил (например, 1,6-дигидро-5-

40 изопропил-6-оксо-1,2,4-триазинил); 2,3-дигидро-2-оксо-1Н-индолил (например, 3,3-диметил-2,3-дигидро-2-оксо-1Н-индолил и 2,3-дигидро-2-оксо-3,3'-спиропропан-1Н-индол-1-ил); 1,3-дигидро-1-оксо-2Н-изо-индолил; 1,3-дигидро-1,3-диоксо-2Н-изо-индолил; 1Н-бензопиразолил (например, 1-(этоксикарбонил)-1Н-бензопиразолил); 2,3-дигидро-2-оксо-1Н-бензимидазолил (например, 3-этил-2,3-дигидро-2-оксо-1Н-бензимидазолил);

45 2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазолил (например, 5-хлор-2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазолил); 2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазолил; 2-оксо-2Н-бензопиранил; 1,4-бензодиоксанил; 1,3-бензодиоксанил; 2,3-дигидро-3-оксо-4Н-1,3-бензотиазинил; 3,4-дигидро-4-оксо-3Н-хиназолинил (например, 2-метил-3,4-дигидро-4-оксо-3Н-хиназолинил); 1,2,3,4-тетрагидро-

2,4-диоксо-3Н-хиназолил (например, 1-этил-1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3Н-хиназолил); 1,2,3,6-тетрагидро-2,6-диоксо-7Н-пуринил (например, 1,2,3,6-тетрагидро-1,3-диметил-2,6-диоксо-7Н-пуринил); 1,2,3,6-тетрагидро-2,6-диоксо-1Н-пуринил (например, 1,2,3,6-тетрагидро-3,7-диметил-2,6-диоксо-1Н-пуринил); 2-оксобенз[с,d]индолил; 1,1-диоксо-2Н-нафт[1,8-с,d]изотиазолил; и 1,8-нафтилендикарбоксамидо. Дополнительные гетероциклические структуры включают 3,3а,4,5,6,6а-гексагидро-пирроло[3,4-в]пиррол-(2Н)-ил и 2,5-диазабицикло[2,2,1]гептан-2-ил, гомопиперазинил (или диазепанил), тетрагидропиранил, дитиазолил, бензофуранил, бензотиенил, оксепанил, тиепанил, азоканил, оксеканил и тиоканил. Гетероциклические группы также включают группы формулы



E' выбран из группы, состоящей из: -N- и -CH-; F' выбран из группы, состоящей из: -N=CH-, -NH-CH₂-, -NH-C(O)-, -NH-, -CH=N-, -CH₂-NH-, -C(O)-NH-, -CH=CH-, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂O-, -OCH₂-, -O- и -S-; и G' выбран из группы, состоящей из: -CH- и -N-. Любая из гетероциклических групп, упомянутых в настоящем документе, необязательно может быть замещена 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: (1) C₁₋₇-ацила (например, карбоксиальдегид); (2) C₁₋₂₀-алкила (например, C₁₋₆-алкил, C₁₋₆-алкокси-C₁₋₆-алкил, C₁₋₆-алкилсульфинил-C₁₋₆-алкил, амино-C₁₋₆-алкил, азидо-C₁₋₆-алкил, (карбоксиальдегид)-C₁₋₆-алкил, галоген-C₁₋₆-алкил (например, перфторалкил), гидроксид-C₁₋₆-алкил, нитро-C₁₋₆-алкил или C₁₋₆-тиоалкокси-C₁₋₆-алкил); (3) C₁₋₂₀-алкокси (например, C₁₋₆-алкокси, такой как перфторалкокси); (4) C₁₋₆-алкилсульфинила; (5) C₆₋₁₀-арила; (6) амино; (7) C₁₋₆-алкил-C₆₋₁₀-арила; (8) азидо; (9) C₃₋₈-циклоалкила; (10) C₁₋₆-алкил-C₃₋₈-циклоалкила; (11) галогена; (12) C₁₋₁₂-гетероциклила (например, C₂₋₁₂-гетероарил); (13) (C₁₋₁₂-гетероциклил)окси; (14) гидроксид; (15) нитро; (16) C₁₋₂₀-тиоалкокси (например, C₁₋₆-тиоалкокси); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'}, где q равно целому числу от 0 до 4, и R^{A'} выбран из группы, состоящей из: (а) C₁₋₆-алкила, (б) C₆₋₁₀-арила, (в) водорода и (г) C₁₋₆-алкил-C₆₋₁₀-арила; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'}R^{C'}, где q равно целому числу от 0 до 4, и где R^{B'} и R^{C'} независимо выбраны из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C₁₋₆-алкила, (в) C₆₋₁₀-арила и (г) C₁₋₆-алкил-C₆₋₁₀-арила; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'}, где q равно целому числу от 0 до 4, и где R^{D'} выбран из группы, состоящей из: (а) C₁₋₆-алкила, (б) C₆₋₁₀-арила и (в) C₁₋₆-алкил-C₆₋₁₀-арила; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'}R^{F'}, где q равно целому числу от 0 до 4, и где каждый из R^{E'} и R^{F'} независимо выбран из группы, состоящей из: (а) водорода, (б) C₁₋₆-алкила, (в) C₆₋₁₀-арила и (г) C₁₋₆-алкил-C₆₋₁₀-арила; (21) тиола; (22) C₆₋₁₀-арилокси; (23) C₃₋₈-циклоалкокси; (24) арилалкокси; (25) C₁₋₆-алкил-C₁₋₁₂-гетероциклила (например, C₁₋₆-алкил-C₁₋₁₂-гетероарил); (26) оксо; (27) (C₁₋₁₂-гетероциклил)имино; (28) C₂₋₂₀-алкенила; и (29) C₂₋₂₀-алкинила. В некоторых вариантах реализации каждая из указанных групп может быть дополнительно замещена, как раскрыто в настоящем документе. Например, алкиленовая группа в C₁-алкариле или C₁-алкилгетероциклиле

может быть дополнительно замещена оксогруппой с образованием соответствующего арилоильного и (гетероциклил)оильного заместителя.

[00791] Термин «(гетероциклил)имино» в настоящем документе обозначает гетероциклильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через иминогруппу. В некоторых вариантах реализации гетероциклильная группа может быть замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

[00792] Термин «(гетероциклил)окси» в настоящем документе обозначает гетероциклильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через атом кислорода. В некоторых вариантах реализации гетероциклильная группа может быть замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

[00793] Термин «(гетероциклил)оил» в настоящем документе обозначает гетероциклильную группу, как определено в настоящем документе, присоединенную к родительской молекулярной группе через карбонильную группу. В некоторых вариантах реализации гетероциклильная группа может быть замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как определено в настоящем документе.

[00794] Термин «углеводород» в настоящем документе обозначает группу, состоящую только из атомов углерода и водорода.

[00795] Термин «гидрокси» в настоящем документе обозначает группу -ОН.

[00796] Термин «гидроксиалкенил» в настоящем документе обозначает алкенильную группу, как определено в настоящем документе, замещенную от 1 до 3 гидроксигрупп, при условии, что не более одной гидроксигруппы может быть присоединено к одному атому углерода алкильной группы, и проиллюстрирован примерами дигидроксипропила, гидроксиизопентенила и т.п.

[00797] Термин «гидроксиалкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, замещенную от 1 до 3 гидроксигрупп, при условии, что не более одной гидроксигруппы может быть присоединено к одному атому углерода алкильной группы, и проиллюстрирован примерами гидроксиметила, дигидроксипропила и т.п.

[00798] Термин «изомер» в настоящем документе обозначает любой таутомер, стереоизомер, энантиомер или диастереомер любого соединения по изобретению. Предполагается, что соединения по изобретению могут содержать один или более хиральных центров и/или двойных связей и, таким образом, существовать в виде стереоизомеров, таких как изомеры двойной связи (т.е., геометрические E/Z изомеры) или диастереомеры (например, энантиомеры (т.е., (+) или (-)) или цис/транс изомеры). В соответствии с изобретением, химические структуры, проиллюстрированные в настоящем документе, и, таким образом, соединения по изобретению, охватывают все соответствующие стереоизомеры, в стереохимически чистой форме (например, геометрически чистые, энантиомерно чистые или диастереомерно чистые), а также энантиомерные и стереоизомерные смеси, например, рацематы. Энантиомерные и стереоизомерные смеси соединений по изобретению типично могут быть разделены на составляющие энантиомеры или стереоизомеры хорошо известными методами, такими как хирально-фазовая газовая хроматография, хирально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, кристаллизация соединения в виде комплекса хиральной соли или кристаллизация соединения в хиральном растворителе. Энантиомеры и стереоизомеры также могут быть получены из стереомерно или энантиомерно чистых полупродуктов, реагентов и катализаторов хорошо известными методами

асимметрического синтеза.

[00799] Термин «N-защищенный amino» в настоящем документе обозначает аминогруппу, как определено в настоящем документе, к которой присоединена одна или две N-защитных группы, как определено в настоящем документе.

5 [00800] Термин «N-защитная группа» в настоящем документе обозначает группы, предназначенные для защиты аминогруппы от нежелательных реакций в ходе процедуры синтеза. Широко используемые \wedge -защитные группы раскрыты в Greene, "Protective
10 Groups in Organic Synthesis," 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999), которое включено в настоящий документ посредством ссылки. N-Защитные группы включают ацильные, арилоильные или карбамильные группы, такие как формил, ацетил, пропионил, пивалоил, трет-бутилацетил, 2-хлорацетил, 2-бромацетил, трифторацетил, трихлорацетил, фталил, о-нитрофеноксиацетил, α -хлорбутирил, бензоил, 4-хлорбензоил, 4-бромбензоил, 4-нитробензоил и хиральные вспомогательные вещества, такие как защищенные или незащищенные D-, L- или D,L-аминокислоты, такие как аланин, лейцин,
15 фенилаланин и т.п.; сульфонил-содержащие группы, такие как бензолсульфонил, п-толуолсульфонил и т.п.; арбамат-образующие группы, такие как бензилоксикарбонил, п-хлорбензилоксикарбонил, п-метоксибензилоксикарбонил, п-нитробензилоксикарбонил, 2-нитробензилоксикарбонил, п-бромбензилоксикарбонил, 3,4-диметоксибензилоксикарбонил, 3,5-диметоксибензилоксикарбонил, 2,4-
20 диметоксибензилоксикарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, 2-нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил, 3,4,5-триметоксибензилоксикарбонил, 1-(п-бифенилил)-1-метилэтоксикарбонил, а,а-диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил, бензгидрилоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил, диизопропилметоксикарбонил изопропилоксикарбонил, этоксикарбонил, метоксикарбонил, аллилоксикарбонил,
25 2,2,2,-трихлорэтоксикарбонил, феноксикарбонил, 4-нитрофенокси карбонил, фторенил-9-метоксикарбонил, циклопентилоксикарбонил, адамантилоксикарбонил, циклогексилоксикарбонил, фенилтиокарбонил и т.п., алкарильные группы, такие как бензильные, трифенилметильные, бензилоксиметильные и т.п., а также силильные группы, такие как триметилсилил и т.п. Предпочтительные N-защитные группы
30 представляют собой формил, ацетил, бензоил, пивалоил, трет-бутилацетил, аланил, фенилсульфонил, бензил, трет-бутилоксикарбонил (Boc) и бензилоксикарбонил (Cbz).

[00801] Термин «нитро» в настоящем документе обозначает группу $-\text{NO}_2$.

[00802] Термин «оксо» в настоящем документе обозначает $=\text{O}$.

35 [00803] Термин «перфторалкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, где каждый водородный радикал, связанный с алкильной группой, заменен фторид-радикалом. Перфторалкильные группы проиллюстрированы примерами трифторметила, пентафторэтила и т.п.

40 [00804] Термин «перфторалкокси» в настоящем документе обозначает алкоксигруппу, как определено в настоящем документе, где каждый водородный радикал, связанный с алкоксигруппой, заменен фторид-радикалом. Перфторалкоксигруппы проиллюстрированы примерами трифторметокси, пентафторэтокси и т.п.

45 [00805] Термин «спироцикл» в настоящем документе обозначает C_{2-7} алкиленовый дирадикал, оба конца которого присоединены к одному и тому же атому углерода родительской группы, с образованием спироциклической группы, а также C_{1-6} гетероалкиленовый дирадикал, оба конца которого присоединены к одному и тому же атому. Гетероалкиленовый радикал, образующий спироциклическую группу, может содержать 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из группы, состоящей из:

азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах реализации спироциклическая группа содержит от 1 до 7 атомов углерода, исключая атом углерода, к которому присоединен дирадикал. Spiroциклические группы по изобретению могут быть необязательно замещены 1, 2, 3 или 4 заместителями, раскрытыми в настоящем документе как

5 необязательные заместители для циклоалкильных и/или гетероциклических групп.

[00806] Термин «стереоизомер» в настоящем документе обозначает все возможные различные изомерные, а также конформационные формы, которые может принимать соединение (например, соединение любой из формул, раскрытых в настоящем документе), в частности, все возможные стереохимически и конформационно изомерные

10 формы, все диастереомеры, энантиомеры и/или конформеры базовой молекулярной структуры. Некоторые соединения по настоящему изобретению могут существовать в различных таутомерных формах, все из которых включены в настоящее изобретение.

[00807] Термин «сульфоалкил» в настоящем документе обозначает алкильную группу, как определено в настоящем документе, замещенную сульфогруппой $-SO_3H$. В некоторых

15 вариантах реализации алкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе.

[00808] Термин «сульфонил» в настоящем документе обозначает группу $-S(O)_2$.

[00809] Термин «тиоалкарил» в настоящем документе обозначает химический заместитель формулы $-SR$, где R представляет собой алкарильную группу. В некоторых

20 вариантах реализации алкарильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе.

[00810] Термин «тиоалкилгетероциклил» в настоящем документе обозначает химический заместитель формулы $-SR$, где R представляет собой алкилгетероциклическую

25 группу. В некоторых вариантах реализации алкилгетероциклическая группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе.

[00811] Термин «тиоалкокси» в настоящем документе обозначает химический заместитель формулы $-SR$, где R представляет собой алкильную группу, как определено

30 в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации алкильная группа может быть дополнительно замещена 1, 2, 3 или 4 заместителями, как раскрыто в настоящем документе.

[00812] Термин «тиол» представляет группу $-SH$.

[00813] Соединение: в настоящем документе термин «соединение» включает все стереоизомеры, геометрические изомеры, таутомеры и изотопы проиллюстрированных

35 структур.

[00814] Соединения, раскрытые в настоящем документе, могут быть асимметрическими (например, содержащими один или более стереоцентров). Включены все стереоизомеры, такие как энантиомеры и диастереомеры, если не указано иное. Соединения в соответствии с настоящим документом, которые содержат асимметрически

40 замещенные атомы углерода, могут быть выделены в оптически активных или рацемических формах. Способы получения оптически активных форм из оптически активных исходных материалов известны из уровня техники, например, разделение рацемической смеси или стереоселективный синтез. Многие геометрические изомеры олефинов, $C=N$ двойной связи и т.п. также могут присутствовать в соединениях,

45 раскрытых в настоящем документе, и все такие стабильные изомеры включены в настоящее описание. Цис и транс геометрические изомеры соединений по настоящему изобретению раскрыты и могут быть выделены в виде смеси изомеров, или в виде разделенных изомерных форм.

[00815] Соединения по настоящему изобретению также включают таутомерные формы. Таутомерные формы являются результатом перемены местами одинарной связи и смежной двойной связи, с сопутствующей миграцией протона. Таутомерные формы включают прототропные таутомеры, которые соответствуют состояниям изомерной протонизации, с одинаковой эмпирической формулой и общим зарядом. Примеры прототропных таутомеров включают кето-енольные пары, пары амид-имидокислота, лактам-лактимные пары, пары амид-имидокислота, пары енамин-имин и кольцевые формы, в которых протон может занимать два или более положений в гетероциклической системе, такие как, 1Н- и 3Н-имидазол, 1Н-, 2Н- и 4Н-1,2,4-триазол, 1Н- и 2Н-изоиндол и 1Н- и 2Н-пиразол. Таутомерные формы могут находиться в равновесии или быть стерически замкнуты в одной форме путем введения подходящего заместителя.

[00816] Соединения по настоящему изобретению также включают все изотопы атомов, присутствующие в промежуточных или конечных соединениях. «Изотопы» обозначают атомы с таким же атомным номером, но отличающимися значениями массы в результате различного количества нейтронов в ядре. Например, изотопы водорода включают тритий и дейтерий.

[00817] Соединения и соли по настоящему изобретению могут быть получены в сочетании с молекулой растворителя или воды, с образованием сольватов и гидратов шаблонными способами.

[00818] Консервативный: в настоящем документе термин «консервативный» обозначает остатки нуклеотидов или аминокислот в полинуклеотидной или полипептидной последовательности, соответственно, встречающиеся в неизменном виде в одинаковом положении двух или более сравниваемых последовательностей. Относительно консервативными нуклеотидами или аминокислотами являются консервативные нуклеотиды или аминокислоты для последовательностей с более высокой степенью родства, чем нуклеотиды или аминокислоты в любом другом участке последовательностей.

[00819] В некоторых вариантах реализации две или более последовательностей указаны как «полностью консервативные», если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых вариантах реализации две или более последовательностей указаны как «в высокой степени консервативные», если они идентичны друг другу по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. В некоторых вариантах реализации две или более последовательностей указаны как «в высокой степени консервативные», если они идентичны друг другу приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99%. В некоторых вариантах реализации две или более последовательностей указаны как «консервативные», если они идентичны друг другу по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. В некоторых вариантах реализации две или более последовательностей указаны как «консервативные», если они идентичны друг другу приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99%. Понятие консервативности последовательности может применяться к полноразмерному олигонуклеотиду или полипептиду, или может применяться к его части, участку или

признаку.

[00820] Контролируемое высвобождение: в настоящем документе термин «контролируемое высвобождение» обозначает профиль высвобождения фармацевтического состава или соединения, который соответствует конкретному образцу высвобождения для достижения терапевтического результата.

[00821] Циклический или циклизированный: в настоящем документе термин «циклический» обозначает присутствие непрерывной петли. Циклические молекулы не обязательно являются круговыми, они только должны быть соединены с образованием неразрывной цепи субъединиц. Циклические молекулы, такие как сконструированная РНК или мРНК по настоящему изобретению, могут представлять собой одинарные модули или полимеры, или могут содержать один или более компонентов комплекса или структуры более высокого порядка.

[00822] Цитостатический: в настоящем документе «цитостатический» обозначает ингибирование, уменьшение, подавление роста, деления или размножения клетки (например, клетки млекопитающего (например, клетки человека)), бактерии, вируса, гриба, простейшего, паразита, приона или их комбинации.

[00823] Цитотоксический: в настоящем документе «цитотоксический» обозначает вызывающий гибель или оказывающий вредное, токсическое или смертельное воздействие на клетку (например, клетку млекопитающего (например, клетку человека)), бактерию, вирус, гриб, простейшее, паразита, прион или их комбинацию.

[00824] Доставка: в настоящем документе «доставка» обозначает действие или способ доставки соединения, вещества, молекулы, фрагмента, груза или полезной нагрузки.

[00825] Агент доставки: в настоящем документе «агент доставки» обозначает любое вещество, которое облегчает, по меньшей мере частично, доставку *in vivo* модифицированной нуклеиновой кислоты или мРНК в клетки-мишени.

[00826] Дестабилизированный: в настоящем документе термин «дестабилизируемый», «дестабилизировать» или «дестабилизированный участок» обозначает участок или молекулу, которая менее стабильна, чем исходная, дикого типа или нативная форма того же самого участка или молекулы.

[00827] Обнаружимая метка: в настоящем документе «обнаружимая метка» обозначает один или более маркеров, сигналов или фрагментов, которые присоединены, введены или связаны с другой молекулой, которая является легко обнаружимой способами, известными из уровня техники, в том числе, рентгенографическим, флуоресцентным, хемилюминесцентным, по ферментной активности, оптической плотности и т.п. Обнаружимые метки включают радиоизотопы, флуорофоры, хромофоры, ферменты, красители, ионы металлов, лиганды, такие как биотин, авидин, стрептавидин и гаптены, квантовые точки и т.п. Обнаружимые метки могут быть размещены в любом положении пептидов или белков, раскрытых в настоящем документе. Они могут находиться в пределах аминокислот, пептидов или белков, или могут находиться на N- или C-конце.

[00828] Расщеплять: в настоящем документе термин «расщеплять» обозначает разделение на фрагменты или компоненты меньшего размера. В случае полипептидов или белков расщепление приводит к образованию пептидов.

[00829] Дистальный: в настоящем документе термин «дистальный» обозначает расположенный вдали от центра или вдали от целевой точки или участка.

[00830] Коэффициент разделения дозы (КРД) - соотношение дозы в упаковке (PUD) при лечении разделенными дозами, полученное делением дозы в упаковке (PUD) на общую суточную дозу или разовую дозу. Значение получают в результате сравнения

групп с различными схемами лечения.

[00831] Инкапсулировать: в настоящем документе термин «инкапсулировать» обозначает включать, окружать или заключать в оболочку.

5 [00832] Сконструированный: в настоящем документе варианты реализации изобретения являются «сконструированными», если они разработаны таким образом, чтобы обладать признаком или свойством, структурным или химическим, который отличается от начальной точки, дикого типа или природной молекулы.

[00833] Экзосома: в настоящем документе «экзосома» представляет собой пузырек, секретируемый клетками млекопитающих.

10 [00834] Экспрессия: в настоящем документе «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты обозначает одно или более из следующих событий: (1) продуцирование шаблона РНК из последовательности ДНК (например, посредством транскрипции); (2) процессинг транскрипта РНК (например, посредством сплайсинга, «редактирования», образования 5' кэпа и/или процессинга 3' конца); (3) трансляцию РНК в полипептид или белок; и (4) посттрансляционную модификацию полипептида или белка.

[00835] Признак: в настоящем документе «признак» обозначает характеристику, свойство или отличный элемент.

20 [00836] Препарат (состав): в настоящем документе «препарат (состав)» содержит по меньшей мере модифицированную нуклеиновую кислоту или ммРНК и агент доставки.

[00837] Фрагмент: в настоящем документе «фрагмент» обозначает часть. Например, фрагменты белков могут содержать полипептиды, полученные расщеплением полноразмерного белка, выделенного из культивированной клетки.

25 [00838] Функциональный: в настоящем документе «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологическую молекулу в форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, являющуюся для нее характерной.

[00839] Гомология: в настоящем документе термин «гомология» обозначает общую степень родства между полимерными молекулами, например, между молекулами нуклеиновой кислоты (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептида. В некоторых вариантах реализации полимерные молекулы рассматриваются как «гомологичные» друг Другу, если их последовательности по меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичны или подобны. Термин «гомологичный» обязательно подразумевает сравнение по меньшей мере двух последовательностей (полинуклеотидных или полипептидных последовательностей).

30 В соответствии с изобретением, две полинуклеотидные последовательности рассматриваются как гомологичные, если кодируемые ими полипептиды являются гомологичными по меньшей мере приблизительно на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или даже 99% по меньшей мере на одном участке длиной по меньшей мере

40 приблизительно 20 аминокислот. В некоторых вариантах реализации гомологичные полинуклеотидные последовательности характеризуются способностью кодировать участок длиной по меньшей мере 4-5 уникально определенных аминокислот. Для полинуклеотидных последовательностей длиной менее 60 нуклеотидов, гомология определяется по способности кодировать участок длиной по меньшей мере 4-5 уникально

45 определенных аминокислот. В соответствии с изобретением, две белковые последовательности рассматриваются как гомологичные, если белки по меньшей мере приблизительно на 50%, 60%, 70%, 80% или 90% идентичны на протяжении по меньшей мере одного участка длиной по меньшей мере приблизительно 20 аминокислот.

[00840] Идентичность: в настоящем документе термин «идентичность» обозначает общую степень родства между полимерными молекулами, например, между молекулами олигонуклеотидов (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Вычисление процента идентичности для двух последовательностей полинуклеотидов, например, может быть осуществлено путем выравнивания двух последовательностей для целей оптимального сравнения (например, промежутки могут быть введены в одну или обе, первую и вторую последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания, и не идентичными последовательностями можно пренебрегать для целей сравнения). В некоторых вариантах реализации длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% от длины референтной последовательности. Затем сравниваются нуклеотиды в соответствующих положениях нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято таким же нуклеотидом, как соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений в двух последовательностях, с учетом количества промежутков и длины каждого промежутка, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей может быть осуществлено с применением математического алгоритма. Например, процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей может быть определен с применением таких методов, как раскрыты в Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; каждое из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Например, процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей может быть определен с применением алгоритма Meyers и Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы веса остатков РАМ120, штрафа на продление пропуска 12 и штрафа за пропуск в последовательности 4. Альтернативно, процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей может быть определен с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG с применением матрицы NWSgapdna.CMP. Широко применяемые для определения процента идентичности последовательностей методы включают, без ограничений, раскрытые в Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988); включена в настоящий документ посредством ссылки. Методики определения идентичности закодированы в публично доступных компьютерных программах. В качестве примера, компьютерное программное обеспечение для определения гомологии двух последовательностей включает, без ограничений, программный пакет GCG, Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA Altschul, S.F. et al., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990)).

[00841] Подавление экспрессии гена: в настоящем документе выражение «подавление экспрессии гена» обозначает индукцию снижения количества продукта экспрессии гена. Продуктом экспрессии может быть транскрибированная из гена РНК (например, мРНК)

или полипептид, транслированный из мРНК, транскрибированной из гена. Типично, снижение уровня мРНК приводит к снижению уровня транслированного из нее полипептида. Уровень экспрессии может быть определен с применением стандартных техник измерения уровня мРНК или белка.

5 [00842] *In vitro*: в настоящем документе термин «*in vitro*» обозначает события, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционной емкости, в культуре клеток, в чашке Петри и т.д., скорее, чем в организме (например, животном, растительном или микроорганизме).

10 [00843] *In vivo*: в настоящем документе термин «*in vivo*» обозначает события, которые происходят в организме (например, растительном, животном или микроорганизме, или клетке или ткани указанного организма).

[00844] Выделенный: в настоящем документе термин «выделенный» обозначает вещество или молекулу, которое отделено по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми оно связано (в природе или в экспериментальных условиях). Выделенным
15 веществам могут быть присущи различные уровни чистоты, с точки зрения веществ, с которыми они были связаны. Выделенные вещества и/или молекулы могут быть отделены по меньшей мере от приблизительно 10%, от приблизительно 20%, от приблизительно 30%, от приблизительно 40%, от приблизительно 50%, от приблизительно 60%, от приблизительно 70%, от приблизительно 80%, от
20 приблизительно 90% или более других компонентов, с которыми они были изначально связаны. В некоторых вариантах выделенные агенты являются более чем приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%,
25 приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или более чем приблизительно на 99% чистыми. В настоящем документе вещество является «чистым», если оно в значительной степени свободно от других компонентов. В существенной мере выделенный: под «в существенной мере выделенным»
30 подразумевается соединение, которое в значительной степени отделено от окружения, в котором оно образовалось или было обнаружено. Частичное отделение может включать, например, состав, обогащенный соединением по настоящему изобретению. Значительное отделение может включать состав, содержащий по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере
35 приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% масс, соединения по настоящему изобретению или его соли. Способы выделения соединений и их солей являются шаблонными для данной области.

[00845] Линкер: в настоящем документе линкер обозначает группу атомов, например,
40 10-1000 атомов, и может состоять из атомов или групп, таких как, без ограничений, углерод, amino, алкиламино, кислород, сера, сульфоксид, сульфонил, карбонил и имин. Линкер может быть присоединен к модифицированному нуклеозиду или нуклеотиду на нуклеиновом основании или остатке сахара на первом конце и к полезной нагрузке, например, обнаружимому или терапевтическому агенту, на втором конце. Длина линкера
45 может быть достаточной для того, чтобы не мешать введению в последовательность нуклеиновой кислоты. Линкер может применяться для любой пригодной цели, например, для образования мультимеров мРНК (например, посредством связи двух или более модифицированных молекул нуклеиновой кислоты или молекул мРНК) или

конъюгатов мРНК, а также для введения полезной нагрузки, как раскрыто в настоящем документе. Примеры химических групп, которые могут быть введены в линкер, включают, без ограничений, алкил, алкенил, алкинил, амидо, amino, эфир, тиоэфир, сложный эфир, алкилен, гетероалкилен, арил или гетероциклил, каждая из которых
5 необязательно может быть замещена, как раскрыто в настоящем документе. Примеры линкеров включают, без ограничений, ненасыщенные алканы, полиэтиленгликоли (например, мономерные единицы этилен- или пропиленгликоля, такие как диэтиленгликоль, дипропиленгликоль, триэтиленгликоль, трипропиленгликоль, тетраэтиленгликоль или тетраэтиленгликоль) и полимеры декстрана, а также их
10 производные. Другие примеры включают, без ограничений, расщепляемые фрагменты в пределах линкера, такие как, например, дисульфидная связь (-S-S-) или азосвязь (-N=N-), которые могут быть расщеплены с помощью восстанавливающего агента или фотолизиса. Неограничивающие примеры избирательно расщепляемой связи включают амидную связь, которая может быть расщеплена, например с помощью трис(2-карбокситил)фосфина (ТКЭФ) или других восстанавливающих агентов и/или фотолизиса, а также эфирная связь может быть расщеплена, например, кислотным или
15 основным гидролизом.

[00846] Сайт связывания микроРНК (миРНК): в настоящем документе сайт связывания микроРНК (миРНК) обозначает положение нуклеотида или участок
20 транскрипта нуклеиновой кислоты, с которым связывается по меньшей мере «запальная зона» миРНК.

[00847] Модифицированный: в настоящем документе «модифицированный» обозначает измененное состояние или структура молекулы по изобретению. Молекулы могут быть модифицированы множеством способов, в том числе, химически, структурно
25 и функционально. В одном варианте реализации молекулы мРНК по настоящему изобретению модифицированы введением неприродных нуклеозидов и/или нуклеотидов.

[00848] Слизь: в настоящем документе «слизь» обозначает природное вещество, которое является вязким и содержит муциновые гликопротеины.

[00849] Встречающийся в природе: в настоящем документе «встречающийся в
30 природе» обозначает существующий в природе без искусственной помощи.

[00850] Негуманоидное позвоночное: в настоящем документе «негуманоидное позвоночное» включает всех позвоночных, кроме Homo sapiens, в том числе, дикие и одомашненные виды. Примеры негуманоидных позвоночных включают, без
ограничений, млекопитающих, таких как альпака, бантенг, бизон, верблюд, кошка,
35 теленок, олень, собака, осел, гайал, коза, морская свинка, лошадь, лама, мул, свинья, кролик, северный олень, овца, индийский буйвол и як.

[00851] Нецелевой: в настоящем документе «нецелевой» обозначает любое непреднамеренное воздействие на одну или более из любых мишеней, генов или клеточных транскриптов.

[00852] Открытая рамка считывания: в настоящем документе «открытая рамка считывания» или «ОРС» обозначает последовательность, которая не содержит стоп-кодона в пределах заданной рамки считывания.

[00853] Функционально связанный: в настоящем документе выражение «функционально связанный» обозначает функциональную связь между двумя или более
45 молекул, конструкторов, транскриптов, химических объектов, фрагментов и т.п.

[00854] Паратоп: в настоящем документе «паратоп» обозначает антигенсвязывающий сайт антитела.

[00855] Пациент (больной): в настоящем документе «пациент» обозначает субъекта,

который может обращаться за лечением или нуждаться в лечении, требовать лечения, получать лечение, будет получать лечение, или субъекта, за которым ухаживает обученный профессионал вследствие конкретного заболевания или состояния.

5 [00856] Пептид: в настоящем документе длина «пептида» составляет ≤ 50 аминокислот, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

[00857] Фармацевтически приемлемый: выражение «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения соединений, материалов, составов и/или лекарственных форм, которые, по мнению специалистов в области медицины, пригодны для применения в контакте с тканями человека и животных, без чрезмерной
10 токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно с разумным соотношением риск/польза.

[00858] Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества: выражение «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» в настоящем документе обозначает любой ингредиент, кроме соединений, раскрытых в настоящем документе
15 (например, растворитель, в котором может быть суспендировано или растворено активное соединение), в существенной мере нетоксичный и не обладающий воспалительным воздействием на пациента. Вспомогательные вещества могут включать, например: антиадгезивы, антиоксиданты, связывающие агенты, покрытия, улучшающие прессование вещества, дезинтегранты, красители (окрашенные вещества), смягчающие
20 вещества, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразующие вещества или покрытия, вкусовые добавки, ароматизаторы, вещества для улучшения скольжения (сыпучести), консерванты, чернила для нанесения надписей, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие агенты, подсластители и гидратационную воду. В качестве примера, вспомогательные вещества включают, без ограничений:

25 бутилированный гидрокситолуол (БГТ), кальция карбонат, кальция фосфат (двухосновный), кальция стеарат, кроскармеллозу, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, магния стеарат, мальтитол, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен,
30 микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, кремния диоксид, натрий карбоксиметилцеллюлозу, натрия цитрат, натрия крахмал гликолят, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, титана диоксид, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

35 [00859] Фармацевтически приемлемые соли: настоящее описание также включает фармацевтически приемлемые соли соединений, раскрытых в настоящем документе. В настоящем документе выражение «фармацевтически приемлемые соли» обозначает производные раскрытых соединений, в которых родительское соединение модифицировано путем превращения существующего фрагмента кислоты или основания
40 в форму соли (например, реакцией группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, без ограничений, соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и т.п. Характерные кислотно-аддитивные соли включают соли ацетата, адипата, альгината, аскорбата, аспартата, бензолсульфоната, бензоата, бисульфата, бората, бутирата, камфората, камфорсульфоната, цитрата, циклопентанпропионата, биглюконата, додецилсульфата, этансульфоната, фумарата, глюкогептоната, глицерофосфата, гемисульфат, гептоната, гексаноата, гидробромида,

гидрохлорида, гидройодида, 2-гидрокси-этансульфоната, лактобионата, лактата, лаурата, лаурилсульфата, малата, малеата, малоната, метансульфоната, 2-нафталинсульфоната, никотината, нитрата, олеата, оксалата, пальмитата, памоата, пектината, персульфата, 3-фенилпропионата, фосфата, пикрата, пивалата, пропионата, 5 стеарата, сукцината, сульфата, тартрата, тиоцианата, толуолсульфоната, ундеканоата, валерата и т.п. Характерные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и т.п., а также нетоксичных катионов аммония, четвертичного аммония и аминов, в том числе, без ограничений, аммония, тетраметиламмония, тетраэтиламмония, метиламина, диметиламина, триметиламина, 10 триэтиламина, этиламина и т.п. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению включают традиционные нетоксичные соли родительского соединения, образованные, например, с нетоксичными неорганическими или органическими кислотами. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из родительского соединения, которое содержит основной или 15 кислотный фрагмент, традиционными химическими способами. В общем, такие соли могут быть получены реакцией формы свободной кислоты или основания указанных соединений со стехиометрическим количеством пригодного основания или кислоты в воде или органическом растворителе или в смеси обоих; в общем, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются 20 предпочтительными. Перечни пригодных солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, и Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

25 [00860] Фармацевтически приемлемый сольват: термин «фармацевтически приемлемый сольват» в настоящем документе обозначает соединение по изобретению, в котором молекулы подходящего растворителя включены в кристаллическую решетку. Подходящим растворителем является физиологически переносимый во всех вводимых 30 дозах. Например, сольваты могут быть получены кристаллизацией, перекристаллизацией или осаждением из раствора, который содержит органические растворители, воду или их смесь. Примерами подходящих растворителей являются этанол, вода (например, моно-, ди- и тригидраты), N-метилпирролидинон (NMP), диметилсульфоксид (ДМСО), N,N'-диметилформамид (ДМФА), N,N'-диметилацетамид (ДМА), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (ДМИ), 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2-(1H)-пиримидинон (ДМТП), 35 ацетонитрил (ACN), пропиленгликоль, этилацетат, бензиловый спирт, 2-пирролидон, бензилбензоат и т.п. Если растворителем является вода, сольват называют «гидратом».

40 [00861] Фармакокинетический: в настоящем документе «фармакокинетический» обозначает одно или более из любых свойств молекулы или соединения, относящихся к определению поведения веществ, введенных в живой организм. Фармакокинетика подразделяется на несколько областей, в том числе, степень и скорость абсорбции, 45 распределение, метаболизм и экскреция. Эти области в общем обозначают АРМЭ, где: (А) абсорбция представляет собой процесс попадания вещества в кровоток; (Р) распределение обозначает дисперсию или распространение веществ в жидкостях и тканях организма; (М) метаболизм (или биологическое превращение) представляет собой необратимое превращение родительского соединения в дочерние метаболиты; и (Э) экскреция (или элиминация) обозначает элиминацию веществ из организма. В редких случаях, некоторые лекарственные средства необратимо накапливаются в ткани организма.

[00862] Фармакологический эффект: в настоящем документе «фармакологический эффект» представляет собой измеримый биологический феномен в организме или системе, который возникает после приведения организма или системы в контакт или воздействия экзогенного агента. Фармакологические эффекты могут приводить к терапевтически эффективному результату, такому как лечение, улучшение одного или более симптомов, постановке диагноза, предупреждению или задержке развития заболевания, расстройства, состояния или инфекции. Измерение таких биологических феноменов может быть количественным, качественным или относительным к другому биологическому феномену. Количественное измерение может быть статистически значимым. Качественное измерение может проводиться по степени или качеству и может быть по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более отличающимся. Они могут наблюдаться как присутствие или отсутствие, лучше или хуже, более или менее. Экзогенные агенты, при ссылке на фармакологические эффекты, представляют собой такие агенты, которые, в целом или частично, чужеродны для организма или системы. Например, модификации в биомолекуле дикого типа, структурные или химические, будут давать экзогенный агент. Подобным образом, введение или сочетание молекулы дикого типа в или с соединением, молекулой или веществом, не встречающимся от природы в организме или системе, также будет давать экзогенный агент. Модифицированные мРНК по настоящему изобретению включают экзогенные агенты. Примеры фармакологических эффектов включают, без ограничений, изменение количества клеток, например, увеличение или уменьшение количества нейтрофилов, ретикулоцитов, гранулоцитов, эритроцитов (красные кровяные клетки), мегакариоцитов, тромбоцитов, моноцитов, макрофагов соединительной ткани, эпидермальных клеток Лангерганса, остеокластов, дендритных клеток, клеток микроглии, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, тучных клеток, Т-хелперов, Т-супрессоров, цитотоксических Т-клеток, природных Т-клеток киллеров, В-клеток, природных клеток-киллеров или ретикулоцитов. Фармакологические эффекты также включают изменения химических показателей крови, рН, уровня гемоглобина, гематокрита, изменение уровней ферментов, таких как, без ограничений, ферменты печени АСТ и АлАТ, изменения профиля липидов, электролитов, метаболических маркеров, гормонов или другого маркера или профиля, известного специалистам в данной области.

[00863] Физико-химический: в настоящем документе «физико-химический» обозначает или относится к физическому и/или химическому свойству.

[00864] Предупреждение (профилактика): в настоящем документе термин «предупреждение (профилактика)» обозначает частичную или полную задержку развития инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния; полную или частичную задержку развития одного или более симптомов, признаков или клинических проявлений конкретной инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния; частичную или полную задержку развития одного или более симптомов, признаков или проявлений конкретной инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния; частичную или полную задержку прогрессирования инфекции, конкретного заболевания, расстройства и/или состояния; и/или снижение риска развития патологии, связанной с инфекцией, заболеванием, расстройством и/или состоянием.

[00865] Пролекарство: настоящее описание также включает пролекарства соединений, раскрытых в настоящем документе. В настоящем документе «пролекарства» обозначают любое вещество, молекулу или химический объект, который находится в форме, предшествующей такому веществу, молекуле или химическому объекту, который после

химической или физической модификации действует как терапевтический агент. Пролекарства могут быть ковалентно связаны или секвестрированы каким-либо способом, и высвобождаются или превращаются в активный лекарственный фрагмент перед, во время или после введения субъекту-млекопитающему. Пролекарства могут
 5 быть получены путем модификации функциональных групп, присутствующих в соединениях, таким способом, что указанные модификации представляют собой расщепление посредством шаблонной манипуляции или *in vivo*, до родительского соединения. Пролекарства включают соединения, в которых гидроксильные, аминные, сульфгидрильные или карбоксильные группы связаны с любой группой, которая, при
 10 введении субъекту-млекопитающему, расщепляется с образованием свободного гидроксила, аминной, сульфгидрильной или карбоксильной группы, соответственно. Получение и применение пролекарств обсуждается в T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, и в Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,
 15 1987, обе из которых включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00866] Пролиферировать: в настоящем документе термин «пролиферировать» обозначает расти, расширяться или увеличиваться или вызывать быстрый рост, расширение или увеличение. «Пролиферативный» обозначает способность
 20 пролиферировать. «Антипролиферативный» обозначает свойство противодействовать или противостоять пролиферативным свойствам.

[00867] Целевой белок: в настоящем документе термины «целевые белки» или «желательные белки» включают раскрытые в настоящем документе и их фрагменты, мутанты, варианты и модификации.

[00868] Проксимальный: в настоящем документе термин «проксимальный» обозначает расположенный вблизи центра или точки или целевого участка.

[00869] Псевдоуридин: в настоящем документе псевдоуридин обозначает С-гликозидный изомер нуклеозида уридина. «Аналог псевдоуридина» представляет собой модификацию, вариант, изоформу или производное псевдоуридина. Например, аналоги
 30 псевдоуридина включают, без ограничений, 1-карбоксиметил-псевдоуридин, 1-пропинил-псевдоуридин, 1-тауринометил-псевдоуридин, 1-тауринометил-4-тио-псевдоуридин, 1-метил-псевдоуридин ($m^1\psi$), 1-метил-4-тио-псевдоуридин ($m^1s^4\psi$), 4-тио-1-метил-псевдоуридин, 3-метил-псевдоуридин ($m^3\psi$), 2-тио-1-метил-псевдоуридин, 1-метил-1-дезаза-псевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-дезаза-псевдоуридин, дигидропсевдоуридин, 2-тио-дигидропсевдоуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тио-уридин, 4-метокси-псевдоуридин, 4-метокси-2-тио-псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин, 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксыпропил)псевдоуридин ($аср^3\psi$) и 2'-О-метил-псевдоуридин (ψm).

[00870] Очищенный: в настоящем документе «очищать», «очищенный», «очистка»
 40 означает сделать в существенной мере чистым или очищенным от нежелательных компонентов, загрязняющих материалов, примесей или несовершенства.

[00871] Образец: в настоящем документе термин «образец» или «биологический образец» обозначает подмножество тканей, клеток или составных частей (например, биологических жидкостей, в том числе без ограничений, крови, слизи, лимфы,
 45 синовиальной жидкости, спинномозговой жидкости, слюны, амниотической жидкости, крови пупочной вены, мочи, вагинальной жидкости и семени). Дополнительно образец может включать гомогенат, лизат или экстракт, полученный из цельного организма или подмножества его тканей, клеток или составных частей или их фракции или части,

в том числе, без ограничений, например, плазмы, сыворотки, спинномозговой жидкости, лимфы, внешних секретов кожи, дыхательного, кишечного и мочеполового тракта, слезной жидкости, слюны, молока, клеток крови, опухолей, органов. Дополнительно образец обозначает среду, например, питательный бульон или гель, которая может

5 содержать клеточные компоненты, такие как белки или молекулу нуклеиновой кислоты.

[00872] Сигнальные последовательности: в настоящем документе выражение «сигнальные последовательности» обозначает последовательность, которая может направлять транспорт или локализацию белка.

[00873] Разовая доза: в настоящем документе «разовая доза» представляет собой

10 дозу любого терапевтического средства, вводимую в виде одной дозы/в одно время/одним способом/в одной точке контакта, т.е., в ходе одинарного события введения.

[00874] Сходство: в настоящем документе термин «сходство» обозначает общее подобие между полимерными молекулами, например, между молекулами полинуклеотидов (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между

15 полипептидными молекулами. Вычисление процента сходства полимерных молекул друг с другом может быть осуществлено таким же способом, как и вычисление процента сходства, за исключением того, что при вычислении процента идентичности учитываются консервативные замены, как они понимаются в уровне техники.

[00875] Разделенная доза: в настоящем документе «разделенная доза» обозначает

20 деление разовой дозы или общей суточной дозы на две или более доз.

[00876] Стабильный: в настоящем документе «стабильный» обозначает соединение, достаточно устойчивое для выделения с подходящей степенью чистоты из реакционной смеси, которое предпочтительно может быть преобразовано в эффективный

25 терапевтический агент.

[00877] Стабилизированный: в настоящем документе термин «стабилизировать», «стабилизированный», «стабилизированный участок» подразумевает сделать или стать стабильным.

[00878] Субъект: в настоящем документе термин «субъект» или «пациент (больной)» обозначает любой организм, в который может быть введен состав в соответствии с

30 изобретением, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целей. Типичные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, негуманоидные приматы и человек) и/или растения.

[00879] Значительно (существенно): в настоящем документе термин «в существенной

35 мере (в значительной степени)» обозначает качественные состояния проявления общей или приближенной к общей протяженности или степени целевой характеристики или свойства. Среднему специалисту в области биологии будет понятно, что биологические и химические феномены редко, если вообще достигают полноты и/или происходят до завершения или достигают или избегают абсолютного результата. Таким образом,

40 термин «в значительной степени» используется в настоящем документе, чтобы охватить потенциальный недостаток полноты, присущий многим биологическим и химическим феноменам.

[00880] В существенной мере равный: в настоящем документе, в отношении временных различий между дозами, термин обозначает +/-2%.

[00881] В существенной мере одновременно: в настоящем документе, в отношении

45 к множественным дозам, термин обозначает в пределах 2 с.

[00882] Страдающий: индивидуум, «страдающий» заболеванием, расстройством и/или состоянием, которому поставлен диагноз или который проявляет один или более

симптомов заболевания, расстройства и/или состояния.

[00883] Подверженный (уязвимый): индивидуум, «подверженный (уязвимый)» заболеванию, расстройству и/или состоянию, которому не был поставлен диагноз и/или у которого не проявляются симптомы заболевания, расстройства и/или состояния, но который склонен к развитию заболевания или его симптомов. В некоторых вариантах реализации индивидуум, подверженный заболеванию, расстройству и/или состоянию (например, раку) может быть охарактеризован одним или более из следующего: (1) генетическая мутация, связанная с развитием заболевания, расстройства и/или состояния; (2) генетический полиморфизм, связанный с развитием заболевания, расстройства и/или состояния; (3) повышенная и/или сниженная экспрессия и/или активность белка и/или нуклеиновой кислоты, связанная с заболеванием, расстройством и/или состоянием; (4) привычки и/или образ жизни, связанный с развитием заболевания, расстройства и/или состояния; (5) семейный анамнез заболевания, расстройства и/или состояния; и (6) контакт с и/или заражение микроорганизмами, связанные с развитием заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации у индивидуума, подверженного заболеванию, расстройству и/или состоянию, будет развиваться заболевание, расстройство и/или состояние. В некоторых вариантах реализации у индивидуума, подверженного заболеванию, расстройству и/или состоянию, не будет развиваться заболевание, расстройство и/или состояние.

[00884] Замедленное высвобождение: в настоящем документе термин «замедленное высвобождение» относится к фармацевтическому составу или соединению, профиль высвобождения которого соответствует скорости высвобождения в течение указанного периода времени.

[00885] Синтетический: термин «синтетический» обозначает полученный, приготовленный и/или произведенный человеком. Синтез полинуклеотидов или полипептидов, или других молекул по настоящему изобретению может быть химическим или ферментным.

[00886] Клетки-мишени: в настоящем документе «клетки-мишени» обозначает одну или более любых целевых клеток. Клетки могут быть найдены *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или в ткани или органе организма. Организм может быть животным, предпочтительно млекопитающим, более предпочтительно, человеком и, наиболее предпочтительно, пациентом.

[00887] Терапевтический агент: термин «терапевтический агент» обозначает любой агент, который, при введении субъекту, оказывает терапевтический, диагностический и/или профилактический эффект и/или вызывает желательный биологический и/или фармакологический эффект.

[00888] Терапевтически эффективное количество: в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» обозначает количество агента для доставки (например, нуклеиновой кислоты, лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента, профилактического агента и т.д.), достаточное, при введении субъекту, который страдает или подвержен инфекции, заболеванию, расстройству и/или состоянию, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, предупреждения и/или задержки развития инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния.

[00889] Терапевтически эффективный результат: в настоящем документе термин «терапевтически эффективный результат» обозначает результат, достаточный у субъекта, страдающего или подверженного инфекции, заболеванию, расстройству и/или состоянию, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, предупреждения и/или задержки развития инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния.

[00890] Общая суточная доза: в настоящем документе «общая суточная доза» представляет собой количество, введенное или назначенное на период 24 часа. Оно может быть введено как разовая доза.

5 [00891] Фактор транскрипции: в настоящем документе термин «фактор транскрипции» обозначает ДНК-связывающий белок, который регулирует транскрипцию ДНК в РНК, например, посредством активации или подавления транскрипции. Некоторые факторы транскрипции влияют только на регуляцию транскрипции, тогда как другие действуют совместно с другими белками. Некоторые факторы транскрипции могут активировать и подавлять транскрипцию в определенных условиях. В общем, факторы транскрипции
10 связываются с конкретной последовательностью-мишенью или последовательностью, в высокой степени сходной с конкретной консенсусной последовательностью на регуляторном участке гена-мишени. Факторы транскрипции могут регулировать транскрипцию гена-мишени отдельно или в комплексе с другими молекулами.

[00892] Лечение: в настоящем документе термин «лечение» обозначает частичное
15 или полное облегчение, смягчение, улучшение, ослабление, задержку развития, замедление прогресса, уменьшение тяжести и/или снижение частоты одного или более симптомов или признаков конкретной инфекции, заболевания, расстройства и/или состояния. Например, «лечение» рака может обозначать подавление жизнедеятельности, роста и/или распространения опухоли. Лечение может быть проведено субъекту, у
20 которого отсутствуют признаки заболевания, расстройства и/или состояния, и/или субъекту, у которого присутствуют только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния, с целью уменьшения риска развития патологии, связанной с заболеванием, расстройством и/или состоянием.

[00893] Немодифицированный: в настоящем документе «немодифицированный»
25 обозначает любое вещество, соединение или молекулу до любых изменений. Немодифицированный может, но не всегда, обозначать форму дикого типа или нативную форму биомолекулы. Молекулы могут подвергаться серии модификаций, причем каждая модифицированная молекула может служить «немодифицированной» исходной молекулой для последующей модификации.

30 Эквиваленты и контекст

[00894] Специалистам в данной области будет понятно, или они будут способны определить с помощью не более чем шаблонного экспериментирования, множество эквивалентов конкретным вариантам настоящего изобретения, раскрытым в настоящем документе. Вышеприведенное описание не предназначено ограничивать контекст
35 настоящего изобретения, который определяется в соответствии с приложенной формулой изобретения.

[00895] В формуле изобретения, артикли, такие как «a» «an» и «the» могут означать один или более одного, если противоположное не указано или другим способом не является очевидным из контекста. Пункты формулы или описание, которое включает
40 «или» между одним или более членов группы, рассматриваются удовлетворяющими условию, если один, более одного или все члены группы присутствуют, используются или иным образом имеют отношение к получению продукта или способу, если противоположное не указано или иным образом не очевидно из контекста. Изобретение включает варианты, где точно один член группы присутствует, используется или иным
45 образом относится к получению продукта или способу. Изобретение включает варианты, где более одного или все члены группы присутствуют, используются или иным образом относятся к получению продукта или способу.

[00896] Следует также отметить, что термин «содержащий (включающий)» является

открытым и допускает включение дополнительных элементов или стадий.

[00897] Если приведены интервалы, они включают конечные точки. Кроме того, следует понимать, что, если иное не указано или иным образом не является очевидным из контекста и знаний среднего специалиста в данной области, значения, которые
5 выражены в виде интервалов, могут допускать любое конкретное значение или поддиапазон интервала в пределах указанных интервалов в различных вариантах изобретения, до десятого знака после запятой нижнего предела интервала, если контекст явно не диктует иного.

[00898] Кроме того, следует понимать, что любой конкретный вариант реализации
10 данного изобретения, который находится в пределах уровня техники, может быть явно исключен из одного или более любых пунктов формулы. Поскольку такие варианты реализации подразумеваются как известные среднему специалисту в данной области, они могут быть исключены даже, если исключение не выражено явно в настоящем документе. Любой конкретный вариант реализации составов по изобретению { например,
15 любая нуклеиновая кислота или кодируемый ею белок; любой способ получения; любой способ применения; и т.д.) может быть исключен из одного или более любых пунктов формулы, по любой причине, независимо от его присутствия в уровне техники.

[00899] Все процитированные источники, например, ссылки, публикации, базы данных, значения в базе данных и уровень техники, процитированные в настоящем документе,
20 включены в данную заявку посредством ссылки, даже если при цитировании это явно не указано. В случае конфликтующих утверждений в процитированном источнике и настоящей заявке, превалирует утверждение в настоящей заявке.

[00900] Заголовки разделов и таблицы не предназначены ограничивать настоящее изобретение.

25 ПРИМЕРЫ

[00901] Изобретение дополнительно раскрыто в следующих примерах, которые не ограничивают контекст изобретения, определяемый формулой изобретения.

Пример 1. Выработка модифицированной мРНК

[00902] Модифицированные мРНК (ммРНК) в соответствии с изобретением могут
30 быть получены с применением стандартных лабораторных методов и материалов. Открытая рамка считывания (ОРС) целевого гена может быть фланкирована 5' нетранслируемым участком (НТУ), который может содержать интенсивный сигнал инициации трансляции Козака и/или 3' НТУ альфа-глобина, который может содержать олиго(dT) последовательность для шаблонного добавления поли-А хвоста.
35 Модифицированные мРНК могут быть модифицированы для снижения природного иммунного ответа клетки. Модификации для уменьшения интенсивности клеточного ответа могут включать псевдоуридин (ψ) и 5-метил-цитидин (5 m^eC или m⁵C). (см., Kariko K et al. Immunity 23:165-75 (2005), Kariko K et al. Mol Ther 16:1833-40 (2008), Anderson BR et al. NAR (2010); каждая из которых включена в настоящий документ в полном
40 объеме посредством ссылки).

[00903] Дополнительно, ОРС может содержать различные добавления в направлении 5' или 3' (например, без ограничений, β -глобин, метки, и т.д.), которые можно заказать в службе оптимизации, такой как, без ограничений, ДНК2.0 (Menlo Park, Калифорния)
45 и может содержать множественные сайты клонирования, которые могут распознаваться XbaI. После получения плазмидной ДНК, она может быть извлечена и растворена и трансформирована в химически компетентную E coli.

[00904] Для целей данного изобретения используют NEB DH5-альфа компетентную E. coli. Трансформации осуществляют в соответствии с инструкциями NEB, с

использованием 100 нг плазмиды. Протокол приведен ниже:

1. Размораживают пробирку NEB 5-альфа компетентных клеток *E. coli* на льду в течение 10 минут.

2. Добавляют 1-5 мкл смеси, содержащей 1 пг - 100 нг плазмидной ДНК к клеткам.

5 Аккуратно постукивают по пробирке 4-5 раз для перемешивания клеток и ДНК. Вихревым перемешиванием не обрабатывают.

3. Помещают смесь на лед на 30 минут. Не перемешивают.

4. Подвергают термическому шоку при температуре 42°C точно в течение 30 сек. Не перемешивают.

10 5. Помещают на лед на 5 минут. Не перемешивают.

6. С помощью пипетки добавляют к смеси 950 мкл SOC комнатной температуры.

7. Помещают в среду с температурой 37°C на 60 минут. Энергично встряхивают (250 об/мин) или центрифугируют.

8. Нагревают селекционные планшеты до 37°C.

15 9. Тщательно перемешивают клетки, постукивая по пробирке и переворачивая ее.

[00905] Распределяют по 50-100 мкл каждого разведения на селекционный планшет и инкубируют в течение ночи при 37°C. Альтернативно, инкубируют при температуре 30°C в течение 24-36 часов или при температуре 25°C в течение 48 часов.

[00906] Далее используют единичную колонию для инокуляции 5 мл среды культивирования ЛБ (лизогенный бульон) с использованием подходящего антибиотика, которой позволяют расти (250 об/мин, 37°C) в течение 5 час. Далее полученную культуру используют для инокуляции 200 мл среды для культивирования и позволяют расти в течение ночи при таких же условиях.

[00907] Для выделения плазмиды (до 850 мкг), осуществляют макси-подготовку с использованием набора PURELINK™ HiPure Maxiprep (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя.

[00908] Для генерации кДНК с целью транскрипции *in vitro* (IVT), плазмиду (пример которой проиллюстрирован на Фиг. 2) вначале линеаризируют с использованием рестрикционного фермента, такого как XbaI. Типичное рестрикционное расщепление XbaI будет включать следующее: плазида 1,0 мкг; 10 × буфер 1,0 мкл; XbaI 1,5 мкл; dH₂O до 10 мкл; инкубируют при 37°C, выдерживая при этой температуре в течение 1 часа. Выполняют в лабораторном масштабе (<5 мкг), реакционную смесь очищают с использованием набора PURELINK™ PCR Micro (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. Очистка в большем масштабе может потребовать использования продукта с большей емкостью загрузки, такого как стандартный набор PURELINK™ ПЦР (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). После очистки проводят количественное определение линеаризованного вектора с использованием NanoDrop и анализ для подтверждения линеаризации с использованием электрофореза на агарозном геле.

40 [00909] Раскрытые в настоящем документе способы получения модифицированной мРНК могут применяться для получения молекул всех размеров, в том числе, длинноцепочечных. С применением раскрытых способов были получены модифицированные мРНК с различным размером молекулы, в том числе глкжозидаза, альфа; кислота (ГАК) (3,2 тысячи оснований), цистофиброзный регулятор

45 трансмембранной проводимости (ЦФТР) (4,7 тысяч оснований), Фактор VII (7,3 тысячи оснований), лизосомальная кислая липаза (45,4 кДа), глюкоцереброзидаза (59,7 кДа) и идуронат 2-сульфатаза (76 кДа).

[00910] В качестве неограничивающего примера, G-CSF может представлять собой

25,0 мкл. Условия реакции: температура 95°C в течение 5 минут, и 25 циклов по 20 с при температуре 98°C, затем температура 58°C в течение 15 с, затем температура 72°C в течение 45 с, затем температура 72°C в течение 5 минут, затем температура 4°C до остановки.

5 [00912] Обратный праймер по настоящему изобретению содержит поли-T₁₂₀ для поли-A₁₂₀ в мРНК. Другие обратные праймеры с более длинными или короткими поли (Т) участками могут применяться для регуляции длины поли(А) хвоста в мРНК.

[00913] Реакционную смесь очищают с использованием набора PURELINK™ PCR Micro (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя (до 5 мкг). Реакции большего масштаба потребуют очистки с использованием продукта большей емкости. После очистки проводят количественное определение кДНК с использованием NANODROP™ и анализируют методом электрофореза на агарозном геле для подтверждения того, что размер кДНК соответствует ожидаемому. Далее кДНК секвенируют, после чего вводят в реакцию транскрипции *in vitro*.

15 Пример 3. Транскрипция *in vitro*

[00914] В реакции транскрипции *in vitro* образуется мРНК, содержащая модифицированные нуклеотиды, или модифицированная РНК. Исходную смесь нуклеотидтрифосфатов (НТФ) получают на месте с использованием природных и неприродных НТФ.

20 [00915] Типичная реакция транскрипции *in vitro* включает следующее:

1. шаблон кДНК	1,0 мкг
2. 10 × буфер транскрипции (400 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 190 мМ MgCl ₂ , 50 мМ ДТТ, 10 мМ спермидина)	2,0 мкл
3. пользовательские НТФ (по 25 мМ каждого)	7,2 мкл
25 4. ингибитор РНКазы	20 Ед
5. T7 РНК полимеразы	3000 Ед
6. dH ₂ O	до 20,0 мкл и

7. инкубацию при температуре 37°C в течение 3-5 часов.

30 [00916] Неочищенную смесь для транскрипции *in vitro* (TVT) можно хранить при температуре 4°C в течение ночи для очистки на следующий день. Затем 1 Ед ДНКазы, не содержащей РНКазы, используют для расщепления оригинального шаблона. После 15 минут инкубации при 37°C, мРНК очищают с использованием набора MEGACLEAR™ (Ambion, Остин, Техас) в соответствии с инструкциями производителя. С помощью данного набора можно очистить до 500 мкг РНК. После очистки проводят количественное определение РНК с использованием NanoDrop и анализируют методом электрофореза на агарозном геле для подтверждения надлежащего размера РНК и отсутствия разложения РНК.

35 Пример 4. Ферментный кэппинг мРНК

40 [00917] Кэппинг мРНК осуществляют по следующей методике, где смесь содержит: IVT РНК 60-180 мкг и dH₂O до 72 мкл. Смесь инкубируют при температуре 65°C в течение 5 минут для денатурации РНК, после чего немедленно переносят на лед.

[00918] Далее протокол включает смешивание 10 × буфера кэппинга (0,5 М Трис-НСl (рН 8,0), 60 мМ KCl, 12,5 мМ MgCl₂) (10,0 мкл); 20 мМ гамма-глутамилтрансферазы (5,0 мкл); 20 мМ S-аденозилметионина (2,5 мкл); ингибитор РНКазы (100 Ед); 2'-О-метилтрансферазы (400 Ед); кэппинг-фермента коровьей оспы (гуанилилтрансфераза) (40 Ед); dH₂O (до 28 мкл); и инкубацию при температуре 37°C в течение периода от 30 минут для 60 мкг РНК до 2 час для 180 мкг РНК.

[00919] Затем мРНК очищают с использованием набора MEGACLEAR™ (Ambion, Остин, Техас) в соответствии с инструкциями производителя. После очистки проводят количественное определение РНК с использованием NANODROP™ (ThermoFisher, Уолтхэм, Массачусетс) и анализируют методом электрофореза на агарозном геле для подтверждения надлежащего размера РНК и отсутствия разложения РНК. Кроме того, полученная РНК может быть секвенирована посредством ГЩР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЩР) для получения кДНК с целью секвенирования.

Пример 5. Реакция присоединения поли-А к 3'-ОН концам обеих цепей фрагмента ДНК

[00920] Без поли-Т в кДНК, реакция присоединения поли-А к 3'-ОН концам обеих цепей фрагмента ДНК должна проводиться перед очисткой конечного продукта. Ее осуществляют посредством смешивания кэпированной IVT РНК (100 мкл); ингибитора РНКазы (20 Ед); 10 × буфера для реакции присоединения поли-А к 3'ОН концам обеих цепей фрагмента ДНК (0,5 М Трис-НСl (рН 8,0), 2,5 М NaCl, 100 мМ MgCl₂) (12,0 мкл); 20 мМ АТФ (6,0 мкл); поли-А полимеразы (20 Ед); dH₂O до 123,5 мкл, с инкубацией при температуре 37°C в течение 30 мин. Если хвост поли-А уже присутствует в транскрипте, то реакцию присоединения поли-А к 3'-ОН концам обеих цепей фрагмента ДНК можно опустить, и непосредственно проводить очистку с помощью набора MEGACLEAR™ (Ambion, Остин, Техас) (до 500 мкг). Поли-А полимеразы предпочтительно является рекомбинантным ферментом, экспрессированным в дрожжах.

[00921] Для исследований, проведенных и описанных в настоящем документе, хвост поли-А кодируется в IVT шаблоне, и его длина составляет 160 нуклеотидов. Однако, следует понимать, что процессивность или целостность реакции присоединения поли-А к 3'-ОН концам обеих цепей фрагмента ДНК не всегда может быть результатом длины точно 160 нуклеотидов. Поэтому, хвосты поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов, например, приблизительно 150-165, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 или 165, находятся в пределах изобретения.

Пример 6. Природные 5' кэпы и аналоги 5' кэпа

[00922] 5'-Кэппинг модифицированной РНК может выполняться одновременно с реакцией транскрипции *in vitro*, с использованием следующих химических аналогов кэпа РНК для генерации структуры кэпа 5'-гуанозина в соответствии с протоколами производителя: 3'-О-Ме-m7G(5')ppp(5') G [кэп ARCA]; G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')A; m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс). 5'-Кэппинг модифицированной РНК может быть завершен посттранскрипционально с использованием кэппинг-фермента вируса коровьей оспы с генерацией структуры «Кэп 0»: m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс). Структура Кэп 1 может быть сгенерирована с использованием кэппинг-фермента вируса коровьей оспы и 2'-О метил-трансферазы для генерации: m7G(5')ppp(5')G-2'-О-Метил. Структура Кэп 2 может быть получена из структуры Кэп 1, с последующим 2'-О-метилением третьего от 5'-конца нуклеотида с использованием 2'-О метил-трансферазы. Структура Кэп 3 может быть получена из структуры Кэп 2, с последующим 2'-О-метилением третьего от 5'-конца нуклеотида с использованием 2'-О метил-трансферазы. Ферменты предпочтительно получены из рекомбинантного источника.

[00923] При трансфекции клеток млекопитающих, стабильность модифицированной мРНК составляет 12-18 часов или более 18 часов, например, 24, 36, 48, 60, 72 или более 72 часов.

Пример 7. Кэппинг

А. Анализ экспрессии белка

[00924] Синтетической мРНК, кодирующей G-CSF человека (кДНК представлена в SEQ ID NO:5; последовательность мРНК, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин, представлена в SEQ ID NO:6, с хвостом поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов, не показанным в последовательности), которая содержит аналог кэпа ARCA (3' O-Me-m7G(5')ppp(5')G) или структуру Кэп 1, могут быть трансфицированы первичные кератиноциты человека в равных концентрациях. Через 6, 12, 24 и 36 часов после трансфекции количество G-CSF, секретированного в питательную среду, можно определить методом ТИФА. Синтетическая мРНК, которая приводит к более высоким уровням секреции G-CSF в среду, будет соответствовать синтетической мРНК со структурой Кэп, обеспечивающей более высокий уровень трансляционной компетенции.

Б. Анализ чистоты продуктов синтеза

[00925] Чистоту неочищенных продуктов синтеза синтетической мРНК, кодирующей G-CSF человека (кДНК представлена в SEQ ID NO: 5; последовательность мРНК, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин, представлена в SEQ ID NO: 6, с хвостом поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов, не показанным в последовательности), которая содержит аналог кэпа ARCA или структуру Кэп 1, можно сравнить с применением электрофореза на денатурирующем геле агарозы-мочевины или ВЭЖХ. Синтетическая мРНК, дающая одинарную, консолидированную полосу по результатам электрофореза, соответствует продукту с более высокой степенью чистоты, по сравнению с синтетической мРНК, дающей множественные полосы или штрихованные полосы. Синтетическая мРНК, дающая одинарный пик ВЭЖХ также соответствует продукту с более высокой степенью чистоты. Реакция кэппинга с более высокой эффективностью будет приводить к более чистой популяции мРНК.

В. Анализ цитокинов

[00926] Синтетической мРНК, кодирующей G-CSF человека (кДНК представлена в SEQ ID NO: 5; последовательность мРНК, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин, представлена в SEQ ID NO: 6, с хвостом поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов, не показанным в последовательности), которая содержит аналог кэпа ARC A или структуру Кэп 1, могут быть трансфицированы первичные кератиноциты человека в нескольких концентрациях. Через 6, 12, 24 и 36 часов после трансфекции количество провоспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа и IFN-бета, секретированных в среды культивирования, можно определить методом ТИФА. Синтетическая мРНК, которая приводит к более высоким уровням секреции провоспалительных цитокинов в среду, будет соответствовать синтетической мРНК, содержащей активирующую иммунитет структуру Кэп.

Г. Эффективность реакции кэппинга

[00927] Синтетическая мРНК, кодирующая G-CSF человека (кДНК представлена в SEQ ID NO: 5; последовательность мРНК, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин, представлена в SEQ ID NO: 6, с хвостом поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов, не показанным в последовательности), которая содержит аналог кэпа ARCA или структуру Кэп 1, может быть проанализирована на предмет эффективности реакции кэппинга методом ЖХ-МС после обработки кэпированной мРНК нуклеазой. Обработка кэпированной мРНК нуклеазой будет давать смесь свободных нуклеотидов и кэп-структуры кэпированного 5'-5-трифосфата, обнаруживаемой методом ЖХ-МС.

Количество кэппированного продукта на спектрах ЖХ-МС может быть выражено как процент от общей мРНК из реакционной смеси, и будет соответствовать эффективности реакции кэппинга. Кэп-структура с более высокой эффективностью реакции кэппинга будет давать более высокое количество кэппированного продукта по данным ЖХ-МС.

5 Пример 8. Электрофорез модифицированной РНК или продуктов ОТ-ПЦР на агарозном геле

[00928] Индивидуальные модифицированные РНК (200-400 нг в объеме 20 мкл) или продукты ОТ-ПЦР (200-400 нг) загружают в лунку на неденатурирующий 1,2% агарозный E-Gel (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) и анализируют в течение 12-15 минут в соответствии с протоколом производителя.

10 Пример 9. Введение модифицированной мРНК в составы с использованием липидоидов

[00929] Модифицированные мРНК (ммРНК) вводят в составы для экспериментов *in vitro* путем смешивания ммРНК с липидоидом в установленном соотношении перед добавлением к клеткам. Состав для применения *in vivo* может потребовать добавления дополнительного количества ингредиентов для облегчения перемещения в кровотоке. Для проверки способности указанных липидоидов образовывать частицы, пригодные для работы *in vivo*, в начальной точке использовали стандартный метод получения составов мРНК-липидоид. Начальные составы ммРНК-липидоид могут состоять из 20 частиц, содержащих 42% липидоида, 48% холестерина и 10% ПЭГ, с возможной дополнительной оптимизацией соотношений. После образования частицы, добавляют ммРНК и позволяют комплексу интегрироваться. Эффективность инкапсуляции определяют с использованием стандартных анализов исключения красителя.

Материалы и методы для Примеров 10-14

25 А. Синтез липидов

[00930] Шесть липидов, ДЛин-ДМА, ДЛин-К-ДМА, ДЛин-КС2-ДМА, 98N12-5, С12-200 и ДЛин-МС3-ДМА, синтезируют способами, в общих чертах изложенными в уровне техники, с целью введения в составы с модифицированной РНК. ДЛин-ДМА и прекурсоры синтезируют, как раскрыто в Heyes et. al, J. Control Release, 2005, 107, 276-30 287. ДЛин-К-ДМА и ДЛин-КС2-ДМА и прекурсоры синтезируют, как раскрыто в Semple et. al, Nature Biotechnology, 2010, 28, 172-176. 98N12-5 и прекурсоры синтезируют, как раскрыто в Akinc et. al, Nature Biotechnology, 2008, 26, 561-569.

[00931] С12-200 и прекурсоры синтезируют в соответствии со способом, коротко изложенным Love et. al, PNAS, 2010, 107, 1864-1869. 2-Эпоксидодекан (5,10 г, 27,7 ммоль, 8,2 экв.) добавляют во флакон, содержащий Амин 200 (0,723 г, 3,36 ммоль, 1 экв.) и оборудованный мешалкой. Флакон закупоривают и нагревают до 80°C. Реакционную смесь перемешивают в течение 4 дней при 80°C. Далее смесь очищают хроматографией на силикагеле с использованием градиента от чистого дихлорметана (ДХМ) до смеси ДХМ/MeOH (98:2). Целевое соединение дополнительно очищают ОФ-ВЭЖХ с 40 получением желательного соединения.

[00932] ДЛин-МС3-ДМА и прекурсоры синтезируют в соответствии с методиками, раскрытыми в WO 2010054401 (включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). Смесь дилинолеилметанола (1,5 г, 2,8 ммоль, 1 экв.), N,N-диметиламиномасляной кислоты (1,5 г, 2,8 ммоль, 1 экв.), ДИПЭА (0,73 мл, 4,2 ммоль, 1,5 экв.) и ТБТУ (1,35 г, 4,2 ммоль, 1,5 экв.) в 10 мл ДМФА перемешивают в течение 10 часов при комнатной температуре. Далее реакционную смесь разбавляют эфиром и промывают водой. Органическую фракцию сушат над безводным натрия сульфатом, фильтруют и упаривают при сниженном давлении. Неочищенный продукт очищают

хроматографией на силикагеле с использованием градиента от ДХМ до смеси ДХМ/MeOH (98:2). Затем целевое соединение подвергают дополнительной очистке методом ОФ-ВЭЖХ, которую проводят с использованием колонки YMC-Pack C4, с получением целевого соединения.

5 Б. Получение наночастиц модифицированной РНК

[00933] Растворы синтезированного липида, 1,2-дистеароил-3-фосфатидилхолина (ДСФХ) (Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама), холестерина (Sigma-Aldrich, Тауфкирхен, Германия) и α -[3'-(1,2-димиристоил-3-пропанокси)-карбоксамид-пропил]- ω -метокси-полиоксиэтилена (ПЭГ-к-ДМПО) (NOF, Бувельван, Бельгия) получают с
10 концентрацией 50 мМ в этаноле и хранят при -20°C . Липиды объединяют с получением молярного соотношения 50:10:38,5:1,5 (липид:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-к-ДМПО) и разбавляют этанолом до конечной концентрации липида 25 мМ. Растворы модифицированной мРНК в концентрации 1-2 мг/мл в воде разбавляют 50 мМ буферным раствором натрия цитрата при pH 3 с получением запасного раствора
15 модифицированной мРНК. Препараты липида и модифицированной мРНК получают, объединяя раствор синтезированного липида с раствором модифицированной мРНК с массовым соотношением общих липидов к модифицированной мРНК 10:1, 15:1, 20:1 и 30:1. Этанольный раствор липидов быстро вводят инъекцией в водный раствор модифицированной мРНК, с получением суспензии, содержащей 33% этанола. Растворы
20 вводят инъекционным способом, вручную (ВЧ) или с помощью шприцевого насоса (ШН) (Harvard Pump 33 Dual Syringe Pump Harvard Apparatus Holliston, Массачусетс).

[00934] Для удаления этанола и запуска обмена буфера, составы обрабатывают диализом дважды против буферизованного фосфатом солевого раствора (ФБР), pH 7,4, в объемах, в 200 раз превышающих объем исходного продукта, с использованием
25 кассет Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс) с порогом молекулярной массы (ПММ) 10 кДа. Первый диализ осуществляют при комнатной температуре в течение 3 часов, после чего составы обрабатывают диализом на протяжении ночи при 4°C . Полученную суспензию наночастиц фильтруют сквозь стерилизующий фильтр с размером пор 0,2 мкм (Sarstedt, Нюмбрехт, Германия) в
30 стеклянные флаконы и закупоривают колпачком под обкатку.

В. Характеристика составов

[00935] Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания) используют для определения размера частиц, индекса полидисперсности (ИПД) и зета потенциала наночастиц модифицированной мРНК в
35 $1 \times$ ФБР для определения размера частиц и 15 мМ ФБР для определения зета потенциала.

[00936] Спектроскопию в УФ-видимой области применяют для определения концентрации препарата наночастиц модифицированной мРНК. 100 мкл разведенного препарата в $1 \times$ ФБР добавляют к 900 мкл смеси метанола и хлороформа 4:1 (об/об). После смешивания, регистрируют спектр поглощения раствора в области от 230 нм до
40 330 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Бреа, Калифорния). Концентрацию модифицированной РНК в препарате наночастиц вычисляют на основе коэффициента экстинкции модифицированной РНК, используемой в составе, и разницы между оптической плотностью на длине волны 260 нм и фоновым значением на длине волны 330 нм.

45 [00937] Анализ РНК QUANT-IT™ R1BOGREEN® (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) применяют для оценки инкапсуляции модифицированной РНК в наночастицы. Образцы разбавляют до концентрации приблизительно 5 мкг/мл в буфере ТЭ (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5). По 50 мкл разбавленных образцов переносят

на 96-луночный планшет из полистирола, затем добавляют 50 мкл буфера ТЭ или 50 мкл 2% раствора Тритона X-100. Планшет инкубируют при температуре 37°C в течение 15 минут. Реагент R1BOGREEN® разбавляют 1:100 в буфере ТЭ, по 100 мкл полученного раствора добавляют в каждую лунку. Интенсивность флуоресценции измеряют с использованием устройства для считывания флуоресценции для планшетов (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Уолтхэм, Массачусетс) на длине волны возбуждения ~480 нм и длине волны эмиссии ~520 нм. Значения флуоресценции материнского холостого раствора вычитают из значений каждого из образцов, и процент свободной модифицированной РНК определяют путем деления интенсивности флуоресценции интактного образца (без добавления Тритона X-100) на значение флуоресценции нарушенного (добавлением Тритона X-100) образца.

Г. Инкубация *in vitro*

[00938] Эпителиальные клетки почки эмбриона человека (HEK293) и эпителиальные клетки гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) (LGC standards GmbH, Везель, Германия) высевают на 96-луночные планшеты (Greiner Bio-one GmbH, Фриккенхаузен, Германия) и планшеты для клеток HEK293 предварительно покрывают коллагеном типа 1. HEK293 высевают с плотностью 30000, и HepG2 высевают с плотностью 35000 клеток на лунку в 100 мкл питательной среды для клеток. Для HEK293 питательной средой является модифицированная Дюльбекко среда Игла (МДСИ), 10% сыворотки телячьего эмбриона (СТЭ), с добавлением 2 mM L-глутамин, 1 mM натрия пирувата и 1 × незаменимых аминокислот (Biochrom AG, Берлин, Германия) и 1,2 мг/мл натрия бикарбоната (Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия), и для HepG2 питательной средой является минимальная эссенциальная среда (МЭС) (Gibco Life Technologies, Дармштадт, Германия), 10% СТЭ, с добавлением 2 mM L-глутамин, 1 mM натрия пирувата и 1 × незаменимых аминокислот (Biochrom AG, Берлин, Германия. Препараты, содержащие мРНК mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов на показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1); добавляют в 4-х экземплярах непосредственно после высевания клеток и инкубируют. кДНК mCherry, содержащая промотор Т7, 5' нетранслируемый участок (НТУ) и 3' НТУ, которую используют для транскрипции *in vitro* (IVT), представлена SEQ ID NO: 8. мРНК mCherry модифицирована посредством замены каждого цитозина на 5 meC и каждого уридина на псевдоуридин.

[00939] Клетки собирают посредством переноса супернатантов питательной среды на 96-луночный планшет Pro-Bind с U-образным дном (Beckton Dickinson GmbH, Гейдельберг, Германия). Клетки трипсинизируют с помощью ½ объема трипсина/ЭДТА (Biochrom AG, Берлин, Германия), объединяют в пул с соответствующими супернатантами и фиксируют добавлением 1 объема ФБР/2% СТЭ (оба производства Biochrom AG, Берлин, Германия) / 0,5% формальдегида (Merck, Дармштадт, Германия). Далее образцы помещают для измерения на проточном цитометре с длиной волны возбуждения лазера 532 нм и фильтром 610/20 для ПЭ-техасского красного в цитометре LSR II (Beckton Dickinson GmbH, Гейдельберг, Германия). Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) для всех событий и стандартное отклонение для 4-х независимых лунок представлено для проанализированных образцов.

Пример 10. Очистка препаратов наночастиц

[00940] Препараты наночастиц, содержащих ДЛин-КС2-ДМА и 98N12-5, проверяли в HEK293 и HepG2 для определения зависимости средней интенсивности флуоресценции (СИФ) от соотношения липида к модифицированной РНК и/или очистки. Получают 3 препарата ДЛин-КС2-ДМА и 2 препарата 98N12-5 с помощью шприцевого наноса, в

соответствии со спецификациями, раскрытыми в Табл. 5. Образцы очищают SEPHADEX™ G-25 категории «для ДНК» (GE Healthcare, Швеция). Каждый препарат проверяют до и после очистки (аР) в концентрации 250 нг модифицированной РНК на лунку в 24-луночном планшете. Процент клеток, положительных на маркер канала FL4 (% FL4-положительных), при анализе с помощью проточного цитометра, для каждого препарата и фонового образца, и СИФ маркера для канала FL4 для каждого препарата и фонового образца приведены в Табл. 6. Значения СИФ для очищенных препаратов были несколько выше, чем для препаратов, проанализированных до очистки.

Таблица 5.

Препараты			
Препарат №	Липид	Липид/РНК (масс)	Средний размер (нм)
NPA-001-1	ДЛин-КС2-ДМА	10	155 нм
			ИПД: 0,08
NPA-001-1 аР	ДЛин-КС2-ДМА	10	141 нм
			ИПД: 0,14

NPA-002-1	ДЛин-КС2-ДМА	15	140 нм
			ИПД: 0,11
NPA-002-1 аР	ДЛин-КС2-ДМА	15	125 нм
			ИПД: 0,12
NPA-003-1	ДЛин-КС2-ДМА	20	114 нм
			ИПД: 0,08
NPA-003-1 аР	ДЛин-КС2-ДМА	20	104 нм
			ИПД: 0,06
NPA-005-1	98N12-5	15	127 нм
			ИПД: 0,12
NPA-005-1 аР	98N12-5	15	134 нм
			ИПД: 0,17
NPA-006-1	98N12	20	126 нм
			ИПД: 0,08
NPA-006-1 аР	98N12	20	118 нм
			ИПД: 0,13

Таблица 6.

НЕК293 и HepG2, 24-луночные, 250 нг модифицированной РНК/лунку				
Препарат	% FL4-положительных		FL4 СИФ	
	НЕК293	HepG2	НЕК293	HepG2
Необработанный	0,33	0,40	0,25	0,30
NPA-001-1	62,42	5,68	1,49	0,41
NPA-001-аР	87,32	9,02	3,23	0,53
NPA-002-1	91,28	9,90	4,43	0,59
NPA-002-аР	92,68	14,02	5,07	0,90
NPA-003-1	87,70	11,76	6,83	0,88
NPA-003-аР	88,88	15,46	8,73	1,06
NPA-005-1	50,60	4,75	1,83	0,46
NPA-005-аР	38,64	5,16	1,32	0,46
NPA-006-1	54,19	13,16	1,30	0,60
NPA-006-аР	49,97	13,74	1,27	0,61

Пример 11. Кривая концентрация-реакция

[00941] Препараты наночастиц 98N12-5 (NPA-005) и ДЛин-КС2-ДМА (NPA-003) тестируют при различных концентрациях для определения СИФ FL4 или mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) в интервале доз.

Исследованные препараты кратко охарактеризованы в Табл. 7. Для определения оптимальной концентрации препаратов наночастиц 98N12-5, различные концентрации модифицированной РНК в составе (100 нг, 10 нг, 1,0 нг, 0,1 нг и 0,01 нг на лунку) тестируют на 24-луночном планшете НЕК293, и результаты FL4 СИФ для каждой дозы приведены в Табл. 8. Подобным образом, для определения оптимальной концентрации препаратов наночастиц ДЛин-КС2-ДМА, различные концентрации модифицированной РНК в составе (250 нг, 100 нг, 10 нг, 1,0 нг, 0,1 нг и 0,01 нг на лунку) тестируют на 24-луночном планшете НЕК293, и результаты FL4 СИФ для каждой дозы приведены в Табл. 9. Препараты наночастиц ДЛин-КС2-ДМА также тестируют в различных концентрациях модифицированной РНК в составе (250 нг, 100 нг и 30 нг на лунку) на 24-луночном планшете НЕК293, и результаты FL4 СИФ для каждой дозы приведены в Табл. 10. Обнаружено, что значения для дозы 1 нг/лунку 98N12-5 и дозы 10 нг/лунку ДЛин-КС2-ДМА демонстрируют сходство с фоновым значением FL4 СИФ.

[00942] Для определения степени приближенности концентраций к фону, мы использовали проточный цитометр с оптимизированными наборами фильтров для выявления экспрессии mCherry, что позволило получить результаты с повышенной чувствительностью по отношению к фоновым уровням. Дозы 25 нг/лунку, 0,25 нг/лунку, 0,025 нг/лунку и 0,0025 нг/лунку анализируют на предмет 98N12-5 (NPA-005) и ДЛин-КС2-ДМА (NPA-003) для определения СИФ mCherry. Как проиллюстрировано в Табл. 11, концентрации 0,025 нг/лунку и менее демонстрируют сходство с фоновым уровнем СИФ mCherry, который составляет приблизительно 386,125.

Таблица 7.		
Препараты		
Препарат №	NPA-003	NPA-005
Липид	ДЛин-КС2-ДМА	98N12-5
Липид/РНК (масс)	20	15
Средний размер	114 нм	106 нм
	ИПД: 0,08	ИПД: 0,12
Таблица 8.		
НЕК293, NPA-005, 24-луночный, n=4		
Препарат	FL4 СИФ	
Необработанный контроль	0,246	
NPA-005 100 нг	2,2175	
NPA-005 10 нг	0,651	
NPA-005 1,0 нг	0,28425	
NPA-005 0,1 нг	0,27675	
NPA-005 0,01 нг	0,2865	
Таблица 9.		
НЕК293, NPA-003, 24-луночный, n=4		
Препарат	FL4 СИФ	
Необработанный контроль	0,3225	
NPA-003 250 нг	2,9575	
NPA-003 100 нг	1,255	
NPA-003 10 нг	0,40025	
NPA-003 1 нг	0,33025	
NPA-003 0,1 нг	0,34625	
NPA-003 0,01 нг	0,3475	
Таблица 10.		
НЕК293, NPA-003, 24-луночный, n=4		
Препарат	FL4 СИФ	
Необработанный контроль	0,27425	

	NPA-003 250 нг	5,6075
	NPA-003 100 нг	3,7825
	NPA-003 30 нг	1,5525
Таблица 11.		
Концентрация и СИФ		
5	Препарат	СИФ mCherry
		NPA-003
		NPA-005
	25 нг/лунку	11963,25
	0,25 нг/лунку	1349,75
	0,025 нг/лунку	459,50
10	0,0025 нг/лунку	310,75
		471,75

Пример 12. Препараты, полученные инъекционным способом вручную и с помощью шприцевого насоса

[00943] Два препарата ДЛин-КС2-ДМА и 98N12-5 получают путем инъекционного введения вручную (ВЧ) и с помощью шприцевого насоса (ШН) и анализируют с фоновым образцом для сравнения СИФ mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозин и псевдоуридин) различных препаратов. Табл. 12 иллюстрирует, что полученные с помощью шприцевого насоса препараты демонстрируют более высокий СИФ, по сравнению с препаратами, полученными посредством инъекционного введения вручную, с таким же липидом и соотношением липид/РНК.

Таблица 12.						
Препараты и СИФ						
25	Препарат №	Липид	Липид/РНК (масс)	Средний размер (нм)	Способ получения	СИФ
	Необработанный контроль	Н/о	Н/о	Н/о	Н/о	674,67
	NPA-002	ДЛин-КС2-ДМА	15	140 нм ИПД: 0,11	ВЧ	10318,25
30	NPA-002-2	ДЛин-КС2-ДМА	15	105 нм ИПД: 0,04	ШН	37054,75
	NPA-003	ДЛин-КС2-ДМА	20	114 нм ИПД: 0,08	ВЧ	22037,5
	NPA-003-2	ДЛин-КС2-ДМА	20	95 нм ИПД: 0,02	ШН	37868,75
35	NPA-005	98N12-5	15	127 нм ИПД: 0,12	ВЧ	11504,75
	NPA-005-2	98N12-5	15	106 нм ИПД: 0,07	ШН	9343,75
	NPA-006	98N12-5	20	126 нм ИПД: 0,08	ВЧ	11182,25
40	NPA-006-2	98N12-5	20	93 нм ИПД: 0,08	ШН	5167

Пример 13. Препараты ЛНЧ

[00944] Препараты ДЛин-ДМА, ДЛин-К-ДМА, ДЛин-КС2-ДМА, 98N12-5, С12-200 и ДЛин-МС3-ДМА инкубируют в концентрации 60 нг/лунку или 62,5 нг/лунку на планшете с клетками НЕК293 и 62,5 нг/лунку на планшете с клетками НерG2 в течение 24 часов для определения СИФ mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозин и псевдоуридин) для каждого препарата. Исследованные препараты кратко

охарактеризованы в Табл. 13 ниже. Как проиллюстрировано в Табл. 14 для концентрации 60 нг/лунку и в Табл. 15, 16, 17 и 18 для концентрации 62,5 нг/лунку, препарат NPA-003 и NPA-018 демонстрирует самое высокое значение СИФ mCherry, и препараты NPA-008, NPA-010 и NPA-013 демонстрируют наибольшее сходство со значением фонового образца mCherry СИФ.

Таблица 13.

Препараты				
Препарат №	Липид	Липид/РНК (масс)	Средний размер (нм)	
10	NPA-001	ДЛин-КС2-ДМА	10	155 нм
				ИПД: 0,08
	NPA-002	ДЛин-КС2-ДМА	15	140 нм
				ИПД: 0,11
	NPA-002-2	ДЛин-КС2-ДМА	15	105 нм
				ИПД: 0,04
15	NPA-003	ДЛин-КС2-ДМА	20	114 нм
				ИПД: 0,08
	NPA-003-2	ДЛин-КС2-ДМА	20	95 нм
				ИПД: 0,02
	NPA-005	98N12-5	15	127 нм
				ИПД: 0,12

20	NPA-006	98N12-5	20	126 нм
				ИПД: 0,08
	NPA-007	ДЛин-ДМА	15	148 нм
				ИПД: 0,09
25	NPA-008	ДЛин-К-ДМА	15	121 нм
				ИПД: 0,08
	NPA-009	С12-200	15	138 нм
				ИПД: 0,15
	NPA-010	ДЛин-МС3-ДМА	15	126 нм
				ИПД: 0,09
30	NPA-012	ДЛин-ДМА	20	86 нм
				ИПД: 0,08
	NPA-013	ДЛин-К-ДМА	20	104 нм
				ИПД: 0,03
	NPA-014	С12-200	20	101 нм
				ИПД: 0,06
35	NPA-015	ДЛин-МС3-ДМА	20	109 нм
				ИПД: 0,07

Таблица 14.

НЕК293,96-луночный, 60 нг модифицированной РНК/лунку		
Препарат	СИФ mCherry	
Необработанный	871,81	
40	NPA-001	6407,25
	NPA-002	14995
	NPA-003	29499,5
	NPA-005	3762
	NPA-006	2676
	NPA-007	9905,5
	NPA-008	1648,75
45	NPA-009	2348,25
	NPA-010	4426,75
	NPA-012	11466
	NPA-013	2098,25
	NPA-014	3194,25

	NPA-015	14524
	Таблица 15.	
	НЕК293, 62,5 нг/лунку	
	Препарат	СИФ mCherry
5	Необработанный	871,81
	NPA-001	6407,25
	NPA-002	14995
	NPA-003	29499,5
	NPA-005	3762
	NPA-006	2676
10	NPA-007	9905,5
	NPA-008	1648,75
	NPA-009	2348,25
	NPA-010	4426,75
	NPA-012	11466
	NPA-013	2098,25
15	NPA-014	3194,25
	NPA-015	14524
	Таблица 16.	
	НЕК293, 62,5 нг/лунку	
	Препарат	СИФ mCherry
20	Необработанный	295
	NPA-007	3504
	NPA-012	8286
	NPA-017	6128
	NPA-003-2	17528
	NPA-018	34142
25	NPA-010	1095
	NPA-015	5859
	NPA-019	3229
	Таблица 17.	
	НерG2, 62,5 нг/лунку	
	Препарат	СИФ mCherry
30	Необработанный	649,94
	NPA-001	6006,25
	NPA-002	8705
	NPA-002-2	15860,25
	NPA-003	15059,25
	NPA-003-2	28881
35	NPA-005	1676
	NPA-006	1473
	NPA-007	15678
	NPA-008	2976,25
	NPA-009	961,75
	NPA-010	3301,75
40	NPA-012	18333,25
	NPA-013	5853
	NPA-014	2257
	NPA-015	16225,75
	Таблица 18.	
	НерG2, 62,5 нг/лунку	
	Препарат	СИФ mCherry
45	Необработанный контроль	656
	NPA-007	16798
	NPA-012	21993
	NPA-017	20377

NPA-003-2	35651
NPA-018	40154
NPA-010	2496
NPA-015	19741
NPA-019	16373

5 Пример 14. Исследования препаратов *in vivo*

[00945] Грызунам (n=5) вводят внутривенно, подкожно или внутримышечно
однократные дозы препарата, содержащего по меньшей мере одну модифицированную
мРНК и липид. Модифицированную мРНК для введения грызунам выбирают из G-CSF
10 (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной
приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1),
эритропоэтина (ЭПО) (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост
поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5'
кэп, Кэп 1), Фактор IX (мРНК представлена в SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной
15 приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) или
mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной
приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1). кДНК
эритропоэтина, содержащая промотор T7, 5' нетранслируемый участок (НТУ) и 3' НТУ,
используемая для транскрипции *in vitro* (IVT), представлена в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID
20 NO: 12.

[00946] Каждый препарат также содержит липид, выбранный как один из ДЛин-
ДМА, ДЛин-К-ДМА, ДЛин-КС2-ДМА, 98N12-5, С12-200, ДЛин-МС3-ДМА, бЭЛНЧ,
ATUPLEX®, DACC и DBTC. Грызунам инъекционно вводят 100 нг, 10 нг или 1 нг
модифицированной мРНК в препарате, и отбирают образцы через указанные интервалы
25 времени.

[00947] Для сыворотки грызунов, которым вводили препараты, содержащие
модифицированную мРНК G-CSF человека, проводят измерения специфичным для G-
CSF методом ТИФА, и сыворотку мышей, которым вводили модифицированную РНК
фактора IX человека, анализируют специфичным для фактора IX методом ТИФА или
30 проводят хромогенную пробу. Анализ печени и селезенки мышей, которым вводили
модифицированную мРНК mCherry, проводят иммуногистохимическим методом (ИГХ)
или флуоресцентно-активируемой клеточной сортировкой (ФАКС). В качестве контроля,
собирают сыворотку и ткань в группе мышей, которым не вводили инъекционно ни
одного препарата, и анализируют методом ТИФА, ФАКС и/или ИГХ.

35 А. Протекание во времени

[00948] Грызунам вводят препараты, содержащие по меньшей мере одну
модифицированную мРНК, с целью исследования протекания во времени экспрессии
белка для введенного препарата. У грызунов отбирают образцы крови через указанные
интервалы времени до и после введения препаратов модифицированной мРНК для
40 определения экспрессии белка и полной формулы крови. Кроме того, отбирают образцы
из места подкожного и внутримышечного введения грызунам препаратов
модифицированной мРНК для определения экспрессии белка в ткани.

Б. Доза-реакция

[00949] Грызунам вводят препараты, содержащие по меньшей мере одну
45 модифицированную мРНК, с целью определения зависимости доза-реакция для каждого
препарата. У грызунов отбирают образцы крови через указанные интервалы времени
до и после введения препаратов модифицированной мРНК для определения экспрессии
белка и полной формулы крови. Дополнительно, грызунов обезглавливают с целью
последующего анализа воздействия препарата модифицированной мРНК на внутреннюю

ткань. Кроме того, отбирают образцы из места подкожного и внутримышечного введения грызунам препаратов модифицированной мРНК для определения экспрессии белка в ткани.

В. Токсичность

5 [00950] Грызунам вводят препараты, содержащие по меньшей мере одну модифицированную мРНК, с целью исследования токсичности каждого препарата. У грызунов отбирают образцы крови через указанные интервалы времени до и после введения препаратов модифицированной мРНК для определения экспрессии белка и полной формулы крови. Дополнительно, грызунов обезглавливают с целью
10 последующего анализа воздействия препарата модифицированной мРНК на внутреннюю ткань. Кроме того, отбирают образцы из места подкожного и внутримышечного введения грызунам препаратов модифицированной мРНК для определения экспрессии белка в ткани.

Пример 15. Препараты микросфер ПМГК

15 [00951] Оптимизация параметров, применяемая для состава микросфер ПМГК, может обеспечить регулируемую скорость высвобождения и высокую эффективность инкапсуляции, при сохранении целостности модифицированной РНК, инкапсулированной в микросферы. Такие параметры, как, без ограничений, размер частиц, скорость высвобождения и эффективность инкапсуляции, могут быть
20 оптимизированы для получения оптимального препарата.

А. Синтез микросфер ПМГК

[00952] Микросферы полимолочногликолевой кислоты (ПМГК) синтезируют с применением методов двойной эмульгации вода/масло/вода, известных из уровня техники, с использованием ПМГК (Lactel, кат. № В6010-2, внутренняя вязкость 0,55-
25 0,75, МК/ГК 50:50), поливинилового спирта (ПВС) (Sigma, кат. №348406-25G, М. м. 13-23 тысячи), дихлорметана и воды. Если коротко, 0,1 мл воды (W1) добавляют к 2 мл ПМГК, растворенной в дихлорметане (ДХМ) (O1) при концентрациях ПМГК, варьирующих в интервале 50-200 мг/мл. Эмульсию W1/O1 гомогенизируют (гомогенизатор ИКА Ultra-Turrax, T18) в течение 30 секунд на скорости 4 (~15000 об/
30 мин). Далее эмульсию W1/O1 добавляют к 100-200 мл 0,3-1% ПВС (W2) и гомогенизируют в течение 1 минуты при различных скоростях. Препараты перемешивают в течение 3 часов, и затем промывают центрифугированием (20-25 минут, 4000 об/мин, 4°C). Супернатант отбрасывают, и гранулы ПМГК ресуспендируют в 5-10 мл воды, повторяя этот процесс 2 х. Средний размер частиц (представляет 20-30
35 частиц) для каждого препарата определяют микроскопически после промывания. В Табл. 19 приведено увеличение концентрации ПМГК, которое приводит к увеличению размера микросфер. Концентрация ПМГК 200 мг/мл дает средний размер частицы 14,8 мкм, 100 мг/мл - 8,7 мкм, и 50 мг/мл ПМГК дает средний размер частицы 4,0 мкм.

40 Таблица 19.

Различные концентрации ГМГК						
Образец №	Объем O1 (мл)	Концентрация ПМГК (мг/мл)	Объем W2 (мл)	Концентрация ПВС (%)	Скорость	Средний размер (мкм)
1	2	200	100	0,3	5	14,8
2	2	100	100	0,3	5	8,7
3	2	50	100	0,3	5	4,0

45 [00953] В Табл. 20 проиллюстрировано, что уменьшение скорости гомогенизации со скорости 5 (~20000 об/мин) до скорости 4 (~15000 об/мин) приводит к увеличению размера частиц с 14,8 мкм до 29,7 мкм.

Таблица 20.

Различная скорость гомогенизации						
Образец №	Объем O1 (мл)	Концентрация ПМГК (мг/мл)	Объем W2 (мл)	Концентрация ПВС (%)	Скорость	Средний размер (мкм)
1	2	200	100	0,3	5	14,8
4	2	200	100	0,3	4	29,7

[00954] В Табл. 21 проиллюстрировано, что увеличение объема W2 (т.е., увеличение соотношения W2/O1 с 50:1 до 100:1) слегка уменьшает средний размер частиц. Изменение концентрации ПВС с 0,3 до 1% масс оказывало незначительное влияние на размер микросфер ПМГК.

Таблица 21.

Различный объем W2 и концентрация						
Образец №	Объем O1 (мл)	Концентрация ПМГК (мг/мл)	Объем W2 (мл)	Концентрация ПВС (%)	Скорость	Средний размер (мкм)
1	2	200	100	0,3	5	14,8
5	2	200	200	0,3	5	11,7
6	2	200	190	0,3	5	11,4
7	2	200	190	1,0	5	12,3

Б. Инкапсуляция модифицированной мРНК

[00955] Модифицированную мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) растворяют в воде в концентрации 2 мг/мл (W3). Три серии микросфер препаратов ПМГК получают, как раскрыто выше, со следующими параметрами: 0,1 мл W3 с концентрацией 2 мг/мл, 1,6 мл O1 с концентрацией 200 мг/мл, 160 мл W2 с концентрацией 1%, и гомогенизируют на скорости 4 для первой эмульсии (W3/O1) и на скорости 5 для второй эмульсии (W3/O1/W2). После промывания центрифугированием, составы замораживают в жидком азоте, и затем лиофилизируют в течение 3 дней. Для тестирования эффективности инкапсуляции препаратов, структуру лиофилизованного материала разрушают в ДХМ на протяжении 6 часов, с последующей экстракцией в воде в течение ночи. Далее определяют концентрацию модифицированной РНК в образцах на основании значения OD260. Эффективность инкапсуляции вычисляют путем деления фактического количества модифицированной РНК на исходное количество модифицированной РНК. В трех протестированных сериях эффективность инкапсуляции составляла 59,2, 49,8 и 61,3.

В. Целостность модифицированной мРНК, инкапсулированной в микросферы ПМГК

[00956] Модифицированную мРНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) растворяют в воде в различных концентрациях (W4), чтобы получить различный процент массовой нагрузки в составе (мг модифицированной РНК/мг ПМГК * 100) и для определения эффективности инкапсуляции. Параметры из Табл. 22 использовали для получения 4-х различных серий препаратов микросфер ПМГК со скоростью гомогенизации 4 для первой эмульсии (W4/O1) и скоростью гомогенизации 5 для второй эмульсии (W4/O1/W2).

Таблица 22.

Параметры препаратов микросфер ПМГК Фактора IX								
№	Объем W4 (мкл)	Концентрация Фактора IX (мг/мл)	Количество Фактора IX (мкг)	Объем O1 (мл)	Концентрация ПМГК (мг/мл)	Объем W2 (мл)	Концентрация ПВС (%)	% массовой нагрузки (% масс)

A	100	2,0	200,0	2,0	200	200	1,0	0,05
B	100	4,0	400,0	2,0	200	200	1,0	0,10
C	400	2,0	800,0	2,0	200	200	1,0	0,20
D	400	4,0	1600,0	2,0	200	200	1,0	0,40

5 [00957] После лиофилизации, микросферы ПМГК взвешивают и помещают в пробирки Эппендорфа емкостью 2 мл, что соответствует ~10 мкг модифицированной РНК. Обнаружено, что лиофилизация не разрушает общей структуры микросфер ПМГК. Для повышения процента массовой нагрузки (% масс) для микросфер ПМГК, увеличенные количества модифицированной РНК добавляют к образцам. Микросферы

10 ПМГК разрушают добавлением 1,0 мл ДХМ в каждую пробирку, с последующим встряхиванием образцов в течение 6 часов. Для экстракции модифицированной РНК, 0,5 мл воды добавляют к каждому образцу, и образцы встряхивают в течение ночи, после чего концентрацию модифицированной РНК в образцах определяют на основании значения OD260. Для определения выхода процесса экстракции, свободную

15 модифицированную РНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) (контрольный образец препарата с нарушенной структурой) помещают в ДХМ и подвергают процессу нарушения структуры. В Табл. 23 приведена нагрузка и эффективность инкапсуляции

20 для образцов. Все значения эффективности инкапсуляции образцов нормализованы к контрольному образцу препарата с нарушенной структурой.

Таблица 23.			
Процент массовой нагрузки и эффективность инкапсуляции			
№	Теоретическая нагрузка модифицированной РНК (% масс)	Фактическая нагрузка модифицированной РНК (% масс)	Эффективность инкапсуляции (%)
A	0,05	0,06	97,1
B	0,10	0,10	85,7
C	0,20	0,18	77,6
D	0,40	0,31	68,1
Контроль	-	-	100,0

30 Г. Исследование высвобождения модифицированной мРНК, инкапсулированной в микросферы ПМГК

[00958] Структуру микросфер ПМГК, содержащих модифицированную РНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10) разрушают, как раскрыто выше, и целостность экстрагированной модифицированной РНК определяют методом автоматизированного электрофореза

35 (Bio-Rad Experion). Экстрагированную модифицированную мРНК сравнивают с модифицированной мРНК из препарата с нарушенной структурой и контрольным образцом с разрушенной структурой с целью проверки целостности инкапсулированной модифицированной мРНК. Как проиллюстрировано на Фиг. 3, большая часть модифицированной РНК остается интактной для серий А, В, С и D, для контрольного

40 образца с нарушенной структурой (деструктурированный контроль) и контрольного образца без какой-либо структуры (неструктурированный контроль).

Д. Экспрессия белка модифицированной мРНК, инкапсулированной в микросферы ПМГК

[00959] Микросферы ПМГК, содержащие модифицированную РНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) разрушают, как раскрыто выше, и экспрессию белка из экстрагированной модифицированной РНК определяют анализом трансфекции *in vitro*.

Клетки НЕК293 обратно трансфицируют 250 нг комплекса модифицированной РНК Фактора IX с RNAiMAX (Invitrogen) в трех экземплярах.

[00960] Модифицированную РНК Фактора IX разбавляют водой, не содержащей нуклеаз, до концентрации 25 нг/мкл, и RNAiMAX разбавляют 13,3 × в минимальной эссенциальной среде Игла (МЭСИ), не содержащей сыворотки. Равные объемы разбавленной модифицированной РНК и разбавленного RNAiMAX смешивают и дают постоять в течение 20-30 минут при комнатной температуре. Далее, 20 мкл трансфекционной смеси, содержащей 250 нг модифицированной РНК Фактора IX, добавляют к 80 мкл суспензии клеток, содержащей 30000 клеток. Затем клетки инкубируют в течение 16 часов в инкубаторе для культуры клеток с увлажненной атмосферой, 37°C/5% CO₂, после чего собирают супернатант культуры клеток. Экспрессию белка Фактора IX в супернатанте клеток анализируют с помощью специфичного набора ТИФА для Фактора IX (Molecular Innovations, кат. № HFIXKT-TOT), и обнаруженная экспрессия белка приведена в Табл. 24. Во всех протестированных сериях микросфер ПМГК, модифицированная РНК Фактора IX остается активной и экспрессирует белок Фактора IX после введения в микросферы ПМГК и последующего нарушения их структуры.

Таблица 24.		
Экспрессия белка		
Образец	Экспрессия белка Фактора IX (нг/мл)	
Серия А	0,83	
Серия В	1,83	
Серия С	1,54	
Серия D	2,52	
Деструктурированный контроль	4,34	
Неструктурированный контроль	3,35	

Е. Исследование высвобождения модифицированной мРНК, инкапсулированной в микросферы ПМГК

[00961] Микросферы ПМГК, содержащие модифицированную РНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) ресуспендируют в воде до концентрации микросфер ПМГК 24 мг/мл. После ресуспендирования отбирают аликвоты по 150 мкл суспензии микросфер ПМГК в пробирки Эппендорфа. Образцы инкубируют со встряхиванием при 37°C в ходе всего исследования. Образцы в 3-х экземплярах отбирают через 0,2, 1, 2, 8, 14 и 21 день. Для определения количества модифицированной РНК, высвобожденного из микросфер ПМГК, образцы центрифугируют, супернатант извлекают, и концентрацию модифицированной РНК в супернатанте определяют на основании значения OD₂₆₀. Процент высвобождения, приведенный в Табл. 25, вычислен на основе общего количества модифицированной РНК в каждом образце. Через 31 день 96% модифицированной РНК Фактора IX высвобождается из препаратов микросфер ПМГК.

Таблица 25.		
Процент высвобождения		
Время (дни)	% Высвобождения	
0	0,0	
0,2	27,0	
1	37,7	
2	45,3	
4	50,9	

8	57,0
14	61,8
21	75,5
31	96,4

5 Ж. Воспроизводимость размера частиц для микросфер ПМГК
 [00962] Три серии микросфер ПМГК, содержащих модифицированную РНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином), получают с использованием таких же условий, как раскрыты для
 10 Серии D, приведенной в Табл. 22, (0,4 мл W4 с концентрацией 4 мг/мл, 2,0 мл O1 с концентрацией 200 мг/мл, 200 мл W2 с концентрацией 1%; гомогенизируют на скорости 5 для эмульсии W4/O1/W2). Для улучшения гомогенности суспензии микросфер ПМГК, перед центрифугированием проводят фильтрацию. После перемешивания в течение 3 часов и перед центрифугированием, весь обработанный материал пропускают сквозь
 15 нейлоновый сетчатый фильтр с размером пор 100 мкм (Fisherbrand Cell Strainer, кат. №22-363-549) для удаления более крупных агрегатов. После промывания и ресуспендирования в воде, 100-200 мкл образца микросфер ПМГК используют для измерения размера частиц препаратов методом лазерной дифракции (Malvern Mastersizer 2000). Размер частиц образцов приведен в Табл. 26.

20

Таблица 26.					
Краткая характеристика размера частиц					
№	D10 (мкм)	D50 (мкм)	D90 (мкм)	Средневзвешенный объем (мкм)	Фильтрация
Контроль	19,2	62,5	722,4	223,1	Нет
А	9,8	31,6	65,5	35,2	Да
В	10,5	32,3	66,9	36,1	Да
С	10,8	35,7	79,8	41,4	Да

25

[00963] Результаты для 3-х серий микросфер ПМГК с применением фильтрации сравнивают с серией микросфер ПМГК, полученной в таких же условиях, но без
 30 фильтрации. Включение стадии фильтрации перед промыванием уменьшало средний размер частиц и демонстрировало систематическое распределение размера частиц для 3-х серий микросфер ПМГК.

3. Стабильность микросфер ПМГК, содержащих Фактор IX, в сыворотке

[00964] мРНК РНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно
 35 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) в буфере (ТЭ) или 90% сыворотке (Se), или мРНК Фактора IX в ПМГК в буфере, 90% сыворотке или 1% сыворотке инкубируют в буфере, 90% сыворотке или 1% сыворотке при концентрации мРНК 50 нг/мкл в общем объеме 70 мкл. Образцы отбирают через 0, 30, 60 или 120
 40 минут. РНКазу инактивируют расщеплением протеиназой К при 55°C в течение 20 минут, с добавлением 25 мкл 4 × буфера протеиназы К (0,4 мл 1 М Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мл 0,5 М ЭДТА, 0,12 мл 5 М NaCl и 0,4 мл 10% натрия лаурилсульфата [НЛС]) и 8 мкл протеиназы К в концентрации 20 мг/мл. мРНК Фактора IX осаждают (добавлением 250 мкл 95% этанола на 1 час, центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 13000
 45 об/мин и извлекают супернатант, добавляют 200 мкл 70% этанола к грануле, центрифугируют снова в течение 5 мин при 13000 об/мин, извлекают супернатант и ресуспендируют гранулу в 70 мкл воды) или экстрагируют из микросфер ПМГК (центрифугируют в течение 5 мин при 13000 об/мин и извлекают супернатант, промывают гранулу 1 мл воды, центрифугируют в течение 5 мин при 13000 об/мин и извлекают

супернатант, добавляют 280 мкл дихлорметана к грануле и встряхивают в течение 15 минут, добавляют 70 мкл воды, затем встряхивают в течение 2 часов и извлекают водную фракцию), после чего анализируют с помощью биоанализатора. Микросферы ПМГК защищают модифицированную мРНК Фактора IX от разложения в 90% и 1% сыворотке на протяжении 2 часов. Модифицированная мРНК Фактора IX полностью разлагается в 90% сыворотке в начальной точке времени.

Пример 16. Исследование липидных наночастиц *in vivo*

[00965] Модифицированную мРНК G-CSF (кДНК с промотором T7, 5' нетранслируемый участок (НТУ) и 3' НТУ, используемая для транскрипции *in vitro*, представлена в SEQ ID NO: 5; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) и Фактор IX (кДНК с промотором T7, 5' НТУ и 3' НТУ используемая для транскрипции *in vitro*, представлена в SEQ ID NO: 13; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) вводят в липидные наночастицы (ЛНЧ) с применением способа шприцевого насоса. ЛНЧ получают с массовым соотношением 20:1 общего липида к модифицированной мРНК, с конечным молярным соотношением липидов 50:10:38,5:1,5 (Длин-КС2-ДМА:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-к-ДМПО). Препараты, приведенные в Табл. 27, были охарактеризованы размером частиц, зета потенциалом и инкапсуляцией.

Таблица 27.

Препараты		
Препарат №	NPA-029-1	NPA-030-1
Модифицированная мРНК	Фактор IX	G-CSF
Средний размер	91 нм	106 нм
	ИПД: 0,04	ИПД: 0,06
Зета при pH 7,4	1,8 мВ	0,9 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	92%	100%

[00966] Препарат ЛНЧ вводят мышам (n=5) внутривенно в дозах модифицированной мРНК 100, 10 или 1 мкг. Мышей обезглавливают через 8 часов после введения. Сыворотку собирают пункцией сердца мышей, которым вводили препараты модифицированной мРНК G-CSF или Фактора IX. Экспрессию белка определяют методом ТИФА.

[00967] Не наблюдалось значимого снижения массы тела (<5%) в группах G-CSF или Фактора IX. Экспрессию белка для группы дозы G-CSF или Фактора IX определяют методом ТИФА на основании стандартной кривой. Образцы сыворотки разбавляют (приблизительно 20-2500 × для G-CSF и приблизительно 10-250 × для Фактора IX), чтобы убедиться, что образцы находятся в пределах линейного интервала стандартной кривой. Как проиллюстрировано в Табл. 28, экспрессия белка G-CSF, определенная методом ТИФА, составляет приблизительно 17, 1200 и 4700 нг/мл для групп дозы 1, 10 и 100 мкг, соответственно. Как проиллюстрировано в Табл. 29, экспрессия белка Фактора IX, определенная методом ТИФА, составляет приблизительно 36, 380 и 3000-11000 нг/мл для групп дозы 1, 10 и 100 мкг, соответственно.

Таблица 28.

Экспрессия белка G-CSF			
Доза (мкг)	Концентрация (нг/мл)	Фактор разведения	Объем образца

1	17,73	20 ×	5 мкл
10	1204,82	2500 ×	0,04 мкл
100	4722,20	2500 ×	0,04 мкл
Таблица 29.			
Экспрессия белка Фактора IX			
Доза (мкг)	Концентрация (нг/мл)	Фактор разведения	Объем образца
1	36,05	10 ×	5 мкл
10	383,04	10 ×	5 мкл
100*	3247,75	50 ×	1 мкл
100*	11177,20	250 ×	0,2 мкл

5 [00968] Как проиллюстрировано в Табл. 30, препараты ЛНЧ, раскрытые выше, продемонстрировали увеличение приблизительно в 10000-100000 раз выработки белка, по сравнению с внутривенным(в/в) введением препарата липоплекса с такой же дозой модифицированной мРНК и внутримышечным (в/м) или подкожным (п/к) введением такой же дозы модифицированной мРНК в солевом растворе. В Табл. 30 символ «~» обозначает «приблизительно».

Таблица 30.		
Выработка белка		
G-CSF	Доза (мкг)	Концентрация в сыворотке (нг/мл) 8-12 часов после введения
в/м	100	~20-80
п/к	100	~10-40
В/в (Липоплекс)	100	~30
В/в (ЛНЧ)	100	~5000000
В/в (ЛНЧ)	10	~1000000
В/в (ЛНЧ)	1	~20000
Фактор IX	Доза (мкг)	Концентрация в сыворотке (нг/мл) 8-12 часов после введения
в/м	2x 100	~1,6 нг/мл
В/в (ЛНЧ)	100	~3000-10000 нг/мл
В/в (ЛНЧ)	10	~400 нг/мл
В/в (ЛНЧ)	1	~40 нг/мл

Материалы и методы для Примеров 17-22

30 [00969] Модифицированную мРНК G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) и ЭПО (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) вводят в липидные наночастицы (ЛНЧ) с применением способа шприцевого насоса. ЛНЧ получают с массовым соотношением общего липида к модифицированной мРНК 20:1, с конечным молярным соотношением липидов 50:10:38,5:1,5 (ДЛин-КС2-ДМА: ДСФХ:холестерин:ПЭГ-к-ДМПО). Препараты, приведенные в Табл. 31, охарактеризованы размером частиц, зета потенциалом и инкапсуляцией.

Таблица 31.		
Препараты		
Препарат №	NPA-030-2	NPA-060-1
Модифицированная мРНК	G-CSF	ЭПО
Средний размер	84 нм	85 нм
	ИПД: 0,04	ИПД: 0,03
Зета при pH 7,4	0,8 мВ	1,5 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	95%	98%

Пример 17. Исследование *in vivo* липидных наночастиц, содержащих модифицированную мРНК

[00970] Препараты ЛНЧ, приведенные в Табл. 31 (выше), вводят крысам (n=5) внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) с однократной дозой модифицированной мРНК 0,05 мг/кг. Контрольная группа крыс (n=4) остается нелеченной. У крыс отбирают образцы крови через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов и 96 часов, после чего им вводят препараты модифицированной мРНК G-CSF или ЭПО для определения экспрессии белка методом ТИФА. У крыс, которым вводили модифицированную мРНК ЭПО внутривенно, также отбирают образцы крови через 7 дней.

[00971] Как проиллюстрировано в Табл. 32, экспрессия белка ЭПО у крыс, которым внутривенно вводили модифицированную мРНК ЭПО, была обнаружимой до 5 дней. G-CSF у крыс, которым внутривенно вводили модифицированную мРНК G-CSF, был обнаружимым до 7 дней. При подкожном и внутримышечном введении модифицированная мРНК ЭПО была обнаружимой по меньшей мере до 24 часа, и модифицированная мРНК G-CSF была обнаружимой по меньшей мере до 8 час. В Табл. 32, «ЗПСК» обозначает значения, находящиеся за пределами стандартной кривой и «НТ» обозначает «не тестировали».

20

Таблица 32.

Экспрессия белка G-CSF и ЭПО			
Способ введения	Время	Концентрация ЭПО в сыворотке (пг/мл)	Концентрация G-CSF в сыворотке (пг/мл)
в/в	2 часа	36981,0	31331,9
в/в	8 часов	62053,3	70532,4
в/в	24 часа	42077,0	5738,6
в/в	48 часов	5561,5	233,8
в/в	5 дней	0,0	60,4
в/в	7 дней	0,0	НТ
в/м	2 часа	1395,4	1620,4
в/м	8 часов	8974,6	7910,4
в/м	24 часа	4678,3	893,3
в/м	48 часов	НТ	ЗПСК
в/м	5 дней	НТ	ЗПСК
п/к	2 часа	386,2	80,3
п/к	8 часов	985,6	164,2
п/к	24 часа	544,2	ЗПСК
п/к	48 часов	НТ	ЗПСК
п/к	5 дней	НТ	ЗПСК
Нелеченные	Все образцы крови	0	0

35

Пример 18. Исследование протекания во времени *in vivo*

[00972] Препараты ЛНЧ, приведенные в Табл. 31 (выше), вводят мышам (n=5) внутривенно (в/в) с однократной дозой модифицированной мРНК 0,5, 0,05 или 0,005 мг/кг. У мышей отбирают образцы крови через 8 часов, 24 часа, 72 часа и 6 дней после введения им препаратов модифицированной мРНК G-CSF или ЭПО для определения экспрессии белка методом ТИФА.

[00973] Как проиллюстрировано в Табл. 33, экспрессия белка ЭПО и G-CSF у мышей, которым внутривенно вводили модифицированную мРНК, была обнаружимой до 72 часов у мышей, которым вводили дозы 0,005 мг/кг и 0,05 мг/кг модифицированной мРНК, и до 6 дней у мышей, которым вводили модифицированную мРНК ЭПО. В Табл. 33, «>» обозначает «более чем» и «НО» обозначает «не определяли».

Таблица 33.

Экспрессия белка			
Доза (мг/кг)	Время	Концентрация ЭПО в сыворотке (пг/мл)	Концентрация G-CSF в сыворотке (пг/мл)
0,005	8 часов	12508,3	11550,6
0,005	24 часа	6803,0	5068,9
0,005	72 часа	НО	НО
0,005	6 дней	НО	НО
0,05	8 часов	92139,9	462312,5
0,05	24 часа	54389,4	80903,8
0,05	72 часа	НО	НО
0,05	6 дней	НО	НО
0,5	8 часов	498515,3	>1,250 000
0,5	24 часа	160566,3	495812,5
0,5	72 часа	3492,5	1325,6
0,5	6 дней	21,2	НО

Пример 19. Исследование препаратов ЛНЧ in vivo на грызунах

А. Препараты ЛНЧ у мышей

[00974] Препараты ЛНЧ, приведенные в Табл. 31 (выше), вводят мышам (n=4) внутривенно (в/в) в однократной дозе модифицированной мРНК G-CSF или ЭПО для определения экспрессии белка. Экспрессию белка G-CSF и ЭПО определяют методом ТИФА.

[00975] Как проиллюстрировано в Табл. 34, экспрессия белка ЭПО и G-CSF у мышей была обнаружимой по меньшей мере до 48 часов у мышей, которые получали дозы 0,005 мг/кг модифицированной РНК, и до 72 часов у мышей, которые получали дозы 0,05 мг/кг модифицированной РНК. В Табл. 34 «ЗПСК» обозначает значения, находящиеся за пределами стандартной кривой, и «НТ» обозначает «не тестировали».

Таблица 34.

Экспрессия белка у мышей			
Доза (мг/кг)	Время	Концентрация ЭПО в сыворотке (пг/мл)	Концентрация G-CSF в сыворотке (пг/мл)
0,005	2 часа	ЗПСК	3447,8
0,005	8 часов	1632,8	11454,0
0,005	24 часа	1141,0	4960,2
0,005	48 часов	137,4	686,4
0,005	72 часа	0	НТ
0,05	2 часа	10027,3	20951,4
0,05	8 часов	56547,2	70012,8
0,05	24 часа	25027,3	19356,2
0,05	48 часов	1432,3	1963,0
0,05	72 часа	82,2	47,3

Б. Препараты ЛНЧ у крыс

[00976] Препараты ЛНЧ, приведенные в Табл. 31 (выше), вводят крысам (n=4) внутривенно (в/в) в однократной дозе модифицированной мРНК 0,05 мг/кг. Контрольная группа крыс (n=4) остается нелеченной. У крыс отбирают образцы крови через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 7 дней и 14 дней после введения им препаратов модифицированной мРНК G-CSF или ЭПО для определения экспрессии белка.

Экспрессию белка G-CSF и ЭПО определяют методом ТИФА.

Пример 20. Исследование ранних стадий протекания во времени для ЛНЧ

[00977] Препараты ЛНЧ, приведенные в Табл. 31 (выше), вводят млекопитающим внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) с однократной дозой

модифицированной мРНК 0,5 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,005 мг/кг. Контрольная группа млекопитающих остается нелеченной. У млекопитающих отбирают образцы крови через 5 минут, 10 минут, 20 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 1,5 часа и/или 2 часа после введения им препарата ЛНЧ, содержащего модифицированную мРНК, для определения экспрессии белка методом ТИФА. У млекопитающих также отбирают образцы крови для определения полной формулы крови, в том числе, уровней гранулоцитов и количества эритроцитов.

Пример 21. Исследование *in vivo* на негуманоидных приматах

[00978] Препараты ЛНЧ, приведенные в Табл. 31 (выше), вводят негуманоидным приматам (НГП) (яванская макака) (n=2) в виде внутривенной инъекции (в/в) болюса на протяжении приблизительно 30 секунд, с использованием гиподермической иглы, которая, при необходимости, может быть присоединена к шприцу/Abvocath, или иглы-бабочки. НГП вводят однократно в/в модифицированную мРНК в дозе 0,05 мг/кг ЭПО или G-CSF или 0,005 мг/кг ЭПО в объеме дозы 0,5 мл/кг. У НГП отбирают образцы крови за 5-6 дней до введения препарата ЛНЧ, содержащего модифицированную мРНК, для определения экспрессии белка в сыворотке и начальных значений полной формулы крови. После введения препаратов модифицированной мРНК у НГП отбирают образцы крови через 8, 24, 48 и 72 часа для определения экспрессии белка. Через 24 и 72 часа после введения также определяют полную формулу крови НГП. Экспрессию белка G-CSF и ЭПО определяют методом ТИФА. Мочу НГП собирают на протяжении всего эксперимента и анализируют для оценки клинической безопасности. Образцы отбирают у НГП, после введения им препаратов модифицированной мРНК G-CSF или ЭПО, для определения экспрессии белка методом ТИФА. Кроме того, у негуманоидных приматов анализируют показатели клинической химии, гематологии, анализа мочи и цитокинов.

[00979] Как проиллюстрировано в Табл. 35, экспрессия белка ЭПО у НГП, которым вводили дозу 0,05 мг/кг, является обнаружимой до 72 часов, и при дозе препарата ЭПО 0,005 мг/кг она является обнаружимой до 48 часов. В Табл. 35 «<» обозначает «менее указанного значения». Экспрессия белка G-CSF наблюдается до 24 час после введения препарата модифицированной мРНК. Предварительно, наблюдалось повышение уровней гранулоцитов и ретикулоцитов у НГП после введения препаратов модифицированной мРНК.

Экспрессия белка у негуманоидных приматов					
Модифицированная мРНК	Доза (мг/кг)	Время	Самки НГП, концентрация в сыворотке (пг/мл)	Самцы НГП, концентрация в сыворотке (пг/мл)	Средняя концентрация в сыворотке (пг/мл)
G-CSF	0,05	До взятия образца крови	0	0	0
		8 часов	3289	1722	2506
		24 часа	722	307	515
		48 часов	0	0	0
		72 часа	0	0	0
ЭПО	0,05	До взятия образца крови	0	0	0
		8 часов	19858	7072	13465
		24 часа	18178	4913	11546
		48 часов	5291	498	2895
		72 часа	744	60	402
ЭПО	0,005	До взятия образца крови	0	0	0
		8 часов	523	250	387
		24 часа	302	113	208
		48 часов	<7,8	<7,8	<7,8

		72 часа	0	0	0
--	--	---------	---	---	---

Пример 22. Исследование G-CSF и ЭПО in vivo на негуманоидных приматах [00980] Препараты ЛНЧ, приведенные в Табл. 31 (выше), вводят негуманоидным приматам (НГП) (яванская макака) (n=2) внутривенной (в/в) инъекцией. НГП вводят в/в однократную дозу модифицированной мРНК G-CSF или ЭПО 0,5 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,005 мг/кг в объеме дозы 0,5 мл/кг. У НГП отбирают образцы крови перед введением препарата ЛНЧ, содержащего модифицированную мРНК, для определения экспрессии белка в сыворотке и определения полной формулы крови в начальной точке. После введения препарата модифицированной мРНК G-CSF, у НГП отбирают образцы крови через 8, 24, 48 и 72 часа для определения экспрессии белка. После введения препарата модифицированной мРНК ЭПО у НГП отбирают образцы крови через 8, 24, 48, 72 часа и 7 дней для определения экспрессии белка.

[00981] Образцы, полученные от НГП после введения им препаратов модифицированной мРНК G-CSF или ЭПО, анализируют методом ТИФА для определения экспрессии белка. Кроме того, подсчитывают количество нейтрофилов и ретикулоцитов до введения дозы, через 24 часа, 3 дня, 7 дней, 14 дней и 18 дней после введения препарата модифицированной РНК G-CSF или ЭПО.

[00982] Как проиллюстрировано в Табл. 36, экспрессия белка G-CSF не обнаруживалась после прохождения 72 час. В Табл. 36 «<39» обозначает значение ниже нижнего предела обнаружения 39 пг/мл.

Экспрессия белка G-CSF				
Модифицированная мРНК	Доза (мг/кг)	Время	Самки НГП, концентрация G-CSF в сыворотке (пг/мл)	Самцы НГП, концентрация G-CSF в сыворотке (пг/мл)
G-CSF	0,5	До взятия образца крови	<39	<39
		8 часов	43525	43594
		24 часа	11374	3628
		48 часов	1100	833
		72 часа	<39	306
G-CSF	0,05	До взятия образца крови	<39	<39
		8 часов	3289	1722
		24 часа	722	307
		48 часов	<39	<39
		72 часа	<39	<39
G-CSF	0,005	До взятия образца крови	<39	<39
		8 часов	559	700
		24 часа	155	<39
		48 часов	<39	<39
		72 часа	<39	<39

[00983] Как проиллюстрировано в Табл. 37, экспрессия белка ЭПО была необнаружимой после прохождения 7 дней. В Табл. 37 «<7,8» обозначает значение ниже нижнего предела обнаружения 7,8 пг/мл.

Экспрессия белка ЭПО				
Модифицированная мРНК	Доза (мг/кг)	Время	Самки НГП, концентрация ЭПО в сыворотке (пг/мл)	Самцы НГП, концентрация ЭПО в сыворотке (пг/мл)
ЭПО	0,5	До взятия образца крови	<7,8	<7,8
		8 часов	158771	119086
		24 часа	133978	85825

		48 часов	45250	64793	
		72 часа	15097	20407	
		7 дней	<7,8	<7,8	
5	ЭПО	0,05	До взятия образца крови	<7,8	<7,8
			8 часов	19858	7072
			24 часа	18187	4913
			48 часов	5291	498
			72 часа	744	60
			7 дней	<7,8	<7,8
10	ЭПО	0,005	До взятия образца крови	<7,8	<7,8
			8 часов	523	250
			24 часа	302	113
			48 часов	11	29
			72 часа	<7,8	<7,8
			7 дней	<7,8	<7,8

15 [00984] Как проиллюстрировано в Табл. 38, наблюдается увеличение количества нейтрофилов во всех группах G-CSF относительно уровней до введения дозы.

Таблица 38.					
Фармакологический эффект мРНК G-CSF у НГП					
Доза (мг/кг)	Время	Самцы НГП (G-CSF) нейтрофилы ($10^9/л$)	Самки НГП (G-CSF) нейтрофилы ($10^9/л$)	Самцы НГП (ЭПО) нейтрофилы $10^9/л$	Самки НГП (ЭПО) нейтрофилы ($10^9/л$)
0,5	До введения дозы	1,53	1,27	9,72	1,82

25		24 часа	14,92	13,96	7,5	11,85
		3 дня	9,76	13,7	11,07	5,22
		7 дней	2,74	3,81	11,8	2,85
		14/18 дней	2,58	1,98	7,16	2,36
30	0,05	До введения дозы	13,74	3,05	0,97	2,15
		24 часа	19,92	29,91	2,51	2,63
		3 дня	7,49	10,77	1,73	4,08
		7 дней	4,13	3,8	1,23	2,77
		14/18 дней	3,59	1,82	1,53	1,27
35	0,005	До введения дозы	1,52	2,54	5,46	5,96
		24 часа	16,44	8,6	5,37	2,59
		3 дня	3,74	1,78	6,08	2,83
		7 дней	7,28	2,27	3,51	2,23
		14/18 дней	4,31	2,28	1,52	2,54

[00985] Как проиллюстрировано в Табл. 39, наблюдается увеличение количества ретикулоцитов во всех группах ЭПО в интервале от 3 дней до 14/18 дней после введения дозы, относительно уровней ретикулоцитов через 24 часа после введения дозы.

Таблица 39.						
Фармакологическое влияние мРНК ЭПО на количество нейтрофилов						
Доза (мг/кг)	Время	Самцы НГП (G-CSF) нейтрофилы ($10^{12}/л$)	Самки НГП (G-CSF) нейтрофилы ($10^{12}/л$)	Самцы НГП (ЭПО) нейтрофилы ($10^{12}/л$)	Самки НГП (ЭПО) нейтрофилы ($10^{12}/л$)	
45	0,5	До введения дозы	0,067	0,055	0,107	0,06
		24 часа	0,032	0,046	0,049	0,045
		3 дня	0,041	0,017	0,09	0,064
		7 дней	0,009	0,021	0,35	0,367
		14/18 дней	0,029	0,071	0,066	0,071
0,05	До введения дозы	0,055	0,049	0,054	0,032	
	24 часа	0,048	0,046	0,071	0,04	

	3 дня	0,101	0,061	0,102	0,105
	7 дней	0,157	0,094	0,15	0,241
	14/18 дней	0,107	0,06	0,067	0,055
0,005	До введения дозы	0,037	0,06	0,036	0,052

5

	24 часа	0,037	0,07	0,034	0,061
	3 дня	0,037	0,054	0,079	0,118
	7 дней	0,046	0,066	0,049	0,087
	14/18 дней	0,069	0,057	0,037	0,06

10 [00986] Как проиллюстрировано в Табл. 40-42, введение модифицированной РНК ЭПО оказывало влияние на другие показатели эритропоэза, в том числе, гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT) и количество эритроцитов (RBC).

15

20

25

Таблица 40.

Фармакологический эффект мРНК ЭПО на гемоглобин					
Доза (мг/кг)	Время	Самцы НГП (G-CSF) HGB (г/л)	Самки НГП (G-CSF) HGB (г/л)	Самцы НГП (ЭПО) HGB (г/л)	Самки НГП (ЭПО) HGB (г/л)
0,5	До введения дозы	133	129	134	123
	24 часа	113	112	127	108
	3 дня	118	114	126	120
	7 дней	115	116	140	134
	14/18 дней	98	113	146	133
0,05	До введения дозы	137	129	133	133
	24 часа	122	117	123	116
	3 дня	126	115	116	120
	7 дней	126	116	126	121
	14/18 дней	134	123	133	129
0,005	До введения дозы	128	129	132	136
	24 часа	117	127	122	128
	3 дня	116	127	125	130
	7 дней	116	129	119	127
	14/18 дней	118	129	128	129

30

Таблица 41.

Фармакологическое влияние мРНК ЭПО на гематокрит					
Доза (мг/кг)	Время	Самцы НГП (G-CSF) HCT (л/л)	Самки НГП (G-CSF) HCT (л/л)	Самцы НГП (ЭПО) HCT (л/л)	Самки НГП (ЭПО) HCT (л/л)
0,5	До введения дозы	0,46	0,43	0,44	0,4
	24 часа	0,37	0,38	0,4	0,36
	3 дня	0,39	0,38	0,41	0,39

35

40

45

	7 дней	0,39	0,38	0,45	0,45
	14/18 дней	0,34	0,37	0,48	0,46
0,05	До введения дозы	0,44	0,44	0,45	0,43
	24 часа	0,39	0,4	0,43	0,39
	3 дня	0,41	0,39	0,38	0,4
	7 дней	0,42	0,4	0,45	0,41
	14/18 дней	0,44	0,4	0,46	0,43
0,005	До введения дозы	0,42	0,42	0,48	0,45
	24 часа	0,4	0,42	0,42	0,43
	3 дня	0,4	0,41	0,44	0,42
	7 дней	0,39	0,42	0,41	0,42
	14/18 дней	0,41	0,42	0,42	0,42

Таблица 42.

Фармакологическое влияние мРНК ЭПО на количество эритроцитов					
Доза (мг/кг)	Время	Самцы НГП (G-CSF) RBC ($10^{12}/л$)	Самки НГП (G-CSF) RBC ($10^{12}/л$)	Самцы НГП (ЭПО) RBC ($10^{12}/л$)	Самки НГП (ЭПО) RBC ($10^{12}/л$)
0,5	До введения дозы	5,57	5,57	5,43	5,26

	24 часа	4,66	4,96	5,12	4,69	
	3 дня	4,91	4,97	5,13	5,15	
	7 дней	4,8	5,04	5,55	5,68	
	14/18 дней	4,21	4,92	5,83	5,72	
5	0,05	До введения дозы	5,68	5,64	5,57	5,84
		24 часа	4,96	5,08	5,25	5,18
		3 дня	5,13	5,04	4,81	5,16
		7 дней	5,17	5,05	5,37	5,31
		14/18 дней	5,43	5,26	5,57	5,57
10	0,005	До введения дозы	5,67	5,36	6,15	5,72
		24 часа	5,34	5,35	5,63	5,35
		3 дня	5,32	5,24	5,77	5,42
		7 дней	5,25	5,34	5,49	5,35
		14/18 дней	5,37	5,34	5,67	5,36

[00987] Как проиллюстрировано в Табл. 43 и 44, введение модифицированной РНК оказывает влияние на химические показатели сыворотки, в том числе, аланинаминотрансферазу (АЛТ) и аспартатаминотрансферазу (АсАТ).

Таблица 43.						
Фармакологический эффект мРНК ЭПО на аланинаминотрансферазу						
Доза (мг/кг)	Время	Самцы НГП (G-CSF) АЛТ (Ед/л)	Самки НГП (G-CSF) АЛТ (Ед/л)	Самцы НГП (ЭПО) АЛТ (Ед/л)	Самки НГП (ЭПО) АЛТ (Ед/л)	
20	0,5	До введения дозы	29	216	50	31
		2 дня	63	209	98	77
		4 дня	70	98	94	87
		7 дней	41	149	60	59
		14 дней	43	145	88	44
25	0,05	До введения дозы	58	53	56	160
		2 дня	82	39	95	254
		4 дня	88	56	70	200
		7 дней	73	73	64	187
		14 дней	50	31	29	216
30	0,005	До введения дозы	43	51	45	45
		2 дня	39	32	62	48
		4 дня	48	58	48	50
		7 дней	29	55	21	48
		14 дней	44	46	43	51

Таблица 44.

Фармакологический эффект мРНК ЭПО на аспартатаминотрансферазу						
Доза (мг/кг)	Время	Самцы НГП (G-CSF) АсАТ (Ед/л)	Самки НГП (G-CSF) АсАТ (Ед/л)	Самцы НГП (ЭПО) АсАТ (Ед/л)	Самки НГП (ЭПО) АсАТ (Ед/л)	
35	0,5	До введения дозы	32	47	59	20
		2 дня	196	294	125	141
		4 дня	67	63	71	60
		7 дней	53	68	56	47
		14 дней	47	67	82	44
40	0,05	До введения дозы	99	33	74	58

45	0,005	2 дня	95	34	61	80
		4 дня	69	42	48	94
		7 дней	62	52	53	78
		14 дней	59	20	32	47
		До введения дозы	35	54	39	40
0,005	2 дня	70	34	29	25	
	4 дня	39	36	43	55	
	7 дней	28	31	55	31	

	14 дней	39	20	35	54
--	---------	----	----	----	----

[00988] Как проиллюстрировано в Табл. 45, введение модифицированной РНК вызывает повышение уровня цитокинов, интерферона-альфа (интерферона-альфа) после введения модифицированной мРНК.

5

Таблица 45.					
Фармакологический эффект мРНК ЭПО на аланинаминотрансферазу					
Доза (мг/кг)	Время	Самцы НГП (G-CSF) интерферон-альфа (пг/мл)	Самки НГП (G-CSF) интерферон-альфа (пг/мл)	Самцы НГП (ЭПО) интерферон-альфа (пг/мл)	Самки НГП (ЭПО) интерферон-альфа (пг/мл)
0,5	До введения дозы	0	0	0	0
	День 1+ 8 часов	503,8	529,2	16,79	217,5
	4 дня	0	0	0	0
0,05	До введения дозы	0	0	0	0
	День 1+ 8 часов	0	0	0	0
	4 дня	0	0	0	0
0,005	До введения дозы	0	0	0	0
	День 1+ 8 часов	0	0	0	0
	4 дня	0	0	0	0

10

15

20

Пример 23. Исследование внутримышечного и/или подкожного введения негуманоидным приматам

[00989] Препараты, содержащие модифицированную мРНК ЭПО (SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозин и псевдоуридин) или мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозин и псевдоуридин) в солевом растворе, вводят негуманоидным приматам (яванская макака) (НГП) внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к).

25

30

35

Однократную дозу модифицированной мРНК 0,05 мг/кг или 0,005 мг/кг вводят в объеме дозы 0,5 мл/кг. У негуманоидных приматов отбирают образцы крови за 5-6 дней до введения дозы для определения концентрации белка в сыворотке и полной формулы крови в начальной точке. После введения препарата модифицированной мРНК у НГП отбирают образцы крови через 8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 7 дней и 14 дней для определения экспрессии белка. Экспрессию белка G-CSF и ЭПО определяют методом ТИФА. Через 24 часа, 72 часа, 7 дней и 14 дней после введения также определяют полную формулу крови НГП. Мочу НГП собирают на протяжении всего эксперимента и анализируют для оценки клинической безопасности. Образец ткани вблизи места инъекции также отбирают и анализируют для определения экспрессии белка.

Пример 24. Распространение модифицированной мРНК

40

[00990] Для определения локализации и/или распространения модифицированной мРНК, могут быть проведены следующие исследования.

45

[00991] Препараты ЛНЧ, содержащие миРНК и модифицированную мРНК, получают в соответствии со способами, известными из уровня техники и/или раскрытыми в настоящем документе. Препараты ЛНЧ могут содержать по меньшей мере одну модифицированную мРНК, которая может кодировать белок, такой как G-CSF, ЭПО, Фактор VII и/или любой белок, раскрытый в настоящем документе. Препараты могут быть введены локально в мышцу млекопитающих с помощью внутримышечной или подкожной инъекции. Доза модифицированной мРНК и размер ЛНЧ могут варьировать для определения влияния на распространение в организме млекопитающего и/или для

оценки влияния на биологическую реакцию, такую как, без ограничений, воспаление. У млекопитающего отбирают образцы крови в различных точках времени для определения экспрессии белка, кодируемого введенной модифицированной мРНК, которая присутствует в сыворотке, и/или для определения полной формулы крови млекопитающего.

[00992] Например, модифицированная мРНК, кодирующая Фактор VII, которая экспрессируется в печени и выделяется в сыворотку, может быть введена внутримышечно и/или подкожно. Одновременно или перед введением модифицированной мРНК, вводят миРНК для инактивации эндогенного Фактора VII. Содержание Фактора VII, образовавшегося в результате внутримышечной и/или подкожной инъекции модифицированной мРНК, измеряют в крови. Кроме того, уровни Фактора VII измеряют в тканях вблизи места инъекции. Если Фактор VII экспрессируется в крови, то присутствует распространение модифицированной мРНК. Если Фактор VII экспрессируется в ткани, но не в крови, то присутствует только локальная экспрессия Фактора VII.

Пример 25. Препараты нескольких модифицированных мРНК

[00993] Препараты ЛНЧ, содержащие модифицированную мРНК, получают в соответствии со способами, известными из уровня техники и/или раскрытыми в настоящем документе. Препараты ЛНЧ могут содержать по меньшей мере одну модифицированную мРНК, которая может кодировать белок, такой как G-CSF, ЭПО, тромбопоэтин и/или любой белок, раскрытый в настоящем документе или известный из уровня техники. По меньшей мере одна модифицированная мРНК может включать 1, 2, 3, 4 или 5 модифицированных молекул мРНК. Препараты, содержащие по меньшей мере одну модифицированную мРНК, могут быть введены внутривенно, внутримышечно или подкожно, в схемах с введением одной или нескольких доз. Биологические образцы, такие как, без ограничений, кровь и/или сыворотка, могут быть собраны и проанализированы в различных точках времени до и/или после введения препарата по меньшей мере одной модифицированной мРНК. Экспрессия белка в биологическом образце на уровне 50-200 пг/мл после введения млекопитающему препарата, содержащего по меньшей мере одну модифицированную мРНК, кодирующую указанный белок, может рассматриваться как биологически эффективная.

Пример 26. Исследование соотношения для полиэтиленгликоля

А. Получение и характеристика ЛНЧ ПЭГ

[00994] Липидные наночастицы (ЛНЧ) получают с применением способа шприцевого насоса. ЛНЧ получают с массовым соотношением 20:1 общего липида к модифицированной мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозин и псевдоуридин). Интервалы молярного соотношения для препаратов приведены в Табл. 46.

Таблица 46.

Молярное соотношение				
	ДЛИН-КС2-ДМА	ДСФХ	Холестерин	ПЭГ-к-ДМПО
Молярный процент (моль %)	50,0	10,0	37-38,5	1,5-3

[00995] Два типа ПЭГ липидов, 1,2-димиристоил-sn-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль (ПЭГ-ДМГ, NOF кат. № SUNBR1GHT® GM-020) и 1,2-дистеароил-sn-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль (ПЭГ-ДСГ, NOF кат. № SUNBR1GHT® GS-020) тестируют в концентрации 1,5 или 3,0 моль %. После образования

ЛНЧ и инкапсуляции модифицированной мРНК G-CSF препараты ЛНЧ были охарактеризованы по размеру частиц, зета потенциалу и проценту инкапсуляции; результаты приведены в Табл. 47.

5

Таблица 47.

Характеристика препаратов ЛНЧ				
Препарат №	NPA-071-1	NPA-072-1	NPA-073-1	NPA-074-1
Липид	ПЭГ-ДМГ 1,5%	ПЭГ-ДМГ 3%	ПЭГ-ДСГ 1,5%	ПЭГ-ДСГ 3%
Средний размер	95 нм	85 нм	95 нм	75 нм
	ИПД: 0,01	ИПД: 0,06	ИПД: 0,08	ИПД: 0,08
Зета при pH 7,4	-1,1 мВ	-2,6 мВ	1,7 мВ	0,7 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	88%	89%	98%	95%

10

Б. Скрининг ЛНЧ ПЭГ in vivo

[00996] Препараты ЛНЧ ПЭГ, раскрытые в Табл. 40, вводят мышам (n=5) внутривенно в дозе 0,5 мг/кг. Сыворотку мышей собирают через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 8 дней после введения препарата. Сыворотку анализируют методом ТИФА для определения экспрессии белка G-CSF; уровни экспрессии приведены в Табл. 48. Препараты ЛНЧ с использованием ПЭГ-ДМГ приводят к значительно более высоким уровням экспрессии белка, чем препараты ЛНЧ с ПЭГ-ДСГ.

15

20

Таблица 48.

Экспрессия белка			
Липид	Препарат №	Время	Экспрессия белка (пг/мл)
ПЭГ-ДМГ, 1,5%	NPA-071-1	2 часа	114102
		8 часов	357944
		24 часа	104832
		48 часов	6697
		72 часа	980
		8 дней	0
пэг-дмг, 3%	NPA-072-1	2 часа	154079
		8 часов	354994
		24 часа	164311
		48 часов	13048
		72 часа	1182
		8 дней	13
пэг-дсг, 1,5%	NPA-073-1	2 часа	3193
		8 часов	6162
		24 часа	446
		48 часов	197
		72 часа	124
		8 дней	5
пэг-дсг, 3%	NPA-074-1	2 часа	259
		8 часов	567
		24 часа	258
		48 часов	160
		72 часа	328
		8 дней	33

25

30

35

40

Пример 27. Исследование препаратов на основе катионного липида

А. Получение и характеристика наночастиц на основе катионного липида

[00997] Липидные наночастицы (ЛНЧ) получают с применением способа шприцевого насоса. ЛНЧ получают с массовым соотношением 20:1 общего липида к модифицированной мРНК. Конечные интервалы молярного соотношения липидов для

45

катионного липида, ДСФХ, холестерина и ПЭГ-к-ДМПО кратко охарактеризованы в Табл. 49.

Таблица 49.				
Молярные соотношения				
	Катионный липид	ДСФХ	Холестерин	ПЭГ-к-ДМПО
Молярный процент (моль %)	50,0	10,0	38,5	1,5

[00998] 25 мМ раствор липида в этаноле и модифицированную РНК в 50 мМ растворе цитрата при рН 3 смешивают для достижения спонтанного образования пузырьков.

Пузырьки стабилизируются в этаноле, после чего этанол удаляют и проводят обмен буфера методом диализа. Затем ЛНЧ характеризуют по размеру частиц, зета потенциалу и проценту инкапсуляции. В Табл. 50 приведена характеристика ЛНЧ с инкапсулированной модифицированной мРНК ЭПО (SEQ ID NO: 9 хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) или модифицированной мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) с использованием ДЛин-МС3-ДМА, ДЛин-ДМА или С12-200 в качестве катионного липида.

Таблица 50.										
Характеристика препаратов на основе катионного липида										
Препарат №	NPA-071-1	NPA-072-1	NPA-073-1	NPA-074-1	NPA-075-1	NPA-076-1				
Липид	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-ДМА	ДЛин-ДМА	С12-200	С12-200				
	ЭПО	G-CSF					ЭПО	G-CSF	ЭПО	G-CSF
	Средний размер	89 нм					96 нм	70 нм	73 нм	97 нм
	ИПД: 0,07	ИПД: 0,08	ИПД: 0,04	ИПД: 0,06	ИПД: 0,05	ИПД: 0,09				
Зета при рН 7,4	-1,1 мВ	-1,4 мВ	-1,6 мВ	-0,4 мВ	1,4 мВ	0,9 мВ				
Инкапсуляция (RiboGreen)	100%	100%	99%	100%	88%	98%				

Б. Скрининг препаратов катионных ЛНЧ in vivo

[00999] Препараты составов на основе катионного липида, раскрытые в Табл. 42, вводят мышам (n=5) внутривенно в дозе 0,5 мг/кг. Сыворотку мышей собирают через 2 часа, 24 часа, 72 часа и/или 7 дней после введения препарата. Сыворотку анализируют методом ТИФА для определения экспрессии белка ЭПО или G-CSF; уровни экспрессии приведены в Табл. 51.

Таблица 51.			
Экспрессия белка			
Модифицированная мРНК	Препарат №	Время	Экспрессия белка (пг/мл)
ЭПО	NPA-071-1	2 часа	304190,0
		24 часа	166811,5
		72 часа	1356,1
		7 дней	20,3
ЭПО	NPA-073-1	2 часа	73852,0
ЭПО	NPA-075-1	24 часа	75559,7
		72 часа	130,8
		2 часа	413010,2
		24 часа	56463,8
G-CSF	NPA-072-1	2 часа	62113,1

		24 часа	53206,6
G-CSF	NPA-074-1	24 часа	25059,3
G-CSF	NPA-076-1	2 часа	219198,1
		24 часа	8470,0

5 [001000] Токсичность возникала у мышей, которым вводили препараты ЛНЧ на основе катионного липида С12-200 (NPA-075-1 и NPA-076-1), и их умерщвляли через 24 часа, поскольку у них возникали такие симптомы, как выпадение меха, съезживание и снижение массы тела более чем на 10%. Ожидалось, что С12-200 будет более токсичным, но при этом будет демонстрировать более высокий уровень экспрессии за короткий период. Катионный липид ДЛин-ДМА (NPA-073-1 и NPA-074-1) демонстрирует самый низкий уровень экспрессии из 3-х изученных катионных липидов. ДЛин-МС3-ДМА (NPA-071-1 и NPA-072-1) продемонстрировали достаточную экспрессию до 3-го дня, и уровень выше фонового до 7-го дня для препаратов ЭПО.

Пример 28. Способ скрининга на предмет экспрессии белка

15 А. Ионизация электрораспылением

[001001] Биологический образец, который может содержать белки, кодируемые введенной субъекту модифицированной РНК, получают и анализируют в соответствии с протоколом производителя для ионизации электрораспылением (ИЭР), с использованием 1, 2, 3 или 4 анализаторов массы. Кроме того, биологический образец может быть проанализирован с использованием системы тандемной масс-спектрометрии ИЭР.

[001002] Паттерны характеристики белковых фрагментов или цельных белков сравнивают с известными контрольными образцами для данного белка и устанавливают идентичность посредством сравнения.

25 Б. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

[001003] Биологический образец, который может содержать белки, кодируемые введенной субъекту модифицированной РНК, получают и анализируют в соответствии с протоколом производителя для матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ).

30 [001004] Паттерны характеристики белковых фрагментов или цельных белков сравнивают с известными контрольными образцами для данного белка, и устанавливают идентичность посредством сравнения.

В. Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия/масс-спектрометрия

35 [001005] Биологический образец, который может содержать белки, кодируемые введенной субъекту модифицированной РНК, может быть обработан ферментом трипсина для расщепления содержащихся в нем белков. Полученные пептиды анализируют методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии/масс-спектрометрии (ЖХ/МС/МС). Пептиды фрагментируют в масс-спектрометре с получением диагностических паттернов, которые могут быть сравнены с базами данных белковых последовательностей с помощью компьютерных алгоритмов. Расщепленный образец может быть разбавлен до концентрации исходного материала для данного белка 1 нг или менее. Биологические образцы, содержащие простой буферный разбавитель (например, воду или летучие соли), можно обрабатывать прямым расщеплением в раствор; более сложные разбавители (например, поверхностно-активное вещество, нелетучие соли, глицерин) требуют дополнительной стадии очистки для облегчения анализа образца.

45 [001006] Паттерны фрагментов белка или цельных белков, сравнивают с известными контрольными образцами для данного белка и устанавливают идентичность

посредством сравнения.

Пример 29. Исследования ЛНЧ *in vivo*

[001007] мРНК mCherry (SEQ ID NO: 14; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозин и псевдоуридин) вводят в липидную наночастицу (ЛНЧ) с применением способа шприцевого насоса. ЛНЧ получают с массовым соотношением 20:1 общего липида к модифицированной мРНК, с конечным молярным соотношением липидов 50:10:38,5:1,5 (ДЛин-КС2-ДМА:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-к-ДМПО). Препарат mCherry, приведенный в Табл. 52, охарактеризован размером частиц, зета потенциалом и инкапсуляцией.

Таблица 52.	
Препарат mCherry	
Препарат №	NPA-003-5
Модифицированная мРНК	mCherry
Средний размер	105 нм
	ИПД: 0,09
Зета при pH 7,4	1,8 мВ
Инкапсуляция. (RiboGreen)	100%

[001008] Препарат ЛНЧ вводят мышам (n=5) внутривенно в дозе модифицированной мРНК 100 мкг. Мышей умерщвляют через 24 часа после введения дозы. Печень и селезенку мышам, которым вводили препараты модифицированной мРНК mCherry, анализируют иммуногистохимическим методом (ИГХ), вестерн-блоттингом или флуоресцентно-активируемой клеточной сортировкой (ФАКС).

[001009] Гистологический анализ печени демонстрирует однородную экспрессию mCherry на срезе, в то время, как у нелеченных животных экспрессия mCherry отсутствует. Вестерн-блоты также используют для подтверждения экспрессии mCherry у леченных животных, притом, что mCherry не обнаружен у нелеченных животных. Тубулин используют в качестве контрольного маркера; он обнаруживается у леченных и нелеченных мышам, показывая, что нормальная экспрессия белка в гепатоцитах осталась незатронутой.

[001010] ФАКС и ИГХ также проводят на селезенке мышам, леченных mCherry, и нелеченных мышам. Все популяции лейкоцитарных клеток являются отрицательными для экспрессии mCherry по данным анализа ФАКС. ИГХ также не показывает видимых различий в селезенке между лечеными mCherry и нелечеными мышами.

Пример 30. Исследования *in vivo* препаратов, полученных с применением шприцевого насоса

[001011] Модифицированную мРНК mCherry вводят в липидную наночастицу (ЛНЧ) с применением способа шприцевого насоса. ЛНЧ получают с массовым соотношением 20:1 общего липида к модифицированной мРНК, с конечным молярным соотношением липидов 50:10:38,5:1,5 (ДЛин-КС2-ДМА:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-к-ДМПО). Препарат mCherry характеризуют по размеру частиц, зета потенциалу и инкапсуляции.

[001012] Препарат ЛНЧ вводят мышам (n=5) внутривенно в дозе модифицированной мРНК 10 или 100 мкг. Мышей умерщвляют через 24 часа после введения дозы. Печень и селезенку мышам, которым вводили препараты модифицированной мРНК mCherry, анализируют иммуногистохимическим методом (ИГХ), вестерн-блоттингом и/или флуоресцентно-активируемой клеточной сортировкой (ФАКС).

Пример 31. Экспрессия *in vitro* и *in vivo*

А. Экспрессия *in vitro* в клетках человека с применением липидоидных препаратов [001013] Соотношение ммРНК к липидоиду для тестирования с целью трансфекции *in vitro* исследуют эмпирически при различных соотношениях липидоид/ммРНК. В предыдущей работе с использованием миРНК и липидоидов использовали массовые соотношения липидоид/миРНК 2,5:1, 5:1, 10:1 и 15:1. С учетом большей длины ммРНК относительно миРНК, более низкое массовое соотношение липидоида к ммРНК может быть эффективным. Кроме того, для сравнения ммРНК также была введена в препарат с использованием пузырьков для доставки катионного липида RNAIMAX™ (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) или TRANSIT-мРНК (Minis Bio, Мэдисон, Висконсин).

10 Способность введенной в липидоид люциферазы (IVT кДНК последовательность дикого типа представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная заменой каждого цитозина 5-метилцитозином и каждого уридина псевдоуридином), зеленого флуоресцирующего белка (ЗФБ) (IVT кДНК последовательность дикого типа

15 представлена в SEQ ID NO: 17; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 18, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1), G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) и мРНК ЭПО (последовательность мРНК

20 представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) к экспрессии желательного белкового продукта может быть подтверждена люминесценцией для экспрессии люциферазы, проточной цитометрией для экспрессии ЗФБ и методом ТИФА для секреции G-CSF и эритропоэтина (ЭПО).

Б. Экспрессия *in vivo* после внутривенной инъекции

[001014] Системное внутривенное введение препаратов осуществляют с использованием различных липидоидов, в том числе, без ограничений, 98N12-5, C12-200 и MD1.

30 [001015] Липидоидные препараты, содержащие ммРНК, вводят внутривенно животным. Экспрессию кодируемых модифицированной мРНК (ммРНК) белков оценивают в образцах крови и/или других органов, таких как, без ограничений, печень и селезенка, полученные от животного. Проведение исследований с внутривенным введением одинарной дозы также позволяет оценить масштаб, зависимость от дозы и

35 длительность экспрессии желательного продукта.

[001016] В одном варианте реализации препараты на основе липидоидов 98N12-5, C12-200, MD1 и других липидоидов применяются для введения животному ммРНК люциферазы, зеленого флуоресцирующего белка (ЗФБ), флуоресцирующего белка mCherry, секретируемой щелочной фосфатазы (сЩФ), G-CSF человека, Фактора IX человека или эритропоэтина (ЭПО) человека. После введения ммРНК в липидный состав, как раскрыто выше, животных делят на группы для получения солевого раствора или липидоидного препарата, содержащего одну из нескольких ммРНК, выбранных из люциферазы, ЗФБ, mCherry, сЩФ, G-CSF человека, Фактора IX человека и ЭПО человека. Перед инъекцией животному, содержащий ммРНК липидоидный препарат

45 разбавляют ФБР. Далее животным вводят одинарные дозы ммРНК-содержащего состава в интервале дозы от 10 мг/кг до всего 1 нг/кг, с предпочтительным интервалом 10-100 нг/кг, причем дозы ммРНК зависят от массы тела животного, например мышью массой 20 г получает не более 0,2 мл препарата (доза рассчитывается как ммРНК на

кг массы тела). После введения ммРНК-липидоидного препарата, получают сыворотку, ткани и/или лизаты тканей, и уровень кодируемого ммРНК продукта определяют как единичное значение и/или интервал временных промежутков. Способность введенной в липидоид ммРНК люциферазы, ЗФБ, mCherry, сЩФ, G-CSF, Фактора IX и ЭПО экспрессировать желательный белковый продукт подтверждают люминесценцией для экспрессии люциферазы, проточной цитометрией для экспрессии ЗФБ и экспрессии mCherry, ферментной активностью для сЩФ или методом ТИФА для секреции G-CSF, Фактора IX и/или ЭПО.

[001017] Далее проводили исследования многодозовой схемы с целью определения максимальной экспрессии ммРНК, для оценки насыщаемости управляемой ммРНК экспрессии (посредством введения контрольного и активного препарата ммРНК, параллельно или последовательно) и определения возможности повторного введения лекарственного средства (посредством введения доз ммРНК с промежутком в недели или месяцы, с последующим определением зависимости уровня экспрессии от таких факторов, как иммуногенность). Оценку физиологической функции белков, таких как G-CSF и ЭПО, также осуществляют путем анализа образцов, полученных от исследуемого животного, с определением увеличения количества гранулоцитов и эритроцитов, соответственно. Активность экспрессированного белкового продукта, такого как Фактор IX, в организме животных, также может быть оценена путем анализа ферментной активности Фактора IX (например, определение частичного тромбопластинового времени) и влияния на время образования тромба.

В. Экспрессия *in vitro* после внутримышечной и/или подкожной инъекции

[001018] Применение липидоидных препаратов для доставки олигонуклеотидов, в том числе, мРНК, путем внутримышечной или подкожной инъекции нуждается в оценке, поскольку о нем ранее не сообщалось. Внутримышечную и/или подкожную инъекцию ммРНК оценивают для определения способности ммРНК-содержащих липидоидных препаратов приводить к локальной и системной экспрессии желательных белков.

[001019] Липидоидные препараты 98N12-5, C12-200 и MD1, содержащие ммРНК, выбранную из ммРНК люциферазы, зеленого флуоресцирующего белка (ЗФБ), флуоресцирующего белка mCherry, секретлируемой щелочной фосфатазы (сЩФ), G-CSF человека, фактора IX человека или эритропоэтина (ЭПО) человека, вводят животным внутримышечной и/или подкожной инъекцией. Экспрессию кодируемых ммРНК белков оценивают в мышце или подкожной ткани и системно - в крови и других органах, таких как печень и селезенка. Исследования с введением одинарной дозы позволяют оценить масштаб, зависимость от дозы и длительность экспрессии желательного продукта.

[001020] Животных делят на группы для получения солевого раствора или препарата, содержащего модифицированную мРНК. Перед инъекцией ммРНК-содержащие липидоидные препараты разбавляют ФБР. Животным вводят внутримышечно одинарную дозу ммРНК-содержащего препарата в дозе ммРНК от 50 мг/кг до всего 1 ж/кг, с предпочтительным интервалом от 10 мг/кг до 100 нг/кг. Максимальные дозы для внутримышечного введения мышце грубо составляют 1 мг ммРНК или всего 0,02 нг ммРНК для внутримышечной инъекции в заднюю конечность мышцы. В случае подкожного введения, животным вводят подкожно одинарную дозу ммРНК-содержащего препарата с дозой ммРНК, варьирующей от 400 мг/кг до всего 1 нг/кг, с предпочтительным интервалом от 80 мг/кг до 100 нг/кг. Максимальные дозы для подкожного введения мышце грубо составляют 8 мг ммРНК или всего 0,02 нг ммРНК.

[001021] Для мышца массой 20 г объем одной внутримышечной инъекции составляет не более 0,025 мл и одной подкожной инъекции - не более 0,2 мл. Оптимальные дозы

ммРНК для введения вычисляют на основе массы тела животного. В различных временных точках после введения ммРНК-липидоида, получают сыворотку, ткани и лизаты тканей, и определяют уровень кодируемого ммРНК продукта. Способность введенной в липидоид ммРНК люциферазы, зеленого флуоресцирующего белка (ЗФБ), флуоресцирующего белка mCherry, секретрируемой щелочной фосфатазы (сЩФ), G-CSF человека, фактора IX человека или эритропоэтина (ЭПО) человека экспрессировать желательный белковый продукт подтверждают люминесценцией для экспрессии люциферазы, проточной цитометрией для экспрессии ЗФБ и mCherry, ферментной активностью для сЩФ и методом ТИФА для секреции G-CSF, Фактора IX и эритропоэтина (ЭПО).

[001022] Дополнительные исследования многодозовой схемы проводят с целью определения максимальной экспрессии при использовании ммРНК, для оценки насыщаемости управляемой ммРНК экспрессии (посредством введения контрольного и активного препарата ммРНК, параллельно или последовательно) и определения возможности повторного введения лекарственного средства (посредством введения доз ммРНК с промежутком в недели или месяцы, с последующим определением зависимости уровня экспрессии от таких факторов, как иммуногенность). Исследования с подкожным или внутримышечным введением в несколько мест инъекции в одно и то же время также используются для дополнительного увеличения системного контакта с лекарственным средством ммРНК и повышения выработки белка. Оценку физиологической функции белков, таких как ЗФБ, mCherry, сЩФ, G-CSF человека, фактор IX человека и ЭПО человека, осуществляют путем анализа образцов, полученных от исследуемых животных, с определением изменения количества гранулоцитов и эритроцитов. Активность экспрессированного белкового продукта, такого как Фактор IX, в организме животных, также может быть оценена путем анализа ферментной активности Фактора IX (например, определение частичного тромбопластинового времени) и влияния на время образования тромба.

Пример 32: Доставка in vivo с использованием липоплексов

А. Липоплекс модифицированной РНК ЭПО человека

[001023] Препарат, содержащий 100 мкг модифицированной мРНК эритропоэтина (ЭПО) человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) (ЭПО; полностью модифицированная 5-метилцитозинном; N1-метилпсевдоуридином) в липоплексе с использованием 30% об/об RNAIMAX™ (Липоплекс-h-Epo-46; Поколение 2 или Gen2) в 50-70 мкл, вводят внутримышечно 4-м мышам C57/BL6. Другие группы включают мышей, получающих инъекцию введенной в липоплекс модифицированной мРНК люциферазы (Липоплекс-luc) (IVT последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин), которая служит контролем и содержит 100 мкг модифицированной мРНК люциферазы, введенной в липоплекс с использованием 30% об/об RNAIMAX™, или мышей, получающих инъекцию буферного препарата в качестве отрицательного контроля в объеме дозы 65 мкл. Через 13 часов после внутримышечной инъекции, получают сыворотку от каждой мыши для измерения количества белка ЭПО человека в сыворотке мыши методом чувствительного к ЭПО человека ТИФА; результаты приведены в Табл. 53.

Таблица 53.

Выработка ЭПО человека (в/м инъекция)					
Препарат	Мышь №1	Мышь №2	Мышь №3	Мышь №4	Среднее значение
Липоплекс-h-Epo-46	189,8	92,55	409,5	315,95	251,95
Липоплекс-Luc	0	0	0	0	0
Буферный препарат	0	0	0	0	0

Б. Липоплекс модифицированной РНК G-CSF человека

[001024] Препарат, содержащий 100 мкг одной из двух версий модифицированной мРНК G-CSF человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) (мРНК G-CSF полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином (G-CSF), или мРНК G-CSF полностью модифицирована 5-метилцитозином и N1-метил-псевдоуридином (G-CSF-N1)), введенной в липоплекс с использованием 30% об/об RNAIMAX™, вводят в объеме 150 мкл внутримышечно (в/м), в объеме 150 мкл подкожно (п/к) и в объеме 225 мкл внутривенно (в/в) мышам C57/BL6.

[001025] Трех контрольным группам вводят 100 мкг модифицированной мРНК люциферазы (IVT последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин) внутримышечно (Luc-unsp в/м) или 150 мкг модифицированной люциферазы мРНК внутривенно (Luc-unsp в/м) или 150 мкл буферного препарата внутримышечно (Буфер в/м). Через 6 часов после введения препарата, получают сыворотку от каждой мыши для измерения количества белка G-CSF человека в сыворотке мыши методом чувствительного к G-CSF человека ТИФА; результаты приведены в Табл. 54.

[001026] Полученные результаты демонстрируют, что модифицированные 5-метилцитозином/псевдоуридином и 5-метилцитозином/N1-метилпсевдоуридином мРНК G-CSF человека могут приводить к специфичной экспрессии белка G-CSF человека в сыворотке, при в/в или в/м введении в липоплексном препарате.

G-CSF человека в сыворотке (введение в/м, в/в, п/к инъекцией)		
Препарат	Способ	G-CSF (пг/мл)
G-CSF	в/м	85,6
G-CSF N1	в/м	40,1
G-CSF	п/к	3,9
G-CSF N1	п/к	0,0
G-CSF	в/м	31,0
G-CSF N1	в/м	6,1
Luc-unsp	в/м	0,0
Luc-unsp	в/м	0,0
Буфер	в/м	0,0

В. Сравнение липоплексов модифицированной РНК G-CSF человека

[001027] Препарат, содержащий 100 мкг липоплекса модифицированной мРНК G-CSF человека, полученного с использованием 30% об/об RNAIMAX™, с модификацией 5-метилцитозином (5 mc) и псевдоуридином (ψ) (G-CSF-Gen1-липopleкс), модифицированной мРНК G-CSF человека, с модификацией 5 mc и ψ, в солевом растворе (G-CSF-Gen1-солевой раствор), липоплекса модифицированной мРНК G-CSF человека с модификацией N1-5-метилцитозином (N1-5 mc) и ψ, полученного с использованием

30% об/об RNAIMAX™ (G-CSF-Gen2-липоплекс), модифицированной мРНК G-CSF человека, с модификацией N1-5 тс и ψ, в солевом растворе (G-CSF-Gen2-солевой раствор), липоплекса модифицированной мРНК люциферазы с модификацией 5 тс и ψ, полученного с использованием 30% об/об RNAIMAX™ (Luc-липоплекс) или модифицированной мРНК люциферазы, с модификацией 5 тс и ψ, в солевом растворе (Luc-солевой раствор) вводят внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам C57/BL6, и контрольная группа для каждого способа введения получает дозу 80 мкл буферного препарата (Ф. Буфер). Через 13 часов после инъекции получают сыворотку и ткань из места инъекции от каждой мыши и анализируют методом чувствительного к G-CSF ТИФА для сравнения уровней белка G-CSF человека. Результаты определения белка G-CSF человека в сыворотке мыши после внутримышечного и подкожного введения приведены в Табл. 55.

[001028] Полученные результаты демонстрируют, что модифицированные 5-метилцитозином/псевдоуридином и 5-метилцитозином/N1-метилпсевдоуридином мРНК G-CSF человека могут приводить к специфичной экспрессии белка G-CSF человека в сыворотке, при в/м или п/к введении, в солевом растворе или в липоплексном препарате. Как проиллюстрировано в Табл. 55, модифицированная 5-метилцитозином/N1-метилпсевдоуридином мРНК G-CSF человека, в общем, демонстрирует повышенную выработку белка G-CSF человека, по сравнению с модифицированной 5-метилцитозином/псевдоуридином мРНК G-CSF человека.

Таблица 55.		
Белок G-CSF человека в сыворотке мыши		
Препарат	G-CSF (пг/мл)	
	в/м инъекция	п/к инъекция
G-CSF-Gen1-липоплекс	13,988	42,855
G-CSF-Gen1-солевой раствор	9,375	4,614
G-CSF-Gen2-липоплекс	75,572	32,107
G-C8P-Gen2-солевой раствор	20,190	45,024
Luc липоплекс	0	3,754
Luc солевой раствор	0,0748	0
Ф. Буфер	4,977	2,156

Г. Сравнение липоплексов модифицированной РНК mCherry Внутримышечное и подкожное введение

[001029] Липоплексный препарат, содержащий 100 мкг модифицированной мРНК mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полученного с использованием 30% об/об RNAIMAX™, или модифицированную мРНК mCherry в солевом растворе вводят мышам внутримышечно и подкожно. Буферный препарат также вводят контрольной группе мышей внутримышечно или подкожно. Образцы из места инъекции у мышей могут быть отобраны через 17 час после инъекции для получения срезов и определения типа(ов) клеток, ответственных за выработку белка.

Введение в стекловидное тело

[001030] Липоплексный препарат, содержащий 10 мкг модифицированной мРНК mCherry, полученный с использованием RNAIMAX™, модифицированную мРНК mCherry в буферном препарате, модифицированную мРНК люциферазы в липоплексе, полученном с использованием РНКМАХ™, модифицированную мРНК люциферазы в буферном препарате можно вводить крысам инъекцией в стекловидное тело (ИСТ) в объеме дозы 5 мкл/глаз. Буферный препарат также вводят посредством ИСТ

контрольной группе крыс в объеме дозы 5 мкл/глаз. Глаза леченных крыс могут быть извлечены через 18 часов после инъекции для получения срезов и лизиса с целью определения возможности эффективной доставки мРНК *in vivo* в глаз и последующей выработки белка, а также для определения типа(ов) клеток, ответственных за выработку белка *in vivo*.

Интраназальное введение

[001031] Липоплексный препарат, содержащий 100 мкг модифицированной мРНК mCherry, полученный с использованием 30% об/об RNAiMAX™, модифицированную мРНК mCherry в солевом растворе, модифицированную мРНК люциферазы в липоплексе, полученном с использованием 30% об/об RNAiMAX™, или модифицированную мРНК люциферазы в солевом растворе вводят интраназально. Буферный препарат также вводят контрольной группе интраназально. Легкие могут быть извлечены приблизительно через 13 часов после инсталляции для получения срезов (у животных, получавших мРНК mCherry) или гомогенизации (у животных, получавших мРНК люциферазы). Полученные образцы будут использоваться для определения возможности эффективной доставки мРНК *in vivo* в легкие и последующей выработки белка, а также для определения типа(ов) клеток, ответственных за выработку белка *in vivo*.

Пример 33: Доставка *in vivo* с использованием различных соотношений липидов

[001032] Модифицированную мРНК вводят мышам C57/BL6 для оценки различных соотношений липидов и результирующей экспрессии белка. Препараты липоплекса, содержащие 100 мкг модифицированной мРНК ЭПО человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином), полученные с использованием 10%, 30% или 50% RNAiMAX™, 100 мкг модифицированной люциферазы мРНК (IVT последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин), полученные с использованием 10%, 30% или 50% RNAiMAX™, или буферный препарат вводят внутримышечно мышам в виде одинарной дозы 70 мкл. Сыворотку получают через 13 часов после инъекции для анализа методом чувствительного к ЭПО человека ТИФА и определения уровня белка ЭПО человека у каждой мыши. Результаты анализа ЭПО человека методом ТИФА приведены в Табл. 56 и демонстрируют, каким образом модифицированный ЭПО человека, экспрессирующийся в мышце, выделяется в сыворотку для каждого процентного содержания RNAiMAX™.

Таблица 56.

Белок ЭПО человека в сыворотке мыши (в/м инъекция)	
Препарат	ЭПО (нг/мл)
ЭПО+10% RNAiMAX	11,4
Люцифераза+10% RNAiMAX	0
ЭПО+30% RNAiMAX	27,1
Люцифераза+30% RNAiMAX	0
ЭПО+50% RNAiMAX	19,7
Люцифераза+50% RNAiMAX	0
Ф. Буфер	0

Пример 34: Внутримышечное и Подкожное введение млекопитающим *in vivo*

[001033] Модифицированную мРНК ЭПО человека (последовательность мРНК

представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) в буферном препарате вводят мышам С57/BL6 или крысам Спрег-Доули для оценки влияния дозы на выработку ЭПО человека. Крысам вводят внутримышечной инъекцией 50 мкл модифицированной мРНК ЭПО человека (h-ЕРО), модифицированной мРНК люциферазы (Luc) (IVT последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин) или буферный препарат (Ф. Буфер), как раскрыто в схеме введения Табл. 57.

[001034] Мышам вводят внутримышечной или подкожной инъекцией 50 мкл модифицированной мРНК ЭПО человека (h-ЕРО), модифицированной мРНК люциферазы (Люцифераза) или буферного препарата (Ф. Буфер), как раскрыто в схеме введения Табл. 58. Через 13 часов после инъекции кровь собирают, и сыворотку анализируют для определения количества ЭПО человека в организме каждой мыши или крысы. Среднее значение и геометрическое среднее в пг/мл для исследования на крысах также приведены в Табл. 57.

Таблица 57.					
Исследование на крысах					
	Группа	Доза	Среднее значение, пг/мл	Геометрическое среднее, пг/мл	
	h-ЕРО	G №1	150 мкг	67,7	67,1
	h-ЕРО	G №2	100 мкг	79,4	66,9
	h-ЕРО	G №3	50 мкг	101,5	85,4
	h-ЕРО	G №4	10 мкг	46,3	31,2
	h-ЕРО	G №5	1 МКТ	28,7	25,4
	Люцифераза	G №6	100 мкг	24,5	22,4
	Ф. Буфер	G №7	-	18,7	18,5
Таблица 58.					
Исследование на мышах					
Способ введения	Препарат	Группа	Доза	Средний уровень в сыворотке, пг/мл	
В/м	h-ЕРО	1	100 мкг	96,2	
В/м	h-ЕРО	2	50 мкг	63,5	
В/м	h-ЕРО	3	25 мкг	18,7	
В/м	h-ЕРО	4	10 мкг	25,9	
В/м	h-ЕРО	5	1 мкг	2,6	
В/м	Люцифераза	6	100 мкг	0	
В/м	Ф. Буфер	7	-	1,0	
П/к	h-ЕРО	1	100 мкг	72,0	
П/к	Люцифераза	2	100 мкг	26,7	
П/к	Ф. Буфер	3	-	17,4	

Пример 35: Длительность действия после внутримышечного введения *in vivo*

[001035] Модифицированную мРНК ЭПО человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) в буферном препарате вводят крысам Спрег-Доули для определения продолжительности ответа. Крысам вводили внутримышечной инъекцией 50 мкл модифицированной мРНК ЭПО человека (h-ЕРО), модифицированной мРНК люциферазы (IVT кДНК последовательность представлена в SEQ ID NO: 15;

последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин) (Люцифераза) или буферный препарат (Ф. Буфер), как раскрыто в схеме введения Табл. 59. У крыс отбирают образцы крови через 2, 6, 12, 24, 48 и 72 часа после внутримышечной инъекции для определения концентрации ЭПО человека в сыворотке в указанной временной точке. Среднее значение и геометрическое среднее в пг/мл для данного исследования также приведены в Табл. 59.

Таблица 59.

Схема введения					
	Группа	Доза	Среднее значение, пг/мл	Геометрическое среднее, пг/мл	
	h-EPO	2 часа	100 мкг	59,6	58,2
	h-EPO	6 часов	100 мкг	68,6	55,8
	h-EPO	12 часов	100 мкг	87,4	84,5
	h-EPO	24 часа	100 мкг	108,6	95,3
	h-EPO	48 часов	100 мкг	77,9	77,0
	h-EPO	72 часа	100 мкг	80,1	75,8
	Люцифераза	24, 48 и 72 часа	100 мкг	37,2	29,2
	Ф. Буфер	24, 48 и 72 часа	-	48,9	10,4

Пример 36: Способы введения

[001036] Были проведены исследования введения разделенных доз с использованием различных способов введения. Исследования с несколькими местами подкожных или внутримышечных инъекций в одно и то же время были спроектированы и проведены с целью изучения способов повышения системного контакта с лекарственным средством ммРНК и повышения эффективности выработки белка. В дополнение к обнаружению экспрессированного белкового продукта, проводилась оценка физиологической функции белков посредством анализа образцов, полученных от экспериментальных животных.

[001037] Неожиданно, было обнаружено, что введение ммРНК в виде разделенных доз приводит к повышению выработки белка и фенотипических ответов, по сравнению со схемами введения одинарной или нескольких доз.

[001038] Был спроектирован эксперимент с введением разделенных доз, с использованием ммРНК эритропоэтина (ЭПО) человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) или ммРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) только в буферном растворе или в 30% липоплексе (RNAIMAX™). Доза растворителя (буферный препарат) содержит 150 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ Na⁺-фосфата (1,4 мМ одноосновного натрия фосфата; 0,6 мМ двухосновного натрия фосфата) и 0,5 мМ ЭДТА, pH 6,5. Проводят коррекцию pH с помощью натрия гидроксида и конечный раствор стерилизуют фильтрацией. ммРНК модифицирована заменой каждого цитозина на 5 меС и каждого уридина на псевдоуридин.

[001039] Группы из 4 мышей получают внутримышечные (в/м), внутривенные (в/м) или подкожные (п/к) инъекции в соответствии с расписанием, кратко приведенным в Табл. 60. Сыворотку всех мышей собирают через 13 час после инъекции, в группах внутримышечного и подкожного введения отбирают образцы ткани из места инъекции,

и селезенку, печень и почки извлекают у животных из группы внутривенного введения. Результаты для групп внутримышечного и подкожного введения приведены в Табл. 61.

5 Таблица 60.

Схема введения					
Группа	Препарат	Способ введения	Доза мРНК	Общая доза	Растворитель
1	Липоплекс-ммРНК ЭПО человека	в/м	4×100 мкг+30% Липоплекс	4×70 мкл	Липоплекс
2	Липоплекс-ммРНК ЭПО человека	в/м	4×100 мкг	4×70 мкл	Буферный раствор
3	Липоплекс-ммРНК ЭПО человека	п/к	4×100 мкг+30% Липоплекс	4×70 мкл	Липоплекс
4	Липоплекс-ммРНК ЭПО человека	п/к	4×100 мкг	4×70 мкл	Буферный раствор
5	Липоплекс-ммРНК ЭПО человека	в/м	200 мкг+30% Липоплекс	140 мкл	Липоплекс
6	ммРНК люциферазы-липоплекс	в/м	100 мкг+30% Липоплекс	4×70 мкл	Липоплекс
7	ммРНК люциферазы-липоплекс	в/м	100 мкг	4×70 мкл	Буферный раствор
8	ммРНК люциферазы-липоплекс	п/к	100 мкг+30% Липоплекс	4×70 мкл	Липоплекс
9	ммРНК люциферазы-липоплекс	п/к	100 мкг	4×70 мкл	Буферный раствор
10	ммРНК ЭПО человека-липоплекс	в/м	200 мкг+30% Липоплекс	140 мкл	Липоплекс
11	Буферный препарат	в/м	4 × несколько ДОЗ	4×70 мкл	Буферный раствор

25 Таблица 61.

Белок ЭПО человека в сыворотке мыши (в/м введение)		
Препарат	ЭПО (пг/мл)	
	введение в/м инъекцией	введение п/к инъекцией
ЭПО-липоплекс	67,115	2,154
Люцифераза-липоплекс	0	0
ЭПО-раствор соли	100,891	11,37
Люцифераза-раствор соли	0	0
Буферный препарат	0	0

Пример 37. Исследования быстро элиминирующей липидной наночастицы (бЭЛНЧ) А. Препарат бЭЛНЧ модифицированной РНК

35 [001040] Растворы синтезированного липида, 1,2-дистеароил-3-фосфатидилхолина (ДСФХ) (Avanti Polar Lipids, Алабастер, Аляска), холестерин (Sigma-Aldrich, Тауфкирхен, Германия) и α -[3'-(1,2-димиристоил-3-пропанокси)-карбоксамид-пропил]- ω -метоксиполиоксиэтилена (ПЭГ-к-ДМПО) (NOF, Бувельван, Бельгия) получают и хранят при -20°C. Синтезированный липид выбирают из ДЛин-ДМА со внутренним эфиром, ДЛин-ДМА с концевым эфиром, ДЛин-МС3-ДМА-внутреннего эфира и ДЛин-МС3-ДМА с концевым эфиром. бЭЛНЧ объединяют с получением молярного соотношения 50:10: 40 38,5:1,5 (бЭЛНЧ:ДСФХ:холестерин:ПЭГ-к-ДМПО). Препараты бЭЛНЧ и модифицированной мРНК получают комбинацией раствора липида с раствором модифицированной мРНК при массовом соотношении общего липида к модифицированной мРНК 10:1, 15:1, 20:1 и 30:1.

45 Б. Характеристика препаратов

[001041] Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания) используют для определения размера частиц, индекса полидисперсности (ИПД) и зета потенциала наночастиц модифицированной мРНК в

1 x ФБР для определения размера частиц и 15 mM ФБР для определения зета потенциала.

[001042] Спектроскопию в УФ-видимой области применяют для определения концентрации препарата наночастиц модифицированной мРНК. После смешивания, регистрируют спектр поглощения раствора в области от 230 нм до 330 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Бреа, Калифорния). Концентрацию модифицированной РНК в препарате наночастиц вычисляют на основе коэффициента экстинкции модифицированной РНК, используемой в составе, и разницы между оптической плотностью на длине волны 260 нм и фоновым значением на длине волны 330 нм.

[001043] Анализ РНК QUANT-IT™ R1BOGREEN® (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) применяют для оценки инкапсуляции модифицированной РНК в наночастицы. Образцы разбавляют, переносят на 96-луночный планшет из полистирола, затем добавляют 50 мкл буфера ТЭ или 50 мкл 2% раствора Тритона X-100. Планшет инкубируют, реагент R1BOGREEN® разбавляют в буфере ТЭ, и полученный раствор добавляют в каждую лунку. Интенсивность флуоресценции измеряют с использованием устройства для считывания флуоресценции для планшетов (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Уолтхэм, Массачусетс). Значения флуоресценции холостого раствора реактива вычитают из значений для каждого образца, и процент свободной модифицированной РНК определяют путем деления интенсивности флуоресценции интактного образца на значение флуоресценции образца с нарушенной структурой.

В. Инкубация *in vitro*

[001044] Эпителиальные клетки почки эмбриона человека (HEK293) и эпителиальные клетки гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) (LGC standards GmbH, Везель, Германия) высевают на 96-луночные планшеты (Greiner Bio-one GmbH, Фриккенхаузен, Германия) и планшеты для клеток HEK293 предварительно покрывают коллагеном типа 1. HEK293 высевают с плотностью приблизительно 30000, и HepG2 высевают с плотностью приблизительно 35000 клеток на лунку в 100 мкл питательной среды для клеток. Препараты, содержащие мРНК mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов на показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1); добавляют непосредственно после высевания клеток и инкубируют. кДНК mCherry, содержащая промотор Т7, 5' нетранслируемый участок (НТУ) и 3' НТУ, которую используют для транскрипции *in vitro* (IVT), представлена в SEQ ID NO: 8.

[001045] Клетки собирают посредством переноса супернатантов питательных сред на 96-луночный планшет Pro-Bind с U-образным дном (Beckton Dickinson GmbH, Гейдельберг, Германия). Клетки трипсинизируют с помощью Уг объема трипсина/ЭДТА (Biochrom AG, Берлин, Германия), объединяют в пул с соответствующими супернатантами и фиксируют добавлением 1 объема ФБР/2% СТЭ (оба производства Biochrom AG, Берлин, Германия)/0,5% формальдегида (Merck, Дармштадт, Германия). Далее образцы помещают для измерения на проточном цитометре с возбуждающим лазером и фильтром для ПЭ-техасского красного в цитометре LSR II (Beckton Dickinson GmbH, Гейдельберг, Германия). Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) для всех событий и стандартное отклонение для 4-х независимых лунок представлены для проанализированных образцов.

Г. Исследование препаратов *in vivo*

[001046] Мышам вводят внутривенно одинарные дозы препарата, содержащего модифицированную мРНК и бЭЛНЧ. Модифицированную мРНК для введения мышам выбирают из G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост

поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), Фактора IX (мРНК представлена в SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) или mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной

5 приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1).
 [001047] Мышам инъекционно вводят 100 мкг, 10 мкг или 1 мкг модифицированной мРНК в составе препарата, и животных умерщвляют через 8 часов после введения им препарата. Сыворотку мышей, которым вводили препарат, содержащий модифицированную мРНК G-CSF человека, анализируют методом чувствительного к
 10 G-CSF ТИФА, и сыворотку мышей, которым вводили модифицированную РНК Фактора IX человека, анализируют методом чувствительного к Фактору IX ТИФА или проводят хромогенную пробу. Печень и селезенку мышей, которым вводили модифицированную мРНК mCherry, анализируют иммуногистохимическим (ИГХ) методом или флуоресцентно-активируемой клеточной сортировкой (ФАКС). В качестве контроля
 15 используют группу мышей, которым не вводили инъекционно ни одного препарата; сыворотку и образцы тканей указанных животных собирают и анализируют методом ТИФА, ФАКС и/или ИГХ.

Пример 38. Трансфекция VEGF-A in vitro

[001048] Модифицированной мРНК фактора роста сосудистого эндотелия человека-изоформу А (VEGF-A) (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 19; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) трансфицируют методом обратной трансфекции клетки кератиноцитов человека в 24-луночных планшетах. кДНК VEGF-A, содержащая промотор T7, 5' нетранслируемый участок (НТУ) и 3' НТУ, которую используют для транскрипции in
 20 vitro (IVT), представлена в SEQ ID NO: 20. Клетки кератиноцитов человека культивируют в среде EPILIFE® с добавлением S7 производства Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) до достижения слияния 50-70%. Клетки трансфицируют 0, 46,875, 93,75, 187,5, 375, 750 и 1500 нг модифицированной мРНК (ммРНК), кодирующей VEGF-A, которая находится в комплексе с RNAIMAX™ производства Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Комплекс
 30 РНК/RNAIMAX™ образуется в результате инкубации РНК со средой EPILIFE® без добавок в объеме 5 × разведения на протяжении 10 минут при комнатной температуре. Во втором флаконе, реактив RNAIMAX™ инкубируют со средой EPILIFE® без добавок в объеме 10 × разведения на протяжении 10 минут при комнатной температуре. Далее смешивают содержимое флакона РНК с содержимым флакона RNAIMAX™ и
 35 инкубируют в течение 20-30 минут при комнатной температуре, после чего по каплям добавляют к клеткам.

[001049] Полностью оптимизированной мРНК, кодирующей VEGF-A (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 19; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1),
 40 трансфицируют клетки кератиноцитов человека, включая модификации в ходе трансляции, такие как природные нуклеозидтрифосфаты (НТФ), псевдоуридин вместо каждого уридина, и 5-метилцитозин вместо каждого цитозина (псевдо-U/5 mC) и N1-метил-псевдоуридин вместо каждого уридина и 5-метилцитозин вместо каждого цитозина (N1-метил-псевдо-U/5 mC). Клетки трансфицируют ммРНК, кодирующей VEGF-A, и концентрации секретированного VEGF-A (пг/мл) в питательной среде измеряют через
 45 6, 12, 24 и 48 часов после трансфекции для каждой концентрации с помощью набора ТИФА производства Invitrogen (Карлсбад, Калифорния), следуя инструкциям и рекомендациям производителя. Полученные данные, приведенные в Табл. 62,

демонстрируют, что модифицированная мРНК, кодирующая VEGF-A, способна к трансляции в клетках кератиноцитов человека, и что VEGF-A транспортируется из клеток наружу и высвобождается во внеклеточную среду.

5 Таблица 62.

Дозы VEGF-A и секреция белка				
Доза VEGF-A, содержащего природные НТФ				
Доза (нг)	6 часов (пг/мл)	12 часов (пг/мл)	24 часа (пг/мл)	48 часов (пг/мл)
46,875	10,37	18,07	33,90	67,02
93,75	9,79	20,54	41,95	65,75
187,5	14,07	24,56	45,25	64,39
375	19,16	37,53	53,61	88,28
750	21,51	38,90	51,44	61,79
1500	36,11	61,90	76,70	86,54
Доза VEGF-A, содержащего псевдо-U/5 мС				
Доза (нг)	6 часов (пг/мл)	12 часов (пг/мл)	24 часа (пг/мл)	48 часов (пг/мл)
46,875	10,13	16,67	33,99	72,88
93,75	11,00	20,00	46,47	145,61
187,5	16,04	34,07	83,00	120,77
375	69,15	188,10	448,50	392,44
750	133,95	304,30	524,02	526,58
1500	198,96	345,65	426,97	505,41
Доза VEGF-A, содержащего N1-метил-псевдо-U/5 мС				
Доза (нг)	6 часов (пг/мл)	12 часов (пг/мл)	24 часа (пг/мл)	48 часов (пг/мл)
46,875	0,03	6,02	27,65	100,42
93,75	12,37	46,38	121,23	167,56
187,5	104,55	365,71	1025,41	1056,91
375	605,89	1201,23	1653,63	1889,23
750	445,41	1036,45	1522,86	1954,81
1500	261,61	714,68	1053,12	1513,39

Пример 39. Исследования Фактора IX in vivo

30 [001050] ммРНК Фактора IX человека (Gen1; полностью модифицированная 5-метуцитозинном и псевдоуридином) в буферном препарате вводят мышам внутримышечной инъекцией. Результаты демонстрируют, что, по данным измерений, уровень белка Фактора IX в сыворотке повышен через 13 часов после введения.

35 [001051] В данном исследовании мышам (N=5 для Фактора IX, N=3 для Люциферазы или контрольного буферного раствора) вводили внутримышечной инъекцией 50 мкл ммРНК Фактора IX (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), Люциферазы (IVT последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, 40 полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин) или буферного препарата (Ф. Буфер) в дозе 2×100 мкг/мышь. У мышей отбирают образцы крови через 13 часов после внутримышечной инъекции для определения концентрации человеческого полипептида в сыворотке (пг/мл). Результаты демонстрируют, что введение ммРНК Фактора IX приводит к уровню 45 1600 пг/мл через 13 часов, по сравнению менее 100 пг/мл Фактора IX в случае введения Люциферазы или контрольного буферного раствора.

Пример 40. Введение в несколько участков: внутримышечно и подкожно

[001052] Модифицированную мРНК G-CSF человека (последовательность мРНК

представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), содержащую модификации Gen1 или Gen2 (модификация 5-метилцитозином (5 mc) и псевдоуридином (ψ), G-CSF-Gen1; или модификация N1-5-метилцитозином (N1-5 mc) и ψ , G-CSF-Gen2), в буферном препарате вводят мышам внутримышечной (в/м) или подкожной (п/к) инъекцией. Инъекционно вводят 4 дозы или 2×50 мкг (в два участка) в день в течение 3-х дней (промежуток 24 часа). Четвертую дозу вводят за 6 часов до отбора образцов крови и анализа полной формулы крови. Контрольные животные получают люциферазу (IVT последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин) или буферный препарат (Ф. Буфер). У мышей отбирают образцы крови через 72 часа после первой инъекции мРНК (через 6 часов после последней дозы мРНК) для определения влияния кодируемого мРНК G-CSF человека на количество нейтрофилов. В Табл. 63 показана схема введения и результаты подсчета нейтрофилов (тыс/мкл). В Табл. 63 звездочка (*) указывает на статистическую значимость с $p < 0,05$.

[001053] Для внутримышечного введения данные показывают 4-кратное увеличение количества нейтрофилов по сравнению с уровнем контроля на 3-й день для мРНК Gen1 G-CSF и 2-кратное увеличение для мРНК Gen2 G-CSF. Для подкожного введения, данные показывают 2-кратное увеличение количества нейтрофилов по сравнению с уровнем контроля на 3-й день для мРНК Gen2 G-CSF.

[001054] Полученные данные демонстрируют, что мРНК, модифицированные 5-метилцитидином/псевдоуридином и 5-метилцитидином/N1-метилпсевдоуридином могут быть биологически активными, свидетельством чего является специфичное увеличение количества нейтрофилов в крови.

Таблица 63.

Схема введения							
Группа	Препарат	Способ введения	N=	Доза (мкг/мышь)	Объем дозы (мкл/мышь)	Растворитель	Кол-во нейтрофилов (тыс/мкл)
1	G-CSF (Gen1)	в/м	5	2×50 мкг (4 дозы)	50	Ф. Буфер	840*
2	G-CSF (Gen1)	п/к	5	2×50 мкг (4 дозы)	50	Ф. Буфер	430
3	G-CSF (Gen2)	в/м	5	2×50 мкг (4 дозы)	50	Ф. Буфер	746*
4	G-CSF (Gen2)	п/к	5	2×50 мкг (4 дозы)	50	Ф. Буфер	683
5	Luc (Gen1)	в/м	5	2×50 мкг (4 дозы)	50	Ф. Буфер	201
6	Luc (Gen1)	п/к	5	2×50 мкг (4 дозы)	50	Ф. Буфер	307
7	Luc (Gen2)	в/м	5	2×50 мкг (4 дозы)	50	Ф. Буфер	336
8	Luc (Gen2)	п/к	5	2×50 мкг (4 дозы)	50	Ф. Буфер	357
9	Ф. Буфер	в/м	4	0 (4 дозы)	50	Ф. Буфер	245
10	Ф. Буфер	п/к	4	0 (4 дозы)	50	Ф. Буфер	509
11	Нелеченные	-	4			-	312

Пример 41. Внутривенное введение

[001055] мРНК G-CSF человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), модифицированную 5-метилцитозином (5 mc) и псевдоуридином (ψ) (Gen1); или немодифицированную в 10% липоплексе (RNAiMax) вводят мышам в дозе 50 мкг РНК, в объеме 100 мкл внутривенной инъекцией (в/в) в дни 0, 2 и 4. Количество нейтрофилов измеряют в дни 1, 5 и 8. Контрольным животным вводят неспецифичную РНК млекопитающих или только буферный препарат (Ф. Буфер).

У мышей отбирают образцы крови в дни 1, 5 и 8 для определения влияния кодируемого мРНК G-CSF человека на увеличение количества нейтрофилов. В Табл. 64 приведена схема введения и подсчитанное количество нейтрофилов (тыс/мкл; К/мкл).

[001056] Для внутривенного введения, данные демонстрируют 4-5-кратное увеличение количества нейтрофилов по сравнению с контролем на 5-й день при введении модифицированной мРНК G-CSF, но не немодифицированной мРНК G-CSF или неспецифичной контрольной РНК. Количество клеток крови возвращается к исходному уровню за 4 дня после последней инъекции. Других изменений в популяции лейкоцитов не наблюдалось.

[001057] В Табл. 64 звездочка (*) указывает на статистическую значимость с $p < 0,001$ по сравнению с буферным раствором.

[001058] Полученные данные демонстрируют, что введенная в липоплекс мРНК, модифицированная 5-метилцитидином/псевдоуридином, может быть биологически активной при в/м введении, о чем свидетельствует специфичное увеличение количества нейтрофилов в крови. Для других подмножеств клеток существенных изменений не наблюдалось. Введенная подобным способом немодифицированная мРНК G-CSF не оказывала фармакологического воздействия на количество нейтрофилов.

Таблица 64.

Схема введения					
Группа	Препарат	N=	Объем дозы (мкл/мышь)	Растворитель	Кол-во нейтрофилов тыс/мкл
1	G-CSF (Gen1) День 1	5	100	10% липоплекс	2,91
2	G-CSF (Gen1) День 5	5	100	10% липоплекс	5,32*
3	G-CSF (Gen1) День 8	5	100	10% липоплекс	2,06
4	G-CSF (немодифицированный) День 1	5	100	10% липоплекс	1,88
5	G-CSF (немодифицированный) День 5	5	100	10% липоплекс	1,95
6	G-CSF (немодифицированный) День 8	5	100	10% липоплекс	2,09
7	Контрольная РНК День 1	5	100	10% липоплекс	2,90
8	Контрольная РНК День 5	5	100	10% липоплекс	1,68
9	Контрольная РНК День 8	4	100	10% липоплекс	1,72
10	Ф. Буфер День 1	4	100	10% липоплекс	2,51
11	Ф. Буфер День 5	4	100	10% липоплекс	1,31
12	Ф. Буфер День 8	4	100	10% липоплекс	1,92

Пример 42. Препарат на основе солевого раствора: внутримышечное введение
А. Экспрессия белка

[001059] Модифицированную мРНК G-CSF человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) и ммРНК ЭПО человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1); модифицированную мРНК G-CSF (модифицированная 5-метилцитозинном (5 мс) и псевдоуридином (ψ)) и модифицированную мРНК ЭПО (модифицированная N1-5-метилцитозинном (N1-5 мс) и ψ) вводят в буферный раствор (150 мМ натрия хлорида, 2 мМ кальция хлорида, 2 мМ фосфата, 0,5 мМ ЭДТА при pH 6,5) и вводят мышам внутримышечной (в/м) инъекцией в дозе 100 мкг.

[001060] Контрольным животным вводят люциферазу (IVT последовательность кДНК, SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин) или буферный раствор (Ф. Буфер).

У мышей отбирают образцы крови через 13 часов после инъекции для определения концентрации человеческого полипептида в сыворотке в пг/мл (в группах G-CSF измеряют G-CSF человека в сыворотке мыши, и в группах ЭПО измеряют ЭПО человека в сыворотке мыши). Данные приведены в Табл. 65.

5

Таблица 65.					
Схема введения					
Группа	Препарат	N=	Объем дозы (мкл/мышь)	Растворитель	Среднее содержание белкового продукта в сыворотке (пг/мл)
G-CSF	G-CSF	5	50	Раствор соли	19,8
G-CSF	Люцифераза	5	50	Раствор соли	0,5
G-CSF	Ф. Буфер	5	50	Ф. Буфер	0,5
ЭПО	ЭПО	5	50	Раствор соли	191,5
ЭПО	Люцифераза	5	50	Раствор соли	15,0
ЭПО	Ф. Буфер			Ф. Буфер	4,8

10

Б. Доза-реакция

15

[001061] Модифицированную мРНК ЭПО человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозин и псевдоуридин) вводят в буферный раствор и вводят мышам внутримышечной (в/м) инъекцией.

20

[001062] Контрольным животным вводят люциферазу (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная 5-метилцитозин и псевдоуридин) или состав буфера (Ф. Буфер). У мышей отбирают образцы крови через 13 часов после инъекции для определения концентрации человеческого полипептида в сыворотке в пг/мл. Дозы и экспрессия приведены в Табл. 66.

25

Таблица 66.		
Схема введения и экспрессия		
Препарат	Объем дозы (мкл/мышь)	Средний уровень белкового продукта в сыворотке (пг/мл)
ЭПО	100	96,2
ЭПО	50	63,5
ЭПО	25	18,7
ЭПО	10	25,9
ЭПО	1	2,6
Люцифераза	100	0,0
Ф. Буфер	100	1,0

30

35

Пример 43. Многодозовые схемы/множественное введение

[001063] Были спроектированы и проведены исследования с несколькими местами внутримышечной инъекции в одно и то же время.

40

[001064] Дизайн эксперимента с одинарным введением нескольких доз включает применение мРНК эритропоэтина (ЭПО) человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) или G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), вводимой в буферном растворе. Растворитель (Ф. Буфер) служит контролем. мРНК ЭПО и G-CSF модифицированы заменой каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин.

45

[001065] Животным (крысы Спрег-Доули, n=5) инъекционно вводят в/м (внутримышечно) разовую дозу 100 мкг (в бедро). В многодозовой схеме применяют 6 доз по 100 мкг (вводят в оба бедра) для мРНК ЭПО и G-CSF. Контроль включает введение одной дозы буферного раствора. Уровни ЭПО человека в крови оценивают через 13 часов после инъекции.

[001066] Уровень белка ЭПО человека измеряют в сыворотке крыс через 13 часов после в/м введения. Лечение и оценку проводят для 5 групп крыс. Результаты приведены в Табл. 67.

Таблица 67.

Многодозовое исследование				
Группа	Препарат	Доза мРНК	Общая доза	Средний уровень ЭПО человека (пг/мл)
1	мРНК ЭПО человека	1×100 мкг	100 мкг	143
2	мРНК ЭПО человека	6×100 мкг	600 мкг	256
3	мРНК G-CSF	1×100 мкг	100 мкг	43
4	мРНК G-CSF	6×100 мкг	600 мкг	58
5	Только буферный раствор	-	-	20

Пример 44. Исследование обмена сигнальной последовательности

[001067] Несколько вариантов мРНК, кодирующей гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (G-CSF) (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) синтезируют с использованием модифицированных нуклеотидов псевдоуридина и 5-метилцитозина (псевдо-U/5 mC). Указанные варианты содержат конструкторы G-CSF, кодирующие последовательность N-концевого секреторного сигнального пептида дикого типа (MAGPATQSPMKLMAL QLLLWHSALWTVQEA; SEQ ID NO: 21), последовательность несекреторного сигнального пептида или последовательности секреторных сигнальных пептидов, полученные от других мРНК. Они включают последовательности, где последовательность сигнального пептида G-CSF дикого типа заменена последовательностью сигнального пептида: α-1-антитрипсина человека (AAT) (MMPSSVSWGELLLAGLCCCLVPVSLA; SEQ ID NO: 22), Фактора IX человека (FIX) (MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKR; SEQ ID NO: 23), пролактина (Prolac) человека (MKGSLLLLLVSNLLLCQSVAP; SEQ ID NO: 24) или альбумина (Alb) человека (MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR; SEQ ID NO: 25).

[001068] 250 нг модифицированной мРНК, кодирующей каждый из вариантов G-CSF, трансфицируют линии клеток HEK293A (293 A в таблице), миобластов мыши (ММ в таблице) (C2C12, CRL-1772, АКТК) и миобластов крысы (МК в таблице) (линия L6, CRL-1458, АКТК) на 24-луночном планшете, где каждая лунка содержит 300000 клеток, с использованием 1 мкл Липофектамина 2000 (Life Technologies). Супернатанты собирают через 24 часа, и секретированный белок G-CSF анализируют методом ТИФА с использованием набора ТИФА для G-CSF человека (Life Technologies). Данные, приведенные в Табл. 68, показывают, что клетки, трансфицированные мРНК G-CSF, кодирующей сигнальный пептид альбумина, секреторируют по меньшей мере в 12 раз больше белка G-CSF, чем трансфицированные ее двойником дикого типа.

Таблица 68.

Обмен сигнального пептида			
Сигнальные пептиды	293A (пг/мл)	ММ (пг/мл)	МК (пг/мл)

Природный G-CSF	9650	3450	6050
α -1-Антитрипсин	9950	5000	8475
Фактор IX	11675	6175	11675
Пролактин	7875	1525	9800
Альбумин	122050	81050	173300
Отсутствие	0	0	0
сигнального пептида			

Пример 45. Исследование цитокинов: мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК)

[001069] Выделение и культивирование МКПК: 50 мл крови человека, полученной от двух доноров, было получено от Research Blood Components (серии КР30928 и КР30931) в пробирках с гепарином натрия. Для каждого донора кровь объединяют в пул и разбавляют до 70 мл фосфатно-солевым буфером Дюльбекко (ФСБД, SAFC Bioscience 59331C, серия 071M8408) и делят поровну на две конические пробирки емкостью 50 мл. 10 мл фиколл-пак (GE Healthcare 17-5442-03, серия 10074400) осторожно помещают ниже слоя крови. Пробирки центрифугируют со скоростью 2000 об/мин в течение 30 минут с небольшим ускорением и торможением. Пробирки извлекают, лейкоцитомоноцитарный слой МКПК осторожно переносят в свежие конические пробирки емкостью 50 мл и промывают ФСБД. Пробирки центрифугируют со скоростью 1450 об/мин в течение 10 минут.

[001070] Супернатант извлекают, гранулы МКПК ресуспендируют и промывают в 50 мл ФСБД. Пробирки центрифугируют со скоростью 1250 об/мин в течение 10 минут. Указанную стадию промывания повторяют, гранулы МКПК ресуспендируют в 19 мл Optimem I (Gibco 11058, серия 1072088) и производят подсчет. Концентрацию клеточных суспензий регулируют до содержания живых клеток $3,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[001071] Далее полученные клетки каждого донора помещают на пять 96-луночных планшетов для культуры тканей с круглым дном (Costar 3799) в объеме 50 мкл на лунку. В пределах 30 минут трансфекционные смеси добавляют в каждую лунку в объеме 50 мкл на лунку. Через 4 часа после трансфекции в среду добавляют 10 мкл сыворотки телячьего эмбриона (Gibco 10082, серия 1012368).

[001072] Смесь для трансфекции: ммРНК, кодирующую G-CSF человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) (содержащую (1) природные НТФ, (2) 100% замену 5-метилцитидином и псевдоуридином или (3) 100% замену 5-метилцитидином и N1-метилпсевдоуридином; ммРНК, кодирующую люциферазу (IVT последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин) (содержащую (1) природные НТФ или (2) 100% замену 5-метилцитидином и псевдоуридином) и агонист TLR R848 (Invivogen tlrl-r848) разбавляют до концентрации 38,4 нг/мкл в конечном объеме 2500 мкл Optimem I.

[001073] Отдельно, 432 мкл Липофектамина 2000 (Invitrogen 11668-027, серия 1070962) разбавляют 13,1 мл Optimem I. На 96-луночном планшете 9 аликвот по 135 мкл каждой ммРНК, положительного контроля (R-848) или отрицательного контроля (Optimem I) добавляют к 135 мкл разбавленного Липофектамина 2000. Планшет, содержащий материал для трансфекции, инкубируют в течение 20 минут. Далее трансфекционные смеси переносят на каждый из планшетов, содержащих МКПК человека, в объеме 50

мкл на лунку. Затем планшеты инкубируют при 37°C. Через 2, 4, 8, 20 и 44 часа каждый планшет извлекают из инкубатора, и супернатанты замораживают.

[001074] После извлечения последнего планшета, супернатанты анализируют с помощью набора ТИФА для G-CSF человека (Invitrogen KHC2032) и набора ТИФА для интерферона-альфа человека (Thermo Scientific 41105-2). Каждое условие повторяют в двух экземплярах.

[001075] Результаты: Способность немодифицированной и модифицированной мРНК (ммРНК) приводить к выработке кодируемого белка оценивают (выработку G-CSF) во времени, так же, как и способность мРНК запускать природное иммунное распознавание, что определяется измерением выработки интерферона-альфа. Применение культур МКПК *in vitro* является приемлемым способом измерения иммуностимулирующего потенциала олигонуклеотидов (Robbins et al., Oligonucleotides 2009 19:89-102).

[001076] Результаты интерполируют против стандартной кривой каждого планшета ТИФА с использованием 4-х параметрической аппроксимации к логистической кривой. В Табл. 69 и 70 приведено среднее значение для 2-х отдельных доноров МКПК выработки G-CSF и интерферона-альфа во времени, по данным чувствительного ТИФА.

[001077] В чувствительном к G-CSF ТИФА, фоновый сигнал необработанного Липофектамина 2000 вычитают в каждой временной точке. Данные демонстрируют, что специфичная выработка белка G-CSF человека мононуклеарными клетками периферической крови человека наблюдается для мРНК G-CSF, содержащей природные НТФ, 100% замену 5-метилцитидином и псевдоуридином или 100% замену 5-метилцитидином и N1-метилпсевдоуридином. Выработка G-CSF значительно повышалась при применении модифицированной мРНК, по сравнению с немодифицированной мРНК, причем содержащая 5-метилцитидин и N1-метилпсевдоуридин ммРНК G-CSF демонстрирует самый высокий уровень выработки G-CSF. С учетом природного иммунного распознавания, немодифицированная мРНК приводила к значительной выработке интерферона-альфа, тогда как модифицированная мРНК в существенной степени предупреждала выработку интерферона-альфа. мРНК G-CSF, полностью модифицированная 5-метилцитидином и N1-метилпсевдоуридином, не приводила к существенному повышению уровня цитокинов, тогда как мРНК G-CSF, полностью модифицированная 5-метилцитидином и псевдоуридином, индуцировала интерферон-альфа, TNF-альфа и IP10. Ни одна из модификаций не влияла на большинство других цитокинов.

Таблица 69.					
Сигнал G-CSF					
Сигнал G-CSF - среднее значение для 2-х доноров					
пг/мл	2 часа	4 часа	8 часов	20 часов	44 часа
G-CSF (5 мС/псевдоуридин)	120,3	136,8	421,0	346,1	431,8
G-CSF (5мС/N1-метилпсевдоуридин)	256,3	273,7	919,3	1603,3	1843,3
G-CSF (природный-немодифицированный)	63,5	92,6	129,6	258,3	242,4
Люцифераза (5 мС/псевдоуридин)	4,5	153,7	33,0	186,5	58,0
Таблица 70.					
Сигнал интерферона-альфа					
Сигнал интерферона-альфа - среднее значение для 2-х доноров					
пг/мл	2 часа	4 часа	8 часов	20 часов	44 часа
G-CSF (5 мС/псевдоуридин)	21,1	2,9	3,7	22,7	4,3
G-CSF (5мС/N1-метил псевдоуридин)	0,5	0,4	3,0	2,3	2,1
G-CSF (природный)	0,0	2,1	23,3	74,9	119,7
Люцифераза (5 мС/псевдоуридин)	0,4	0,4	4,7	1,0	2,4

R-848	39,1	151,3	278,4	362,2	208,1
Липофектамин. 2000 контроль	0,8	17,2	16,5	0,7	3,1

Пример 46. Интервалы химической модификации модифицированной мРНК [001078] Показано, что модифицированные нуклеотиды, такие как, без ограничений, химические модификации 5-метилцитозин и псевдоуридин, снижают природный иммунный ответ и повышают экспрессию РНК в клетках млекопитающих. Неожиданно, поскольку это ранее не было известно, было обнаружено, что эффекты, вызываемые химическими модификациями, могут титроваться, если содержание химической модификации менее 100%. Ранее считалось, что полная модификация необходима и достаточна для того, чтобы вызывать благоприятные эффекты химической модификации, и что модификация мРНК менее 100% вызывает незначительный эффект. Однако, нами было показано, что преимущества химической модификации могут быть достигнуты с использованием неполной модификации, и что эффекты зависят от мишени, концентрации и модификации.

А. Трансфекция МКПК модифицированными РНК

[001079] 960 нг мРНК G-CSF, модифицированной 5-метилцитозином (5 мС) и псевдоуридином (псевдо-U), или немодифицированной мРНК G-CSF трансфицируют с помощью 0,8 мкл Липофектамина 2000 мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные от 3-х нормальных доноров крови (D1, D2, D3). мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицирована 5 мС и псевдо-U (100% модификация), не модифицирована 5 мС и псевдо-U (0% модификация) или частично модифицирована 5 мС и псевдо-U, таким образом, что мРНК содержит 50% модификацию, 25% модификацию, 10% модификацию, 5% модификацию, 1% модификацию или 0,1% модификацию. Контрольный образец люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5 мС и псевдо-U) также анализируют на предмет экспрессии G-CSF. Контрольные образцы Липофектамина 2000, LPS, R-848, Люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5 мС и псевдо) и Р(И)Р(С) также анализируют на предмет TNF-альфа и интерферона-альфа. Супернатант собирают и анализируют методом ТИФА через 22 часа после трансфекции для определения экспрессии белка. Экспрессия G-CSF приведена в Табл. 71, и экспрессия интерферона-альфа и TNF-альфа приведена в Табл. 72. Экспрессия интерферона-альфа и TNF-альфа может быть вторичным эффектом трансфекции мРНК G-CSF. Таблицы демонстрируют, что процент химической модификации G-CSF, интерферона-альфа и TNF-альфа является титруемым, если мРНК не полностью модифицирована, и титруемый тренд не является одинаковым для каждой мишени.

	Экспрессия G-CSF		
	Экспрессия G-CSF (пг/мл)		
	D1	D2	D3
100% модификация	270,3	151,6	162,2
50% модификация	45,6	19,8	26,3
25% модификация	23,6	10,8	8,9
10% модификация	39,4	12,9	12,9
5% модификация	70,9	26,8	26,3

	1% модификация	70,3	26,9	66,9			
	0,1% модификация	67,5	25,2	28,7			
	Люцифераза	14,5	3,1	10,0			
	Таблица 72.						
	Экспрессия интерферона-альфа и TNF-альфа						
5		Экспрессия интерферона-альфа (пг/мл)			Экспрессия TNF-альфа (пг/мл)		
		D1	D2	D3	D1	D2	D3
	100% модификация	76,8	6,8	15,1	5,6	1,4	21,4
	50% модификация	22,0	5,5	257,3	4,7	1,7	12,1
	25% модификация	64,1	14,9	549,7	3,9	0,7	10,1
10	10% модификация	150,2	18,8	787,8	6,6	0,9	13,4
	5% модификация	143,9	41,3	1009,6	2,5	1,8	12,0
	1% модификация	189,1	40,5	375,2	9,1	1,2	25,7
	0,1% модификация	261,2	37,8	392,8	9,0	2.	13,7
	0% модификация	230,3	45,1	558,3	10,9	1,4	10,9
	Липофектамин 200	0	0	1,5	45,8	2,8	53,6
15	LPS	0	0	1,0	114,5	70,0	227,0
	R-848	39,5	11,9	183,5	389,3	256,6	410,6
	Люцифераза	9,1	0	3,9	4,5	2,7	13,6
	P(D)P(C)	1498,1	216,8	238,8	61,2	4,4	69,1

Б. Трансфекция НЕК293 модифицированной РНК

20 [001080] Эпителиальные клетки почки эмбриона человека (НЕК293) высевают на 96-луночные планшеты с плотностью 30000 клеток на лунку в 100 мкл питательной среды для клеток. 250 нг модифицированной мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) в препарате RNAiMAX™ (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) добавляют в лунку. мРНК G-CSF полностью модифицирована 5 мС и псевдо-U (100% модификация), не
25 модифицирована 5 мС и псевдо-U (0% модификация) или частично модифицирована 5 мС и псевдо-U, таким образом, что она содержит 75% модификацию, 50% модификацию или 25% модификацию. Также анализируют контрольные образцы (АК 5/2, mCherry (SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5 мС и псевдо-U) и
30 необработанные). Период полувыведения мРНК G-CSF, полностью модифицированной 5-метилцитозинном и псевдоуридинном, составляет приблизительно 8-10 часов. Супернатанты собирают через 16 часов, и секретированный белок G-CSF анализируют методом ТИФА. Табл. 73 демонстрирует, что степень химической модификации G-CSF является титруемой, если мРНК не полностью модифицирована.

	Таблица 73.	
	Экспрессия G-CSF	
		Экспрессия G-CSF (нг/мл)
	100% модификация	118,4
40	75% модификация	101,9
	50% модификация	105,7
	25% модификация	231,1
	0% модификация	270,9
	АК 5/2	166,8
	mCherry	0
45	Необработанная	0

Пример 47: Доставка in vivo модифицированной мРНК (ммРНК)

[001081] Модифицированную РНК вводят мышам C57/BL6 внутримышечно, подкожно или внутривенно для оценки биораспределения модифицированной РНК с

использованием люциферазы. Во всех способах введения используют буферный раствор, содержащий 150 мМ натрия хлорида, 2 мМ кальция хлорида, 2 мМ Na⁺-фосфата (1,4 мМ одноосновного натрия фосфата и 0,6 мМ двухосновного натрия фосфата) и 0,5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), значение pH которого доведено до 5
5 конечного значения 6,5 с помощью натрия гидроксида, с последующей фильтрацией и стерилизацией. В качестве буфера для введения используют 1X концентрацию. Для получения раствора липоплекса, вводимого мышам, в одном флаконе 50 мкг РНК уравнивают в течение 10 минут при комнатной температуре в буфере для введения, и во втором флаконе 10 мкл RNAiMAX™ уравнивают в течение 10 минут при
10 комнатной температуре в буфере для введения. После уравнивания, содержимое флаконов объединяют, и добавляют буфер для введения до конечного объема 100 мкл, после чего инкубируют в течение 20 минут при комнатной температуре. Люциферин вводят каждой мыши внутривентральной инъекцией (в/б) в дозе 150 мг/кг перед визуализацией в ходе фазы плато кривой системного контакта для люциферина, что
15 соответствует 15-30 минутам. Для получения люциферина, 1 г калиевой или натриевой соли D-люциферина растворяют в 66,6 мл дистиллированного фосфатного буферного раствора (ФСБД), не содержащего Mg²⁺ или Ca²⁺, с получением раствора 15 мг/мл. Раствор осторожно перемешивают и пропускают сквозь шприц-фильтр с размером пор 0,2 мкм, после чего продувают азотом, отбирают аликвоты и замораживают при
20 -80°C, максимально защищая от света. Раствор размораживают на водяной бане, если люциферин не растворился, осторожно перемешивают и хранят на льду в день введения.

[001082] Общую визуализацию (всего тела) проводят для каждой мыши через 2, 8 и 24 часа после введения дозы. Снимки тканей и сыворотку получают от каждой мыши через 24 часа после введения дозы. Получают снимки печени, селезенки, почек, легких,
25 сердца, околопочечной жировой ткани и тимуса мышей, которым вводили препарат внутривенно. Получают снимки печени, селезенки, почек, легких, околопочечной жировой ткани и мышцы в месте инъекции мышей, которым вводили препарат внутримышечно или подкожно. На основании снимков всего тела измеряют биоллюминесценцию (фотоны в секунду) для каждого способа введения и дозы.

30 А. Внутримышечное введение

[001083] Мышам вводят внутримышечно (в/м) модифицированную мРНК люциферазы, полностью модифицированную 5-метилцитозинном и псевдоуридинном (свободная Luc), липоплекс модифицированной мРНК люциферазы, полностью модифицированной 5-метилцитозинном и псевдоуридинном (липоплекс-Luc) (IVT
35 последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16, хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1, полностью модифицированная путем замены каждого цитозина на 5-метилцитозин и каждого уридина на псевдоуридин), липоплекс модифицированной мРНК гранулоцитарного колониестимулирующего
40 фактора (G-CSF) (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) (липоплекс-цитокин) или буферный раствор, в одинарной дозе 50 мкг модифицированной РНК в объеме инъекции 50 мкл для каждого препарата, в правую заднюю конечность, и
45 одинарную дозу 5 мкг модифицированной РНК в объеме инъекции 50 мкл в левую заднюю конечность. Средние значения сигнала биоллюминесценции для экспрессии люциферазы в каждой группе через 2, 8 и 24 часа после введения приведены в Табл. 74. Обнаружен положительный сигнал биоллюминесценции в месте инъекции 5 мкг и 50 мкг

модифицированной РНК в форме препаратов, содержащих и не содержащих липоплекс.

Таблица 74.				
Биофотонная визуализация in vivo (введение в/м инъекцией)				
Препарат	Доза (мкг)	Биоломинесценция		фотон/с)
		2 часа	8 часов	24 часа
Свободная люцифераза	5	224000	683000	927000
Липоплекс-люцифераза	5	579000	639000	186000
Липоплекс-G-CSF	5	64600	85600	75100
Буферный раствор	5	102000	86000	90700
Свободная люцифераза	50	446000	766000	509000
Липоплекс-люцифераза	50	374000	501000	332000
Липоплекс-G-CSF	50	49400	74800	74200
Буферный раствор	50	59300	69200	63600

Б. Подкожное введение

[001084] Мышам вводят подкожно (п/к) модифицированную мРНК люциферазы (Свободная Luc), липоплекс модифицированной мРНК люциферазы (Липоплекс-Luc), липоплекс модифицированной мРНК G-CSF (Липоплекс-G-CSF) или буферный раствор в однократной дозе 50 мкг модифицированной мРНК, в объеме инъекции 100 мкл для каждого препарата. Средние значения сигнала биоломинесценции для экспрессии люциферазы в каждой группе через 2, 8 и 24 часа после введения приведены в Табл. 75. Обнаружен положительный сигнал биоломинесценции в месте инъекции 50 мкг модифицированной РНК в форме препаратов, содержащих и не содержащих липоплекс.

Таблица 75.			
Биофотонная визуализация in vivo (введение п/к инъекцией)			
Препарат	Биоломинесценция (фотон/с)		
	2 часа	8 часов	24 часа
Свободная люцифераза	3700000	8060000	2080000
Липоплекс-люцифераза	3960000	1700000	1290000
Липоплекс-G-CSF	123000	121000	117000
Буферный раствор	116000	127000	123000

В. Внутривенное введение

[001085] Мышам вводят внутривенно (в/в) модифицированную мРНК люциферазы (Свободная Luc), липоплекс модифицированной люциферазы мРНК (Липоплекс-Luc), липоплекс модифицированной мРНК G-CSF (Липоплекс-G-CSF) или буферный раствор в однократной дозе 50 мкг модифицированной мРНК в объеме инъекции 100 мкл для каждого препарата. Среднее значение сигнала биоломинесценции для экспрессии люциферазы в селезенке каждой группы через 2 часа после введения приведено в Табл. 76. Обнаружен положительный сигнал биоломинесценции в селезенке животных, получавших 50 мкг модифицированной РНК в форме препаратов, содержащих липоплекс.

Таблица 76	
Биофотонная визуализация in vivo (введение в/в инъекцией)	
Препарат	Биоломинесценция в селезенке (фотон/с)
Свободная люцифераза	58400
Липоплекс-люцифераза	65000
Липоплекс-G-CSF	57100
Буферный раствор	58300

Пример 48. Исследования разделенных доз

[001086] Исследования с несколькими местами подкожной или внутримышечной

инъекции в одно и то же время были спроектированы и проведены с целью изучения способов повышения системного контакта с лекарственным средством ммРНК и повышения эффективности выработки белка. В дополнение к обнаружению экспрессированного белкового продукта, проводилась оценка физиологической функции белков посредством анализа образцов, полученных от экспериментального животного.

[001087] Неожиданно, было обнаружено, что введение ммРНК в виде разделенных доз приводит к повышению выработки белка и фенотипических ответов, по сравнению со схемами введения одинарной или нескольких доз.

[001088] Дизайн эксперимента с введением одинарной дозы, нескольких доз и разделенных доз включает использование введения модифицированной мРНК эритропозтина (ЭПО) человека (мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) в буферном растворе. Доза растворителя (буферный препарат) содержит 150 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ Na⁺-фосфата (1,4 мМ одноосновного натрия фосфата; 0,6 мМ двухосновного натрия фосфата) и 0,5 мМ ЭДТА, pH 6,5. Проводят коррекцию pH с помощью натрия гидроксида, и конечный раствор стерилизуют фильтрацией. ммРНК модифицирована заменой каждого цитозина на 5 мeC и каждого уридина на псевдоуридин.

[001089] Животным (n=5) вводят в/м (внутримышечной) инъекцией одинарную дозу 100 мкг. Для введения нескольких доз использовали две схемы, 3 дозы по 100 мкг и 6 доз по 100 мкг. Для введения разделенных доз использовали две схемы, 3 дозы по 33,3 мкг и 6 доз по 16,5 мкг ммРНК. Контрольные животные получали только 6 доз буферного раствора. Контрольная ммРНК представляла собой ммРНК люциферазы (IVT последовательность кДНК представлена в SEQ ID NO: 15; последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная заменой каждого цитозина на 5 мeC и каждого уридина на псевдоуридин), 6 доз по 100 мкг. Кровь и мышечную ткань оценивали через 13 часов после инъекции.

[001090] Уровень белка ЭПО человека измеряют в сыворотке мышцы через 13 часов после в/м введения одинарной, нескольких или разделенных доз ммРНК ЭПО в буферном растворе. Лечение и оценку проводят для 7 групп мышей (n=5 мышей на группу). Результаты приведены в Табл. 77.

Таблица 77.

Исследование разделенных доз						
Группа	Препарат	Доза ммРНК	Общая доза	Средний уровень ЭПО человека (пмоль/мл)	Содержание полипептида на единицу лекарственного средства (пмоль/мкг)	Коэффициент разделения дозы
1	ммРНК ЭПО человека	1×100 мкг	100 мкг	14,3	0,14	1
2	ммРНК ЭПО человека	3×100 мкг	300 мкг	82,5	0,28	2
3	ммРНК ЭПО человека	6×100 мкг	600 мкг	273,0	0,46	3,3
4	ммРНК ЭПО человека	3×33,3 мкг	100 мкг	104,7	1,1	7,9
5	ммРНК ЭПО человека	6×16,5 мкг	100 мкг	127,9	1,3	9,3
6	ммРНК люциферазы	6×100 мкг	600 мкг	0	-	-
7	Буферный раствор	-	-	0	-	-

[001091] Коэффициент разделения дозы определяется как соотношение количества продукта в упаковке лекарственного средства (PUD), полученное делением дозы в упаковке на разовую дозу. Например, для лечения группы 2, значение 0,28 или количество продукта (ЭПО) в дозе лекарственного средства (ммРНК) делят на разовую дозу продукта в единице лекарственного средства 0,14. Результат составляет 2. Подобным образом, для лечения группы 4, значение 1,1 или количество продукта (ЭПО) на единицу лекарственного средства (ммРНК) делят на разовую дозу продукта в единице лекарственного средства 0,14. Результат составляет 7,9. Следовательно, коэффициент разделения дозы (КРД) может использоваться в качестве показателя эффективности схемы с разделенными дозами. Для любого одинарного введения общей суточной дозы, КРД должен соответствовать 1. Таким образом, любое значение КРД, превышающее указанное значение в схеме с разделенными дозами, является показателем повышения эффективности.

[001092] Для определения тенденций доза-реакция проведены исследования влияния места инъекции и расписания инъекций. В указанных исследованиях использовали варьирующие дозы 1 мкг, 5 мкг, 10 мкг, 25 мкг, 50 мкг и значения между ними для определения зависимостей доза-реакция. Разделенные дозы для общей дозы 100 мкг включают 3 или 6 доз по 1,6 мкг, 4,2 мкг, 8,3 мкг, 16,6 мкг, или значения и общие дозы, эквивалентные введению выбранной общей дозы.

[001093] Места инъекции выбирают на конечностях или любом участке тела, где присутствует достаточная площадь для инъекции. Кроме того, выбор может включать выбор глубины инъекции для направленного введения в дерму (интрадермально), эпидермис (эпидермально), подкожную ткань (п/к) или мышцу (в/м). Угол введения будет варьировать на основании целевого участка введения, причем интрадермальные инъекции будут осуществляться под углом 10-15° к плоскости поверхности кожи, подкожные инъекции - под углом 20-45° к плоскости поверхности кожи, и под углом 60-90° для инъекций в существенной мере в мышцу.

Пример 49. Количественное определение в экзосомах

[001094] Количество и локализация ммРНК по настоящему изобретению могут быть определены путем измерения количества (начального, промежуточного или остаточного) в выделенных экзосомах. В данном исследовании, поскольку ммРНК типично являются кодон-оптимизированными, и их последовательность отличается от эндогенной мРНК, уровни ммРНК определяют количественно в сравнении с эндогенными уровнями нативной мРНК или мРНК дикого типа посредством применения способов Gibbings, РСТ/В 2009/005878, содержание которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки.

[001095] В данных исследованиях, способ осуществляют, вначале выделяя экзосомы или пузырьки, предпочтительно из биологической жидкости пациента, который предварительно получал лечение модифицированной ммРНК по изобретению, с последующим измерением в указанных экзосомах уровней модифицированной ммРНК с помощью одного из методов микромассива мРНК, количественной ОТ-ПЦР или других средств измерения РНК из уровня техники, в том числе, пригодных методов с применением антитела или иммуногистохимических методов.

Пример 50. Трансфекция модифицированной мРНК

А. Обратная трансфекция

[001096] Для экспериментов, проводимых в 24-луночном, покрытом коллагеном планшете для культуры тканей, высевают кератиноциты с плотностью клеток 1×10^5 . Для экспериментов, проводимых в 96-луночном, покрытом коллагеном планшете для

культуры тканей, высевают кератиноциты с плотностью клеток $0,5 \times 10^5$. Для каждой модифицированной мРНК (ммРНК), предназначенной для трансфекции, получают модифицированную мРНК/RNAIMAX™, как было раскрыто, и смешивают с клетками в многолуночном планшете в пределах периода времени, например, 6 часов, с момента

Б. Прямая трансфекция

[001097] В 24-луночный, покрытый коллагеном планшет для культуры тканей, кератиноциты высевают с плотностью клеток $0,7 \times 10^5$. Для экспериментов, проводимых в 96-луночном, покрытом коллагеном планшете для культуры тканей, высевают кератиноциты с плотностью клеток $0,3 \times 10^5$. Кератиноциты культивируют до слияния >70% в течение более 24 часов. Для каждой модифицированной мРНК (ммРНК), предназначенной для трансфекции, получают модифицированную мРНК/RNAIMAX™, как было раскрыто, и трансфицируют клетки в многолуночном планшете в течение периода времени более 24 часов после высевания клеток и их прикрепления к планшету для культуры тканей.

В. Скрининг трансляции модифицированной мРНК: G-CSF ТИФА

[001098] Кератиноциты культивируют в среде EPILIFE с добавлением S7 производства Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) при слиянии >70%. Один набор кератиноцитов подвергают обратной трансфекции с помощью 300 нг комплекса химически модифицированной мРНК (ммРНК) с RNAIMAX™ производства Invitrogen. Другой набор кератиноцитов обрабатывают прямой трансфекцией с помощью 300 нг комплекса модифицированной мРНК с RNAIMAX™ производства Invitrogen. Комплекс модифицированная мРНК/RNAIMAX™ получают, инкубируя РНК с не содержащей добавок средой EPILIFE® в 5X объемном разведении в течение 10 минут при комнатной температуре.

[001099] Во втором флаконе реактив RNAIMAX™ инкубируют с не содержащей добавок средой EPILIFE® в 10X объемном разведении в течение 10 минут при комнатной температуре. Далее содержимое флакона РНК смешивают с содержимым флакона RNAIMAX™ и инкубируют в течение 20-30 минут при комнатной температуре, после чего по каплям добавляют к клеткам. Концентрацию секретированного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (G-CSF) в питательной среде измеряют через 18 часов после трансфекции для каждой из химически модифицированных мРНК в 3-х экземплярах.

[001100] Секрецию G-CSF человека трансфицированными кератиноцитами человека количественно определяют с помощью набора ТИФА производства Invitrogen или R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота) в соответствии с инструкциями и рекомендациями производителя.

Г. Доза и длительность действия модифицированной мРНК: чувствительный к G-CSF ТИФА

[001101] Кератиноциты культивируют в среде EPILIFE® с добавкой S7 производства Invitrogen при слиянии >70%. Кератиноциты обрабатывают обратной трансфекцией 0 нг, 46,875 нг, 93,75 нг, 187,5 нг, 375 нг, 750 нг или 1500 нг комплекса модифицированной мРНК с RNAIMAX™ производства Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Комплекс модифицированная мРНК/RNAIMAX™ получают, как было раскрыто. Концентрацию секретированного G-CSF человека в питательной среде измеряют через 0, 6, 12, 24 и 48 часов после трансфекции для каждой концентрации каждой из химически модифицированных мРНК в 3-х экземплярах. Секрецию G-CSF человека

трансфицированными кератиноцитами человека количественно определяют с помощью набора ТИФА производства Invitrogen или R&D Systems в соответствии с инструкциями и рекомендациями производителя.

5 Пример 51. Обнаружение природного иммунного ответа клеток на модифицированную мРНК с помощью анализа ТИФА

[001102] Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) для опухолевого некротического фактора- α человека (TNF- α), интерферона- β человека (IFN- β) и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (G-CSF), секретируемых трансфицированными *in vitro* клетками кератиноцитов человека, проводят с целью
10 определения природного иммунного ответа клеток. Кератиноциты культивируют в среде EPILIFE® с добавкой для роста кератиноцитов человека, без гидрокортизона производства Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) при слиянии >70%. Секретирующие TNF- α кератиноциты представляют собой обратно трансфицированные 0 нг, 93,75 нг, 187,5 нг, 375 нг, 750 нг, 1500 нг или 3000 нг комплекса химически модифицированной
15 мРНК (ммРНК) с RNAIMAX™ производства Invitrogen, как было раскрыто, в 3-х экземплярах. Секретированный TNF- α измеряют в питательной среде через 24 часа после трансфекции для каждой из химически модифицированных мРНК с помощью набора ТИФА производства Invitrogen в соответствии с протоколами производителя.

[001103] Секретированный IFN- β в той же питательной среде измеряют через 24 часа
20 после трансфекции для каждой из химически модифицированных мРНК с помощью набора ТИФА производства Invitrogen в соответствии с протоколами производителя. Концентрацию секретированного G-CSF человека в той же питательной среде измеряют через 24 часа после трансфекции для каждой из химически модифицированных мРНК. Секретируемый G-CSF человека трансфицированными кератиноцитами человека
25 количественно определяют с помощью набора ТИФА производства Invitrogen или R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота) в соответствии с инструкциями и рекомендациями производителя. Полученные данные показывают, какие из модифицированных мРНК (ммРНК) способны вызывать природный иммунный ответ клеток, в сравнении с природными и другими химически модифицированными полинуклеотидами или
30 референтными соединениями, путем измерения характерных цитокинов типа 1 TNF- α и IFN- β .

Пример 52. Анализ пролиферации клеток, вызванной модифицированной мРНК гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (G-CSF)

[001104] Кератиноциты человека культивируют в среде EPILIFE® с добавкой S7
35 производства Invitrogen при слиянии >70% на 24-луночном, покрытом коллагеном планшете для совместного культивирования тканей TRANSWELL® (Coming, Лоуэлл, Массачусетс). Кератиноциты обрабатывают обратной трансфекцией с помощью 750 нг комплекса указанной химически модифицированной мРНК (ммРНК) с RNAIMAX производства Invitrogen, как было раскрыто, в 3-х экземплярах. Комплекс
40 модифицированная мРНК/RNAIMAX получают, как было раскрыто. Через 6-8 часов после трансфекции проводят обмен среды для кератиноцитов. Через 42 часа после трансфекции на планшет с культурой кератиноцитов, трансфицированных модифицированной мРНК G-CSF человека, помещают вставку для 24-луночных планшетов TRANSWELL® с полупроницаемой полиэфирной мембраной с размером
45 пор 0,4 мкм.

[001105] Миелобластные клетки человека, клетки Kasumi-1 или KG-1 ($0,2 \times 10^5$ клеток) высевают в лунку вставки, и клеточную пролиферацию количественно измеряют через 42 часа после начала со-культивирования с помощью прямого анализа пролиферации

клеток CyQuant (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) в объеме 100-120 мкл на 96-луночном планшете. Вызванную модифицированной мРНК, кодирующей G-CSF человека, пролиферацию миелобластных клеток выражают как процент клеточной пролиферации, нормализованный к контрольным лункам, содержащим со-культуру

5 нетрансфицированных кератиноцитов/миелобластов. Концентрацию секретированного G-CSF человека в лунках вставки с со-культурой кератиноцитов и миелобластов измеряют через 42 часа после начала со-культивирования для каждой модифицированной мРНК в 2-х экземплярах. Секретию G-CSF человека количественно определяют с помощью набора ТИФА производства Invitrogen в соответствии с инструкциями и

10 рекомендациями производителя.

[001106] Трансфицированную модифицированную мРНК G-CSF человека в фидере культуры клеток кератиноцитов человека и нетрансфицированных миелобластных клетках человека обнаруживают методом ОТ-ПЦР. Общую РНК экстрагируют из образца клеток и подвергают лизису с использованием набора RNEASY® (Qiagen,

15 Валенсия, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. Экстрагированную общую РНК подвергают ОТ-ПЦР с целью специфичной амплификации модифицированной мРНК G-CSF, с использованием набора для ОТ-ПЦР PROTOSCRIPT® M-MuLV Taq (New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс) в соответствии с инструкциями производителя, используя специфичные для G-CSF человека

20 праймеры. Продукты ОТ-ПЦР визуализируют с помощью электрофореза на 1,2% агарозном геле.

Пример 53. Исследования буферного раствора

[001107] Модифицированную мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1;

25 полностью модифицированная N1-псевдоуридином и 5-метилцитозином) или модифицированную мРНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная N1-псевдоуридином и 5-метилцитозином) в буферном

30 растворе вводят внутримышечно крысам в объеме инъекции 50 мкл (n=5), содержащем дозу модифицированной мРНК 200 мкг/крысу, как раскрыто в Табл. 78.

Модифицированную мРНК лиофилизируют из воды в течение 1-2 дней. Затем ее растворяют в перечисленных ниже буферных растворах до целевой концентрации 6 мг/мл. Концентрацию определяют на основании значения OD260. Перед введением образцы разбавляют подходящим буферным раствором до концентрации 4 мг/мл.

[001108] К осадку модифицированной мРНК добавляют 3 М натрия ацетат, рН 5,5, и чистый этанол в объеме 1/10 от общего объема и в 4 раза превышающем общий объем модифицированной мРНК, соответственно. Материал выдерживают при температуре -80°C по меньшей мере в течение 1 часа. Далее материал центрифугируют в течение 30

40 минут со скоростью 4000 об/мин, при 4°C. Супернатант удаляют, гранулу центрифугируют и 3x промывают 75% этанолом. В конце гранулу растворяют в буферном растворе до целевой концентрации 6 мг/мл. Концентрацию определяют на основании значения OD260. Перед введением образцы разбавляют подходящим буферным раствором до концентрации 4 мг/мл. Все образцы получают лиофилизацией, если иное не указано ниже.

45

Таблица 78.			
Группы введения в буферных растворах			
Группа	Препарат	Буферный раствор	Доза (мкг/крысу)
1	G-CSF	0,9% Раствор соли	200

	Фактор IX	0,9% Раствор соли	200
2	G-CSF	0,9% Раствор соли+2 мМ кальция	200
	Фактор IX	0,9% Раствор соли+2 мМ кальция	200
3	G-CSF	Раствор Рингера с лактатом	200
	Фактор IX	Раствор Рингера с лактатом	200
4	G-CSF	5% сахарозы	200
	Фактор IX	5% сахарозы	200
5	G-CSF	5% сахарозы+2 мМ кальция	200
	Фактор IX	5% сахарозы+2 мМ кальция	200
6	G-CSF	5% маннита	200
	Фактор IX	5% маннита	200
7	G-CSF	5% маннита+2 мМ кальция	200
	Фактор IX	5% маннита+2 мМ кальция	200

	G-CSF	0,9% солевого раствора (осаждение)	200
	Фактор GX	0,9% солевого раствора (осаждение)	200

15 [001109] Образцы сыворотки отбирают у крыс через различные промежутки времени и анализируют экспрессию белка G-CSF или Фактора IX методом ТИФА, чувствительного к G-CSF или Фактору IX.

Пример 54. Многодозовое исследование

20 [001110] Крысам Спрег-Доули (n=8; 4 самки, 4 самца) внутривенной инъекцией вводят 8 доз (2 раза в неделю) на протяжении 28 дней. Крысам инъекционно вводят 0,5 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,005 мг/кг или 0 0005 мг/кг модифицированной мРНК G-CSF человека или модифицированной мРНК люциферазы в липидной наночастице, 0,5 мг/кг модифицированный мРНК G-CSF человека в солевом растворе, 0,2 мг/кг белка G-CSF человека (Neurogen) или нетранслируемой модифицированной мРНК G-CSF человека
25 в липидной наночастице. Сыворотку собирают через предварительно определенные промежутки времени для оценки экспрессии белка G-CSF (через 8, 24 и 72 часа после введения первой дозы в неделю), полной формулы крови и количества лейкоцитов (через 24 и 72 часа после введения первой дозы в неделю) и показателей клинической химии (через 24 и 72 часа после введения первой дозы в неделю). Крыс умерщвляют на
30 29-й день, через 4 дня после введения последней дозы, для определения полной формулы крови, количества лейкоцитов, показателей клинической химии, экспрессии белка и для оценки влияния на основные органы методами гистопатологии и некропсии. Кроме того, анализ с использованием антитела проводят для крыс на 29-й день.

Пример 55. Исследование ЛНЧ люциферазы in vivo

35 [001111] Модифицированную мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; поли-А хвост длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности, 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и псевдоуридином), вводят в липидную наночастицу (ЛНЧ) с применением способа шприцевого насоса. ЛНЧ получают с массовым соотношением 20:1 общего липида к модифицированной мРНК, с конечным
40 молярным соотношением липидов 50:10:38,5:1,5 (ДЛин-КС2-ДМА:ДСФХ:холестерин: ПЭГ-ДМГ). Как проиллюстрировано в Табл. 79, препарат ЛНЧ люциферазы охарактеризован размером частиц, зета потенциалом и инкапсуляцией.

Таблица 79.	
Препарат люциферазы	
Препарат	НРА-098-1
Модифицированная мРНК	Люцифераза
Средний размер	135 нм
	ИПД: 0,08

Зета при pH 7,4	-0,6 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	91%

[001112] Как проиллюстрировано кратко в Табл. 80, препарат ЛНЧ люциферазы вводят мышам Balb-C (n=3) внутримышечно, внутривенно и подкожно, и модифицированную РНК люциферазы в ФБР вводят мышам внутривенно.

Таблица 80.

Препараты люциферазы						
Препарат	Растворитель	Способ введения	Концентрация (мг/мл)	Объем инъекции (мкл)	Количество модифицированной РНК (мкг)	Доза (мг/кг)
Luc-ЛНЧ	ФБР	в/в	0,20	50	10	0,50
Luc-ЛНЧ	ФБР	в/м	0,20	50	10	0,50
Luc-ЛНЧ	ФБР	п/к	0,20	50	10	0,50
Luc-ФБР	ФБР	в/в	0,20	50	10	0,50

[001113] Получали снимки мышей, которым вводили препарат ЛНЧ люциферазы внутривенно и внутримышечно, через 2, 8, 24, 48, 120 и 192 часа, и снимки мышей, которым вводили препарат ЛНЧ люциферазы подкожно, получали через 2, 8, 24, 48 и 120 часов для определения экспрессии люциферазы, как показано в Табл. 81. В Табл. 81 «НТ» обозначает «не тестировали». За 20 минут до получения снимков, мышам вводят внутрибрюшинной инъекцией раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биолюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) для всей мышцы целиком.

Таблица 81.

Экспрессия люциферазы							
Препарат	Способ введения	Средняя экспрессия (фотоны/секунду)					
		2 часа	8 часов	24 часа	48 часов	120 часа	192 часа
Люцифераза-ЛНЧ	в/в	1,62E+08	3,00E+09	7,77E+08	4,98E+08	1,89E+08	6,08E+07
Люцифераза-ЛНЧ	в/м	4,85E+07	4,92E+08	9,02E+07	3,17E+07	1,22E+07	2,38E+06
Люцифераза-ЛНЧ	п/к	1,85E+07	9,79E+08	3,09E+08	4,94E+07	1,98E+06	НТ
Люцифераза-ФБР	в/в	3,61E+05	5,64E+05	3,19E+05	НТ	НТ	НТ

[001114] Одну мышь, которой препарат ЛНЧ вводили внутривенно, умерщвляют через 8 часов для определения экспрессии люциферазы в печени и селезенке. Еще одну мышь, которой вводили препарат ЛНЧ внутримышечно, умерщвляют через 8 часов для определения экспрессии люциферазы в мышце вокруг места инъекции, печени и селезенке. Как проиллюстрировано в Табл. 82, экспрессия наблюдалась в печени и селезенке после внутривенного и внутримышечного введения, а также в мышце вокруг места внутримышечной инъекции.

Таблица 82.

Экспрессия люциферазы в ткани	
ЛНЧ люциферазы: в/в введение	Экспрессия (фотоны/секунду)
Печень	7,984E+08
Селезенка	3,951E+08
ЛНЧ люциферазы: в/м введение	Экспрессия (фотоны/секунду)
Мышца вокруг места инъекции	3,688E+07
Печень	1,507E+08
Селезенка	1,096E+07

Пример 56. Исследования МКПК in vitro: процент модификации

[001115] Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные от 3-х нормальных доноров крови (D1, D2 и D3), трансфицируют 480 нг мРНК G-CSF, модифицированной 5-метилцитозинном (5 мС) и псевдоуридином (псевдо-U), или немодифицированной мРНК G-CSF с использованием 0,4 мкл Липофектамина 2000. мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) полностью модифицирована 5 мС и псевдо-U (100% модификация), не модифицирована 5 мС и псевдо-U (0% модификация) или частично модифицирована 5 мС и псевдо-U, таким образом, что мРНК содержит 75% модификацию, 50% модификацию или 25% модификацию. Контрольный образец люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5 мС и псевдо-U) также анализируют на предмет экспрессии G-CSF. Контрольные образцы Липофектамина 2000, LPS, R-848, люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5 мС и псевдо) и Р(И)Р(С) также анализируют на предмет TNF-альфа и интерферона-альфа. Супернатант собирают и анализируют методом ТИФА через 22 часа после трансфекции для определения экспрессии белка. Экспрессия G-CSF приведена в Табл. 83, и экспрессия интерферона-альфа и TNF-альфа приведена в Табл. 84. Экспрессия интерферона-альфа и TNF-альфа может быть вторичным эффектом трансфекции мРНК G-CSF. Табл. 83 и 84 демонстрируют, что степень химической модификации G-CSF, содержание IFN- α (интерферона-альфа) и опухолевого некротического фактора-альфа (TNF- α) является титруемым, если мРНК не полностью модифицирована, и тенденция титруемости не является одинаковой для каждой мишени.

[001116] Как упоминалось выше, с использованием МКПК в качестве системы анализа *in vitro* существует возможность установить корреляцию между трансляцией (в данном случае, выработкой белка G-CSF) и выработкой цитокинов (в данном случае примером является выработка белка интерферона-альфа). Более эффективная выработка белка коррелирует с более низкой индукцией активации природного иммунного пути, и, может быть принято эффективное решение относительно процента химической модификации на основе данного соотношения (Табл. 85). Как вычислено на основе данных Табл. 83 и 84 и приведено в Табл. 85, полная модификация 5-метилцитидином и псевдоуридином демонстрирует намного более благоприятное соотношение выработки белка/цитокина, чем в отсутствие модификации (природная мРНК G-CSF) (в 100 раз для интерферона-альфа и в 27 раз для TNF-альфа). Частичная модификация демонстрирует линейное соотношение, причем уменьшение степени модификации приводит к более низкому соотношению белок/цитокин.

Таблица 83.			
Экспрессия G-CSF			
	Экспрессия G-CSF (пг/мл)		
	D1	D2	D3
100% модификация	1968,9	2595,6	2835,7
75% модификация	566,7	631,4	659,5
50% модификация	188,9	187,2	191,9
25% модификация	139,3	126,9	102,0
0% модификация	194,8	182,0	183,3
Люцифераза	90,2	0,0	22,1
			Таблица 84.
Экспрессия интерферона-альфа и TNF-альфа			

	Экспрессия интерферона-альфа (пг/мл)			Экспрессия TNF-альфа (пг/мл)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100% модификация	336,5	78,0	46,4	115,0	15,0	ИЛ
75% модификация	339,6	107,6	160,9	107,4	21,7	11,8

5	50% модификация	478,9	261,1	389,7	49,6	24,1	10,4
	25% модификация	564,3	400,4	670,7	85,6	26,6	19,8
	0% модификация	1421,6	810,5	1260,5	154,6	96,8	45,9
	LPS	0,0	0,6	0,0	0,0	12,6	4,3
	R-848	0,5	3,0	14,1	655,2	989,9	420,4
	P(I)P(Q)	130,8	297,1	585,2	765,8	2362,7	1874,4
10	Только липид	1952,2	866,6	855,8	248,5	82,0	60,7

Таблица 85.

Соотношение белок/цитокин и влияние процента модификации

% Модификации	Средний уровень G-CSF (пг/мл)	Средний уровень IFN-α (пг/мл)	Средний уровень TNF-α (пг/мл)	Соотношение G-CSF/интерферон-альфа (соотношение б/ц)	Соотношение G-CSF/TNF-альфа (соотношение б/ц)	
15	100	2466	153	47	16	52
	75	619	202	47	зд	13
	50	189	376	28	0,5	6,8
	25	122	545	44	0,2	2,8
	0	186	1164	99	0,16	1,9

Пример 57. Трансфекция МКПК модифицированной РНК

[001117] Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные от 3-х нормальных доноров крови (D1, D2 и D3), трансфицируют 500 нг мРНК G-CSF, модифицированной 5-метилцитозинном (5 mC) и псевдоуридином (псевдо-U), или немодифицированной мРНК G-CSF с использованием 0,4 мкл Липофектамина 2000. мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) полностью модифицирована 5 mC и псевдо-U (100% модификация), не модифицирована 5 mC и псевдо-U (0% модификация) или частично модифицирована 5 mC и псевдо-U, таким образом, что мРНК содержит 50% модификацию, 25% модификацию, 10% модификацию, 5% модификацию, 1% модификацию или 0,1% модификацию. Контрольный образец mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5 mC и псевдо-U) и G-CSF (полностью модифицирован 5-метилцитозинном и псевдоуридином (контрольный G-CSF)) также анализируют на предмет экспрессии G-CSF. Контрольные образцы Липофектамина 2000, LPS, R-848, люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5 mC и псевдо) и P(I)P(C) также анализируют на предмет TNF-альфа и интерферона-альфа. Супернатант собирают через 6 часов и 18 часов после трансфекции и анализируют методом ТИФА для определения экспрессии белка. Экспрессия G-CSF, интерферона-альфа и TNF-альфа для Донора 1 приведена в Табл. 86, для Донора 2 приведена в Табл. 87 и для Донора 3 приведена в Табл. 88.

[001118] Полная 100% модификация 5-метилцитидином и псевдоуридином приводит к наиболее высокой трансляции белка (G-CSF) и наименьшему количеству цитокинов у всех 3-х доноров МКПК человека. Уменьшение степени модификации приводит к повышению выработки цитокинов (интерферона-альфа и TNF-альфа), что дополнительно акцентирует важность полной модификации для снижения уровня цитокинов и повышения эффективности трансляции белка (о чем свидетельствует

выработки G-CSF в данном эксперименте).

Таблица 86.						
Донор 1						
	G-CSF (пг/мл)		Интерферон-альфа (пг/мл)		TNF-альфа (пг/мл)	
	6 часов	18 часов	6 часов	18 часов	6 часов	18 часов
100% модификация	1815	2224	1	13	0	0
75% модификация	591	614	0	89	0	0
50% модификация	172	147	0	193	0	0
25% модификация	111	92	2	219	0	0
10% модификация	138	138	7	536	18	0
1% модификация	199	214	9	660	18	3
0,1% модификация	222	208	10	597	0	6
0% модификация	273	299	10	501	10	0
Контрольный G-CSF	957	1274	3	123	18633	1620
mCherry	0	0	0	10	0	0
Необработанные	н/о	н/о	0	0	1	1
Таблица 87.						
Донор 2						
	G-CSF (пг/мл)		Интерферон-альфа (пг/мл)		TNF-альфа (пг/мл)	
	6 часов	18 часов	6 часов	18 часов	6 часов	18 часов
100% модификация	2184	2432	0	7	0	11
75% модификация	935	958	3	130	0	0
50% модификация	192	253	2	625	7	23
25% модификация	153	158	7	464	6	6
10% модификация	203	223	25	700	22	39
1% модификация	288	275	27	962	51	66
0,1% модификация	318	288	33	635	28	5
0% модификация	389	413	26	748	1	253
Контрольный G-CSF	1461	1634	1	59	481	814
mCherry	0	7	0	1	0	0
Необработанные	н/о	н/о	1	0	0	0
Таблица 88.						
Донор 3						
	G-CSF (пг/мл)		Интерферон-альфа (пг/мл)		TNF-альфа (пг/мл)	
	6 часов	18 часов	6 часов	18 часов	6 часов	18 часов
100% модификация	6086	7549	7	658	11	11
75% модификация	2479	2378	23	752	4	35
50% модификация	667	774	24	896	22	18
25% модификация	480	541	57	1557	43	115
10% модификация	838	956	159	2755	144	123
1% модификация	1108	1197	235	3415	88	270
0,1% модификация	1338	1177	191	2873	37	363
0% модификация	1463	1666	215	3793	74	429
Контрольный G-CSF	3272	3603	16	1557	731	9066
mCherry	0	0	2	645	0	0
Необработанные	н/о	н/о	1	1	0	8

Пример 58. Исследование природного иммунного ответа в фибробластах ВJ
А. Одинарная трансфекция

[001119] Первичные фибробласты крайней плоти человека (фибробласты ВJ)
получают от Американской коллекции типовых культур (АКТК) (кат. № CRL-2522) и
культивируют в минимальной эссенциальной среде Игла (АКТК, кат. №30-2003) с
добавлением 10% сыворотки телячьего эмбриона при 37°C, до 5% CO₂. Фибробласты
ВJ высевают на 24-луночный планшет с плотностью 300000 клеток на лунку в 0,5 мл

питательной среды. 250 нг модифицированной мРНК G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) полностью модифицированной 5-метилцитозином и псевдоуридином (Gen1) или полностью модифицированной 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином (Gen2), содержащей Кэп 0, Кэп 1 или не содержащей кэпа, трансфицируют клетки с использованием Липофектамина 2000 (Invitrogen, кат. №11668-019) в соответствии с протоколом производителя. Контрольные образцы также трансфицируют поли I:C (PIC), Липофектаминам 2000 (Lipo), природной мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) и природной мРНК G-CSF. Клетки собирают через 18 часов, общую РНК отделяют и обрабатывают DNASE® с использованием набора RNeasy micro (кат. №74004) в соответствии с протоколом производителя. 100 нг общей РНК используют для синтеза кДНК с использованием набора для обратной транскрипции High Capacity cDNA Reverse Transcription (кат. №4368814) в соответствии с протоколом производителя. Далее кДНК анализируют на предмет экспрессии генов природного иммунного ответа с помощью качественной ПЦР в реальном времени с использованием SybrGreen в приборе Biorad CFX 384 в соответствии с протоколом производителя. В Табл. 89 приведен уровень экспрессии транскриптов природного иммунного ответа относительно ауто-гена ГФРТ (гипоксантин фосфорибозилтрансферазы) и выражен как кратность индукции по отношению к ГФРТ. Панель стандартных показателей в таблице включает: RIG-I - индуцибельный ретиновой кислотой ген 1, IL6 - интерлейкин-6, OAS-1 - олигоаденилатсинтетаза 1, IFN β - интерферон-бета, AIM2 отсутствует в меланоме-2, IFIT-1 - индуцируемый интерфероном белок с тетрапептидными повторами 1, PKR - протеинкиназа R, TNF α - опухолевый некротический фактор альфа, и IFN α - интерферон-альфа.

Таблица 89.									
Уровни транскрипта природного иммунного ответа									
Препарат	RIG-I	IL6	OAS-1	IFN β	AIM2	IFIT-1	PKR	TNF α	IFN α
Природная люцифераза	71,5	20,6	20,778	11,404	0,251	151,218	16,001	0,526	0,067
Природный G-CSF	73,3	47,1	19,359	13,615	0,264	142,011	11,667	1,185	0,153
PIC	30,0	2,8	8,628	1,523	0,100	71,914	10,326	0,264	0,063
G-CSF Gen1-UC	0,81	0,22	0,080	0,009	0,008	2,220	1,592	0,090	0,027
G-CSF Gen1-Кэп0	0,54	0,26	0,042	0,005	0,008	1,314	1,568	0,088	0,038
G-CSF Gen1-Кэп1	0,58	0,30	0,035	0,007	0,006	1,510	1,371	0,090	0,040
G-CSF Gen2-UC	0,21	0,20	0,002	0,007	0,007	0,603	0,969	0,129	0,005
G-CSF Gen2-Кэп0	0,23	0,21	0,002	0,0014	0,007	0,648	1,547	0,121	0,035
G-CSF Gen2-Кэп1	0,27	0,26	0,011	0,004	0,005	0,678	1,557	0,099	0,037
Липо	0,27	0,53	0,001	0	0,007	0,954	1,536	0,158	0,064

А. Повторная трансфекция

[001120] Первичные фибробласты крайней плоти человека (фибробласты VJ) получают от Американской коллекции типовых культур (АКТК) (кат. № CRL-2522) и культивируют в минимальной эссенциальной среде Игла (АКТК, кат. №30-2003) с добавлением 10% сыворотки телячьего эмбриона при 37°C, 5% CO $_2$. Фибробласты VJ высевают на 24-луночный планшет с плотностью 300000 клеток на лунку в 0,5 мл питательной среды. 250 нг модифицированной мРНК G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), немодифицированной, полностью

модифицированной 5-метилцитозином и псевдоуридином (Gen1) или полностью модифицированной 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином (Gen2) трансфицируют клетки ежедневно в течение 5 дней в соответствии с протоколом производителя. Контрольные образцы также трансфицируют Липофектамином 2000 (L2000) и мРНК mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитидином и псевдоуридином) ежедневно в течение 5 дней. Результаты приведены в Табл. 90.

[001121] Немодифицированная мРНК продемонстрировала цитокиновый ответ в форме интерферона-бета (IFN- β) и интерлейкина-6 (IL-6) через 1 день. мРНК, модифицированная по меньшей мере псевдоуридином, продемонстрировала цитокиновый ответ через 2-3 дня, тогда как мРНК, модифицированная 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином продемонстрировала сниженный ответ через 3-5 дней.

Таблица 90.

Цитокиновый ответ			
Препарат	Трансфекция	IFN- β (пг/мл)	IL-6 (пг/мл)
G-CSF немодифицированный	6 часов	0	3596
	День 1	1363	15207
	День 2	238	12415
	День 3	225	5017
	День 4	363	4267
	День 5	225	3094
G-CSF Gen 1	6 часов	0	3396
	День 1	38	3870
	День 2	1125	16341
	День 3	100	25983
	День 4	75	18922
	День 5	213	15928
G-CSF Gen 2	6 часов	0	3337
	День 1	0	3733
	День 2	,150	974
	День 3	213	4972
	День 4	1400	4122
	День 5	350	2906
mCherry	6 часов	0	3278
	День 1	238	3893
	День 2	113	1833

	День 3	413	25539
	День 4	413	29233
	День 5	213	20178
L2000	6 часов	0	3270
	День 1	13	3933
	День 2	388	567
	День 3	338	1517
	День 4	475	1594
	День 5	263	1561

Пример 59. Исследование по обнаружению природного иммунного ответа in vivo [001122] Самкам мышей BALB/C (n=5) вводят внутримышечной инъекцией мРНК G-CSF (немодифицированная мРНК G-CSF) (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности), содержащую 5' кэп; Кэп 1, мРНК G-CSF полностью

модифицированную 5-метилцитозинном и псевдоуридином (мРНК G-CSF 5 mc/pU), мРНК G-CSF, полностью модифицированную 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином, содержащую 5' кэп (G-CSF мРНК 5 mc/N1pU) или не содержащую 5' кэпа (G-CSF мРНК 5 mc/N1 pU без кэпа) или контроль R848 или 5% сахарозы, как раскрыто в Табл. 91.

5 Кровь собирают через 8 часов после введения дозы, методом ТИФА определяют уровни белка G-CSF и IFN- α (интерферона-альфа); результаты приведены в Табл. 81.

[001123] Как проиллюстрировано в Табл. 91, немодифицированная и модифицированная 5 mc/pU и 5 mc/N1pU мРНК G-CSF приводит к экспрессии G-CSF человека в сыворотке мыши. Модифицированная 5 mc/N1pU мРНК G-CSF без кэпа
10 продемонстрировала отсутствие экспрессии G-CSF человека в сыворотке, указывая на важность 5' кэп структуры для трансляции белка.

[001124] Как и ожидалось, белок G-CSF человека не экспрессируется в группах R848, только 5% сахарозы и у нелеченных животных. Важно, что наблюдаются значимые
15 отличия в выработке цитокинов, по данным измерения уровня интерферона-альфа в сыворотке мыши. Как и ожидалось, немодифицированная мРНК G-CSF демонстрирует устойчивый цитокиновый ответ *in vivo* (выше положительного контроля R848). Модифицированная 5 mc/pU мРНК G-CSF демонстрирует низкий, но обнаружимый цитокиновый ответ *in vivo*, тогда как модифицированная 5 mc/N1pU мРНК демонстрирует отсутствие обнаружимого интерферона-альфа в сыворотке (как и группа
20 растворителя или нелеченных животных).

[001125] Кроме того, ответ на модифицированную 5 mc/N1pU мРНК является одинаковым, независимо от наличия кэпа. Полученные результаты *in vivo* подтверждают вывод о том, что: 1) немодифицированная мРНК вызывает устойчивый природный
25 иммунный ответ, 2) указанный эффект снижается, но не устраняется полностью посредством введения 100% модификации 5 mc/pU, и 3) после введения модификации 5 mc/N1pU цитокиновый ответ не обнаруживается.

[001126] Наконец, с учетом того, что инъекционное введение осуществляли в 5% растворе сахарозы (который сам по себе не оказывает воздействия), полученные
30 результаты должны точно отображать иммуностимулирующий потенциал указанных модификаций.

[001127] Из полученных данных очевидно, что модифицированные N1pU молекулы приводят к выработке большего количества белка, одновременно оказывая
незначительное или не оказывая влияния на экспрессию интерферона-альфа. Также очевидно, что кэппинг необходим для выработки белка в случае данной химической
35 модификации. Соотношение белок/цитокин (б/ц) 748, по сравнению с соотношением б/ц для немодифицированной мРНК (б/ц=9), означает, что указанная химическая модификация является превосходящей, по сравнению с влиянием или биологическими эффектами, связанными с интерфероном-альфа.

40 Таблица 91.

G-CSF человека и интерферон-альфа в сыворотке мыши						
Препарат	Способ введения	Доза (мкг/мышь)	Доза (мкл)	Белок G-CSF (пг/мл)	Экспрессия интерферона-альфа (пг/мл)	Соотношение б/ц
Немодифицированная мРНК G-CSF	в/м	200	50	605,6	67,01	9
мРНК G-CSF 5 mc/pU	в/м	200	50	356,5	8,87	40
мРНК G-CSF 5 mc/N1pU	в/м	200	50	748,1	0	748
мРНК G-CSF 5 mc/N1pU без кэпа	в/м	200	50	6,5	0	6,5
R848	в/м	75	50	3,4	40,97	0,08
5% раствор сахарозы	в/м	-	50	0	1,49	0

Нелеченные	в/м	-	-	0	0	0
------------	-----	---	---	---	---	---

Пример 60: Введение модифицированной РНК in vivo

[001128] Выработку белка под действием модифицированной мРНК оценивают путем введения модифицированной мРНК G-CSF или модифицированной мРНК Фактора IX самкам крыс Спрег-Дуули (n=6). Крысам вводят инъекционно 400 мкг в 100 мкл мРНК G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированной 5-метилцитозином и псевдоуридином (G-CSF Gen1), мРНК G-CSF полностью модифицированной 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином (G-CSF Gen2) или мРНК Фактора IX (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) полностью модифицированной 5-метилцитозином и псевдоуридином (Фактор IX Gen1) в форме лиофилизата, растворяют в 5% растворе сахарозы. Кровь собирают через 8 часов после инъекции, и уровень белка G-CSF в сыворотке измеряют методом ТИФА. В Табл. 92 приведены уровни белка G-CSF в сыворотке через 8 часов.

[001129] Полученные результаты демонстрируют, что модифицированная мРНК G-CSF Gen 1 и G-CSF Gen 2 способна приводить к выработке белка G-CSF человека у крыс после одиной внутримышечной инъекции, и что эффективность выработки белка G-CSF человека повышается при использовании химической модификации Gen 2 более выражено, чем в случае химической модификации Gen 1.

Белок G-CSF в сыворотке крысы (введение в/м инъекцией)	
Препарат	Белок G-CSF(пг/мл)
G-CSF Gen1	19,37
G-CSF Gen2	64,72
Фактор IX Gen1	2,25

Пример 61. Стабильность модифицированной РНК

[001130] Эксперименты по изучению стабильности проводят для лучшего понимания условий хранения, позволяющих сохранить целостность модифицированной РНК. Немодифицированную мРНК G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и псевдоуридином мРНК G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) и полностью модифицированную 5-метилцитозином и псевдоуридином мРНК G-CSF в липоплексе, полученном с использованием 0,75% об/об RNAIMAX™ хранят при 50°C, 40°C, 37°C, 25°C, 4°C или -20°C. После хранения мРНК в течение 0 часов, 2 часов, 6 часов, 24 часов, 48 часов, 5 дней и 14 дней, мРНК анализируют гель-электрофорезом с использованием системы Bio-Rad EXPERION™. Модифицированную, немодифицированную и липоплексную мРНК G-CSF также хранят в RNASABLE® (Biomatrix, Inc., Сан-Диего, Калифорния) при 40°C или воде при -80°C или 40°C, выдерживая при этой температуре в течение 35 дней, после чего анализируют гель-электрофорезом.

[001131] Все образцы мРНК без стабилизатора являются стабильными через 2 недели после хранения при 4°C или -20°C. Модифицированная мРНК G-CSF, с липоплексом или без него, более стабильна, чем немодифицированная мРНК G-CSF, в условиях хранения при 25°C (стабильна до 5 дней против 48 часов), 37°C (стабильна до 24 часов

против 6 часов) и 50°C (стабильна до 6 часов против 2 часов). Немодифицированная мРНК G-CSF, модифицированная мРНК G-CSF, с липоплексом или без него, переносит 12 циклов замораживания/оттаивания.

5 [001132] Образцы мРНК, которые хранили в стабилизаторе при 40°C, через 35 дней продемонстрировали стабильность, подобную образцам мРНК, которые хранили в воде при -80°C, тогда как хранение мРНК в воде при 40°C показало интенсивное разложение через 18 дней.

10 [001133] Образцы мРНК, которые хранили при 4°C, 25°C и 37°C, находились в 1× буфере ТЭ или буферном растворе (150 мМ натрия хлорида, 2 мМ кальция хлорида, 2 мМ фосфата, 0,5 мМ ЭДТА, рН 6,5). мРНК, которую хранили при 4°C, является стабильной в ТЭ и буферном растворе по меньшей мере 60 дней. При 25°C мРНК в буферном препарате является стабильной 14 дней, и в буфере ТЭ - по меньшей мере 6 дней. Хранение мРНК в буферном растворе при 37°C демонстрирует стабильность в течение 6 дней, по сравнению с буфером ТЭ, в котором стабильность сохраняется 15 только до 4 дней.

Пример 62. Воздействие химических модификаций на экспрессию мРНК в составе препарата

20 [001134] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и 2'-фторуридином, вводят в солевой раствор или ДЛин-МС3-ДМА и вводят внутривенно, внутримышечно или подкожно грызунам в дозе 0,5 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,005 мг/кг и/или 0 0005 мг/кг. мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином 25 и псевдоуридином, вводят в ДЛин-МС3-ДМА и вводят внутримышечно или подкожно грызунам в дозе 0,5 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,005 мг/кг и/или 0 0005 мг/кг. Препараты ДЛин-МС3-ДМА анализируют перед введением для определения среднего размера частиц и зета потенциала. Снимки грызунов получают через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 72 часа, 96 часов, 144 часа и 168 часов после введения дозы, и биолюминесценцию измеряют в 30 фотонах за секунду для каждого способа введения и препарата.

Пример 63. Экспрессия мРНК в составе препарата ПМГК

А. Синтез и характеристика микросфер люциферазы ПМГК

35 [001135] мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином, модифицированную заменой 25% уридина на 2-тиоуридин и 25% цитозина на 5-метилцитозин, полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную псевдоуридином, растворяют в 1× буфере ТЭ, после чего вводят в микросферы ПМГК. Микросферы ПМГК 40 синтезируют с использованием методов двойной эмульсации вода/масло/вода, известных из уровня техники, с использованием ПМГК-эфирного кэпа (Lactel, кат. № В6010-2, внутренняя вязкость 0,55-0,75, МК/ГК 50:50), поливинилового спирта (ЛВС) (Sigma, кат. №348406-25G, М. м. 13-23 тысячи), дихлорметана и воды. Если коротко, 0,4 мл мРНК в буфере ТЭ с концентрацией 4 мг/мл (W1) добавляют к 2 мл ПМГК, растворенной 45 в дихлорметане (ДХМ) (O1), при концентрации ПМГК 200 мг/мл. Эмульсию W1/O1 гомогенизируют (ИКА Ultra-Turrax Homogenizer, T18) в течение 30 сек на скорости 5 (~19000 об/мин). Затем эмульсию W1/O1 добавляют к 250 мл 1% ПВС (W2) и гомогенизируют в течение 1 минуты на скорости 5 (~19000 об/мин). Препараты

перемешивают в течение 3 час, затем пропускают сквозь нейлоновый сетчатый фильтр с размером пор 100 мкм (Fisherbrand Cell Strainer, кат. №22-363-549) для удаления более крупных агрегатов, и в конце промывают центрифугированием (10 минут, 9250 об/мин, 4°C). Супернатант отбрасывают, и ПМГК гранулы ресуспендируют в 5-10 мл воды, повторяют 2х. После промывания и ресуспендирования в воде, образец 100-200 мкл микросфер ПМГК используют для измерения размера частиц препаратов методом лазерной дифракции (Malvern Mastersizer2000). Промытые препараты замораживают в жидком азоте и затем лиофилизируют в течение 2-3 дней.

[001136] После лиофилизации, ~10 мг МС ПМГК взвешивают, помещают в пробирки Эппендорфа емкостью 2 мл и нарушают структуру добавлением 1 мл ДХМ со встряхиванием образцов в течение 2-6 часов. мРНК экстрагируют из разрушенных микросфер ПМГК с помощью добавления 0,5 мл воды и встряхивания образца в течение ночи. Свободную мРНК люциферазы в буфере ТЭ (неструктурированный контроль) помещают в ДХМ, и осуществляют процесс разрушения структуры (деструктурированный контроль) для использования в качестве контрольных образцов в анализе трансфекции. Эффективность инкапсуляции, массовый процент нагрузки и размер частиц приведены в Табл. 93. Эффективность инкапсуляции вычисляют как количество мг мРНК, полученной в результате разрушения микросфер ПМГК, деленное на начальное количество мРНК, добавленной в препарат. Массовый процент нагрузки в препарате вычисляют как количество мг мРНК, полученной в результате разрушения микросфер ПМГК, деленное на начальное количество ПМГК, добавленной в препарат.

Таблица 93.					
Характеристики ПМГК					
Химические модификации	Образец №	Эффективность инкапсуляции (%)	Теоретическая нагрузка мРНК (% масс)	Фактическая нагрузка мРНК (% масс)	Размер частиц (D50, мкм)
Полностью модифицированная 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином	43-66А	45,8	0,4	0,18	33,4
	43-66В	29,6		0,12	27,7
	43-66С	25,5		0,10	27,1
Замена 25% уридина 2-тиоуридином и 25% цитозина 5-метилцитозинном	43-67А	34,6	0,4	0,14	29,9
	43-67В	22,8		0,09	30,2
	43-67С	23,9		0,10	25,1
Полностью модифицированная N1-метилпсевдоуридином	43-69А	55,8	0,4	0,22	40,5
	43-69В	31,2		0,12	41,1
	43-69С	24,9		0,10	46,1
Полностью модифицированная псевдоуридином	43-68-1	49,3	0,4	0,20	34,8
	43-68-2	37,4		0,15	35,9
	43-68-3	45,0		0,18	36,5

А. Экспрессия белка модифицированной мРНК, инкапсулированной в микросферы ПМГК

[001137] За день до трансфекции, 20000 клеток HeLa (АКТК № ССL-2; Манассас, Вирджиния) собирают с помощью обработки раствором трипсина-ЭДТА (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) и высевают в общем объеме 100 мкл среды ЕМЕМ (с добавкой 10% СТЭ и 1х Глутамакс) на лунку на 96-луночный планшет для культуры клеток (Corning, Манассас, Вирджиния). Клетки культивируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, на протяжении ночи. На следующий день, по 83 нг образцов разрушенных микросфер ПМГК мРНК люциферазы, деструктурированной контрольной мРНК люциферазы (деструктурированный контроль) или свободной контрольной мРНК люциферазы (неструктурированный контроль) разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк). Липофектамин 2000 (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) используют в качестве

реактива трансфекции; 0,2 мкл разбавляют до конечного объема 10 мкл OPTI-MEM. После 5 минут инкубации при комнатной температуре, оба раствора объединяют и инкубируют еще 15 минут при комнатной температуре. Далее 20 мкл объединенного раствора добавляют к 100 мкл питательной среды, содержащей клетки HeLa. После этого планшеты инкубируют, как было раскрыто выше.

[001138] Через 18-22 часа инкубации, клетки, экспрессирующие люциферазу, подвергают лизису с использованием 100 мкл буферного раствора для пассивного лизиса (Promega, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя. Аликвоты лизатов переносят на белые непрозрачные 96-луночные планшеты из полистирола (Corning, Манассас, Вирджиния) и объединяют со 100 мкл полного раствора для анализа люциферазы (Promega, Мэдисон, Висконсин). Фоновый сигнал планшетов без реактива составляет приблизительно 200 относительных световых единиц на лунку. В качестве устройства для считывания планшетов используют BioTek Synergy H1 (BioTek, Винуски, Вермонт).

[001139] Клетки собирают, и биолюминесценция (в относительных световых единицах, ОСЕ) для каждого образца приведена в Табл. 94. Трансфекцию указанных образцов подтверждают тем, что мРНК люциферазы с различными химическими модификациями по-прежнему способна экспрессировать белок люциферазы после введения в микросферы ПМГК.

Таблица 94.		
Химические модификации		
Химические модификации	Образец	Биолюминесценция (ОСЕ)
Полностью модифицированная 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином	Деструктурированный контроль	164266,5

	Неструктурированный контроль	113714
	43-66А	25174
	43-66В	25359
	43-66С	20060
Замена 25% уридина 2-тиоуридином и 25% цитозина 5-метилцитозином	Деструктурированный контроль	90816,5
	Неструктурированный контроль	129806
	43-67А	38329,5
	43-67В	8471,5
	43-67С	10991,5
Полностью модифицированная N1-метилпсевдоуридином	Деструктурированный контроль	928093,5
	Неструктурированный контроль	1512273,5
	43-69А	1240299,5
	43-69В	748667,5
	43-69С	1193314
Полностью модифицированная псевдоуридином	Деструктурированный контроль	154168
	Неструктурированный контроль	151581
	43-68-1	120974,5
	43-68-2	107669
	43-68-3	97226

Пример 64. Исследования Фактора IX in vitro

А. Бессывороточные среды

[001140] мРНК Фактора IX человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) используют для трансфекции в бессывороточной среде. Супернатант культуры клеток собирают и расщепляют трипсином, после чего осуществляют 2-

мерное разделение пептидов методом ВЭЖХ. Для обнаружения пептидов применяют матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию. Обнаружены 8 пептидов, 7 из которых являются уникальными для Фактора IX. Полученные результаты указывают на то, что трансфекция мРНК в бессывороточной среде создает возможность

5 для экспрессии полноразмерного белка Фактора IX.

Б. Клетки почки эмбриона человека (НЕК) 293А

[001141] 250 нг кодон-оптимизированной мРНК Фактора IX человека

(последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 10; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном; хвост поли-А длиной

10 приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1)

трансфицируют клетки НЕК 293А (150000 клеток/лунку) с использованием

Липофектамина 2000 в МДСИ, содержащей 10% СТЭ. Трансфекционные комплексы извлекают через 3 часа после трансфекции. Клетки собирают через 3, 6, 9, 12, 24, 48 и

15 72 часа после трансфекции. Общую РНК выделяют и используют для синтеза кДНК.

кДНК анализируют методом количественной ПЦР в реальном времени с

использованием набора специфичных праймеров для кодон-оптимизированного

Фактора IX. Уровень гипоксантинфосфорибозилтрансферазы 1 (ГФРТ) используют для нормализации. Данные наносят на график как процент обнаружимой мРНК,

принимая уровень мРНК за 100% в точке времени 3 часа. Период полувыведения мРНК

20 Фактора IX, полностью модифицированной 5-метилцитозинном и псевдоуридинном, из клеток почки эмбриона человека 293 (НЕК293) составляет приблизительно 8-10 часов.

Пример 65. Раствор соли: подкожное введение

[001142] Модифицированную мРНК G-CSF человека (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов

25 не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) и модифицированную мРНК ЭПО человека

(последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1;

30 полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) вводят в раствор соли и вводят мышам внутримышечной (в/м) инъекцией в дозе 100 мкг.

[001143] Контроль включает люциферазу (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в

последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) или буферный раствор (Ф. Буфер). У мышей отбирают образцы

35 крови через 13 часов после инъекции для определения концентрации человеческого полипептида в сыворотке (пг/мл). (В группах G-CSF измеряют G-CSF человека в сыворотке мыши, и в группах ЭПО измеряют ЭПО человека в сыворотке мыши).

Данные приведены в Табл. 95.

Данные приведены в Табл. 95.

[001144] мРНК быстро разлагается в сыворотке в отсутствие препарата, что наводит

40 на мысль о введении мРНК в лекарственную форму как наилучшем способе доставки мРНК, обеспечивающим более длительное нахождение в системе. Как проиллюстрировано в Табл. 95, мРНК может быть введена подкожно, с использованием только буферного раствора.

45 Таблица 95.

Схема введения				
Группа	Препарат	Объем дозы (мкл/мышь)	Растворитель	Средний уровень белкового продукта в сыворотке (пг/мл)
G-CSF	G-CSF	100	Ф. Буфер	45
G-CSF	Люцифераза	100	Ф. Буфер	0

G-CSF	Ф.Буфер	100	Ф. Буфер	2,2
ЭПО	ЭПО	100	Ф. Буфер	72,03
ЭПО	Люцифераза	100	Ф. Буфер	26,7
ЭПО	Ф. Буфер	100	Ф. Буфер	13,05

5 Пример 66. Стабильность наночастиц в препаратах [001145] Для препаратов ДЛин-КС2-ДМА, Teta-5-Lap, ДЛин-ДМА, ДЛин-К-ДМА, С12-200, ДЛин-МС3-ДМА с соотношением липид/мРНК 20:1 оценивают размер частиц, индекс полидисперсности и эффективность инкапсуляции с точки зрения стабильности при комнатной температуре. Большинство наночастиц являются стабильными при
10 комнатной температуре в течение по меньшей мере одного месяца, как проиллюстрировано в Табл. 96 и 97.

15 Таблица 96.

Размер частиц и индекс полидисперсности					
Препарат №	Липид	Время			
		0 часов	24 часа	48 часов	30 дней
NPA-003-4	ДЛин-КС2-ДМА	112 нм	110 нм	103 нм	104 нм
		ИПД: 0,05	ИПД: 0,06	ИПД: 0,09	ИПД: 0,08
NPA-006-2	Teta-5-Lap	95 нм	95 нм	95 нм	100 нм
		ИПД: 0,09	ИПД: 0,12	ИПД: 0,10	ИПД: 0,11
NPA-012-1	ДЛин-ДМА	90 нм	87 нм	89 нм	82 нм
		ИПД: 0,09	ИПД: 0,07	ИПД: 0,08	ИПД: 0,08
NPA-013-1	ДЛин-К-ДМА	92 нм	91 нм	96 нм	91 нм
		ИПД: 0,07	ИПД: 0,06	ИПД: 0,05	ИПД: 0,06
NPA-014-1	С12-200	99 нм	98 нм	99 нм	94 нм
		ИПД: 0,06	ИПД: 0,09	ИПД: 0,07	ИПД: 0,07
NPA-015-1	ДЛин-МС3-ДМА	106 нм	100 нм	100 нм	99 нм
		ИПД: 0,07	ИПД: 0,06	ИПД: 0,05	ИПД: 0,05

Таблица 97.

Эффективность инкапсуляции					
Препарат №	Липид	Время			
		0 часов	24 часа	48 часов	30 дней
NPA-003-4	ДЛИН-КС2-ДМА	100%	98%	100%	100%
NPA-006-2	Teta-5-Lap	99%	100%	100%	100%
NPA-012-1	ДЛин-ДМА	100%	100%	100%	100%
NPA-013-1	ДЛин-К-ДМА	83%	85%	96%	100%
NPA-014-1	С12-200	88%	93%	90%	96%
NPA-015-1	ДЛин-МС3-ДМА	100%	99%	100%	100%

35 Пример 67. Введение в стекловидное тело

[001146] Модифицированную мРНК mCherry (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 7; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридином) и модифицированную мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозинном и псевдоуридином) в солевом растворе вводят в стекловидное тело крыс, как раскрыто в Табл. 98. Образец сравнивают с контролем
40 солевого раствора, введенного в стекловидное тело.

45 Таблица 98.

Схема введения

Группа №	Уровень дозы (мкг модифицированной РНК/глаз)	Объем дозы (мкл/глаз)	Препарат	
			правый глаз (OD)	левый глаз (OS)
Контрольная	0	5	буферный раствор	буферный раствор
Модифицированная РНК в буфере для введения	10	5	mCherry	люцифераза

[001147] Препарат вводят в левый или правый глаз каждого животного в 1-й день, пока животное находится под анестезией. В день перед введением глазную мазь или раствор гентамицина дважды наносят в оба глаза. Глазную мазь или раствор гентамицина также наносят непосредственно перед инъекцией и на следующий день после инъекции. Перед введением, мидриатические капли (1% тропикамид и/или 2,5% фенилэфрин) вводят в каждый глаз.

[001148] Через 18 часов после введения, глаза, в которые вводили mCherry и буферный раствор, извлекают, и каждый глаз по отдельности помещают на ночь в пробирку, содержащую 10 мл 4% параформальдегида, при комнатной температуре для фиксации ткани. На следующий день глаза по отдельности переносят в пробирки, содержащие 10 мл 30% раствора сахарозы и хранят при 21°C до обработки и изготовления срезов. Препараты различных срезов оценивают с помощью F-микроскопии. Положительная экспрессия наблюдается в препаратах, полученных из тканей глаз, в которые вводили модифицированную мРНК mCherry, и контрольные препараты показывают отсутствие экспрессии.

Пример 68. Исследование экспрессии цитокинов *in vivo*

[001149] Мышам вводили внутримышечной инъекцией 200 мкг модифицированной мРНК G-CSF (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности), не содержащей 5' кэпа, содержащей Кэп 1 (немодифицированный), полностью модифицированной 5-метилцитозином и псевдоуридином и содержащей 5' кэп (Кэп 1, Gen1), или полностью модифицированной 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином и содержащей 5' кэп (Кэп 1, Gen2), или не содержащей кэпа (Gen2 без кэпа). Также анализируют контрольные образцы R-848, 5% раствора сахарозы и образцы нелеченных мышей. Через 8 часов сыворотку мышей собирают и анализируют на предмет экспрессии интерферона-альфа (IFN- α). Результаты приведены в Табл. 99.

Экспрессия интерферона-альфа	
Препарат	Интерферон-альфа (пг/мл)
Немодифицированный G-CSF	67,012
G-CSF Gen1	8,867
G-CSF кэп Gen2	0
G-CSF Gen2 без кэпа	0
R-848	40,971
5% раствор сахарозы	1,493
Нелеченные	0

Пример 69. Экспрессия модифицированной мРНК VEGF *in vitro*

[001150] Клетки HEK293 трансфицируют комплексом модифицированной мРНК (ммРНК) VEGF-A (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 19; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) и Липофектамина 2000 производства Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) в концентрации, приведенной в Табл. 100. Экспрессию белка обнаруживают методом ТИФА, и содержание белка (пг/мл) приведено в Табл. 100.

Таблица 100.								
Экспрессия белка								
Количество для трансфекции	10 нг	2,5 нг	625 пг	156 пг	39 пг	10 пг	2 пг	610 фг
Белок (пг/мл)	10495	10038	2321,23	189,6	0	0	0	0

5 Пример 70. Скрининг клеток HeLa с помощью ЗФБ in vitro

[001151] За день до трансфекции 20000 клеток HeLa (АКТК № CCL-2; Манассас, Вирджиния) собирают с помощью обработки раствором трипсина/ЭДТА (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) и высевают в общем объеме 100 мкл среды ЕМЕМ (с добавлением 10% СТЭ и 1× Глутамакс) на лунку на 96-луночный планшет для культуры клеток (Corning, Манассас, Вирджиния). Клетки культивируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, на протяжении ночи. На следующий день, по 37,5 нг или 75 нг модифицированной мРНК зеленого флуоресцирующего белка (ЗФБ) (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 18; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), содержащей химическую модификацию, раскрытую в Табл. 101, разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк). В качестве реактива трансфекции используют Липофектамин 2000 (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк), 0,2 мкл разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ. Через 5 минут инкубации при комнатной температуре, оба раствора объединяют и инкубируют еще 15 минут при комнатной температуре. Далее 20 мкл объединенного раствора добавляют к 100 мкл питательной среды, содержащей клетки HeLa, и инкубируют при комнатной температуре.

[001152] Через 18-22 часа инкубации, клетки, экспрессирующие люциферазу, подвергают лизису с использованием 100 мкл буферного раствора для пассивного лизиса (Promega, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя. Аликвоты лизатов переносят на белые непрозрачные 96-луночные планшеты из полистирола (Corning, Манассас, Вирджиния) и объединяют со 100 мкл полного раствора для анализа люциферазы (Promega, Мэдисон, Висконсин). Среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) определяют для каждой химической модификации; результаты приведены в Табл. 101.

[001153] Полученные результаты демонстрируют, что мРНК ЗФБ, полностью модифицированная N1-метилпсевдоуридином и 5-метилцитозином, приводит к выработке большего количества белка в клетках HeLa по сравнению с другими химическими модификациями. Кроме того, введение более высокой дозы мРНК ЗФБ в клетки приводило к самому высокому значению СИФ.

Таблица 101.		
Средняя интенсивность флуоресценции		
Химическая модификация	37,5 нг	75 нг
	СИФ	СИФ
Без модификации	97400	89500
5-Метилцитозин/псевдоурин	324000	715000
5-Метилцитозин/N1-метилпсевдоурин	643000	1990000

45 Пример 71. Исследования токсичности

А. Дизайн исследования

[001154] Крысам Спрег-Доули (n=8, 4 самца, 4 самки) инъекционно вводят модифицированную мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином

и псевдоуридином), как приведено кратко в схеме введения в Табл. 102. Контрольной группе вводят буферный раствор (Ф. Буфер). Через 7 дней крыс умерщвляют.

Таблица 102.			
Схема введения			
Препарат	Доза мРНК (мкг)	Объем дозы (мл)	Концентрация дозы (мг/мл)
Люцифераза	100	0,1	0
Люцифераза	300	0,1	1,0
Люцифераза	1000	0,1	3,0
Люцифераза	3×1000	0,3 (каждая доза по 0,1)	10
Ф.Буфер	0		10

Б. Набор массы тела и потребление пищи

[001155] Крыс взвешивают перед введением мРНК и через 7 дней после введения. В Табл. 103 приведено среднее увеличение массы тела и % увеличения массы тела в экспериментальной группе, разделенные по полу. У всех животных масса тела продолжала увеличиваться и наблюдалось нормальное поведение. Каждая из проанализированных групп потребляла приблизительно одинаковое количество корма в ходе исследования.

Таблица 103.		
Увеличение массы тела		
Группа	Средняя масса тела (г)	Увеличение массы тела (%)
100 мкг	16,875	6,5
300 мкг	22,125	8,3
1000 мкг	19	6,95
3×1000 мкг	20,375	7,7
Ф. Буфер	18,75	6,8

В. Электролиты

[001156] Через 7 дней крыс умерщвляют, и отбирают образцы для определения электролитов. Анализируют уровни кальция, бикарбоната, калия, фосфора, хлорида и натрия в каждой группе. Результаты приведены в Табл. 104. Через 7 дней у крыс не наблюдалось изменения уровня электролитов.

Таблица 104.						
Электролиты						
Группа	Кальций (мг/дл)	Бикарбонат (мЭкв/л)	Калий (мЭкв/л)	Фосфор (мг/дл)	Хлорид (мЭкв/л)	Натрий (мЭкв/л)
100 мкг	9,8	19,9	4,7	8,3	101,0	139,6
300 мкг	9,8	23,3	4,4	8,2	100,5	139,6
1000 мкг	10,6	22,5	5,2	9,1	101,0	138,8
3×1000 мкг	10,2	22,6	4,6	8,11	100,4	138,8
Ф. Буфер	9,6	20,1	5,4	9,2	99,5	139,9

Г. Гематология

[001157] Через 7 дней крыс умерщвляют, и отбирают образцы для определения гематологических показателей. Для каждой группы определяют содержание эритроцитов (RBC), гематокрита (HGT), средний клеточный объем (СКО), гемоглобин (HGB), средний клеточный гемоглобин (СКГ) и среднюю клеточную концентрацию гемоглобина (СККГ). Результаты приведены в Табл. 105. Через 7 дней после введения не наблюдалось изменений количества клеток крови или уровней факторов свертывания крови.

Таблица 105.	
Гематология	

Группа	RBC (млн/мкл)	нет (%)	СКО (Фл)	HGB (г/дл)	СКГ (пг)	СККГ (г/дл)
100 мкг	7,5	44,1	58,7	14,7	19,5	3,4
300 мкг	7,3	43,5	59,6	14,5	19,8	33,3
1000 мкг	7,2	42,5	58,8	14,2	19,55	33,3
3×1000 мкг	7,2	43,5	60,6	14,4	20,0	33,1
Ф. Буфер	8,0	46,6	58,0	15,5	19,3	33,4

Д. Лейкоциты

[001158] Через 7 дней крыс умерщвляют, и отбирают образцы для определения количества лейкоцитов. Для каждой группы определяют количество нейтрофилов (% сегментированных нейтрофилов), моноцитов, базофилов, лимфоцитов, эозинофилов и лейкоцитов (белых кровяных клеток, WBC). Результаты приведены в Табл. 106. В Табл. 106 «НТ» обозначает «не тестировали». Через 7 дней после введения не наблюдалось увеличения количества лейкоцитов, что наводит на мысль об отсутствии воспаления.

Таблица 106.						
Лейкоциты						
Группа	Нейтрофилы (NEU-SEG %)	Моноциты (MON %)	Базофилы (BASO %)	Лимфоциты (LYM %)	Эозинофилы (EOS %)	WBC (тыс/мкл)
100 мкг	10,6	2,0	0,4	85,9	1,3	14
300 мкг	12,0	2,8	0,4	83,6	1,0	10,2
1000 мкг	12,8	2,3	НТ	83,0	1,5	10,7
3×1000 мкг	11,6	2,0	0,1	85,5	0,9	10,9
Ф. Буфер	16,6	2,3	0,9	79,6	0,9	13,0

Е. Химические показатели сыворотки

[001159] Через 7 дней крыс умерщвляют, и отбирают образцы для определения химических показателей сыворотки. Для каждой группы определяют уровень щелочной фосфатазы (ЩФ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и креатинфосфокиназы (КФК). Результаты приведены в Табл. 107.

Таблица 107.				
Химические показатели сыворотки				
Группа	ЩФ (МЕ/л)	АсАТ (МЕ/л)	АЛТ (МЕ/л)	КФК (МЕ/л)
100 мкг	144,4	198,3	60,8	488,1
300 мкг	169,5	200,3	49,3	968,3
1000 мкг	150,5	189,8	51,5	744
3×1000 мкг	152,0	14,3	45,9	481,1
Ф. Буфер	183	170,4	62,8	589,8

Ж. Печеночные белки

[001160] Через 7 дней крыс умерщвляют, и отбирают образцы для определения уровней печеночных белков. Для каждой группы определяют уровень альбумина, глобулина и общего белка. Результаты приведены в Табл. 108. Через 7 дней после введения модифицированной мРНК на наблюдалось изменений печеночных ферментов или выработки печеночных белков.

Таблица 108.			
Гематология			
Группа	Альбумин (г/дл)	Глобулин (г/дл)	Общий белок (г/дл)
100 мкг	3,3	2,5	5,8
300 мкг	3,2	2,4	5,6
1000 мкг	3,2	2,7	5,9
3×1000 мкг	3,4	2,6	6,0
Ф. Буфер	3,6	2,6	6,2

3. Выводы

[001161] Анализ состояния крыс через 7 дней после введения модифицированной мРНК продемонстрировал, что введение высоких доз мРНК не приводит к побочным эффектам. По данным проведенного анализа, дозы, в 30 раз превышающие эффективные, по-видимому, являются безопасными. Гистопатологическое исследование продемонстрировало только минимальное воспаление в месте инъекции, и единственные изменения в месте инъекции согласовались с инъекцией, не указывая на связанные с введением дозы явления. Кроме того, ничего в картине мышечных ферментов не наводило на мысль о повреждении мышцы.

10 Пример 72. Условия хранения модифицированной РНК

А. Органические вещества

[001162] Для оценки способности мРНК сохраняться в органической среде, мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) хранят при комнатной температуре в растворах этанола, метанола или дихлорметана в концентрации 1 мг/мл. Образцы отбирают через 1 час, 6 часов и 1 день. Образец разбавляют водой до концентрации 200 нг/мкл и инкубируют в течение ночи при комнатной температуре под вытяжкой для выпаривания органического растворителя. Контрольные образцы хранят параллельно с мРНК в воде (водный контроль, органически). мРНК является стабильной при комнатной температуре в течение 1 дня в каждом из растворов, как определено анализом образцов на биоанализаторе.

Б. Водный растворитель

[001163] мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная псевдоуридином и 5-метилцитозином) добавляют к 3 различным буферным растворам и воде для оценки влияния водных растворителей на стабильность мРНК. мРНК добавляют к цитратному буферу (рН 3, 100 мМ лимонная кислота), буферизованному фосфатом солевому раствору (ФБР) (рН 7,4, 6,7 мМ фосфата и 154 мМ натрия хлорида), буферу ТЭ (рН 8, 10 мМ Трис-хлористоводородной кислоты и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты) или воде (рН 5,5, вода для инъекций (ВДИ)) в концентрации 1 мг/мл. Образцы отбирают через 1 час, 6 часов и 1 день и разбавляют водой до концентрации 200 нг/мкл.

Контрольные образцы хранят параллельно с мРНК в воде (водный контроль, водный). Инкубация мРНК в ФБР, буфере ТЭ и воде не влияет на целостность мРНК через 1 день. Образцы, инкубированные в цитратном буфере, не поддавались обнаружению с помощью биоанализатора.

[001164] В дополнительных исследованиях для оценки цитратного буфера, оценивают цитратные буферные растворы с рН 2, 3 и 4, каждый из которых содержит 10 мМ цитрата и 1 мг/мл мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная псевдоуридином и 5-метилцитозином). При рН 2 осаждение было видимым, и мРНК не обнаруживалась биоанализатором при рН ниже 4. При сравнении с фосфатным буфером, мРНК не обнаруживалась в образцах с низким рН, и осаждение было видимым в фосфатном буфере для образцов с рН 2.

С. рН

[001165] Для исследования влияния рН на стабильность мРНК, мРНК люциферазы

(последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная псевдоуридином и 5-метилцитозином) хранят при комнатной температуре в водных буферных растворах с рН 5,8, 6,5 или 7,2. Образцы отбирают через 1 час, 1 день и 1 неделю после добавления мРНК к образцу рН. После отбора, образцы инкубируют в концентрации 1 мг/мл, и затем разбавляют до концентрации 200 нг/мкл водой, после чего замораживают и характеризуют с помощью биоанализатора. мРНК является стабильной через 1 неделю хранения при комнатной температуре в оцененном интервале рН 5,8-7,2.

10 Г. Замораживание/оттаивание и лиофилизация

[001166] Для оценки эффекта циклов замораживания/оттаивания на стабильность мРНК, мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) в 15 буферном растворе обрабатывают множественными циклами замораживания/оттаивания. Обнаружено, что мРНК является стабильной по меньшей мере в течение 18 циклов.

[001167] Кроме того, мРНК люциферазы (мРНК SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; 20 полностью модифицированная 5-метилцитозином и псевдоуридином) подвергают 3-м кругам лиофилизации для проверки стабильности мРНК. мРНК добавляют к воде, и отбирают образцы после каждого из 3 кругов лиофилизации. Высушенную мРНК разбавляют водой до концентрации 1 мг/мл. Образцы хранят в замороженном виде до характеристики с помощью биоанализатора в концентрации 200 нг/мкл. Контрольные 25 образцы хранят параллельно с мРНК и водными препаратами, и подвергают их таким же циклам замораживания и оттаивания. Обнаружено, что мРНК является стабильной после 3 циклов лиофилизации, по данным характеристики с помощью биоанализатора в концентрации 200 нг/мкл.

Д. Центрифугирование

30 [001168] Для оценки влияния центрифугирования на целостность мРНК, мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; 5-метилцитозин и псевдоуридин) в воде при концентрации 1 мг/мл обрабатывают 10 35 циклами при 10000 об/мин (13,3 тысячи × g) в течение 10 минут при 4°C. мРНК и водные образцы хранят при 4°C в качестве контроля при центрифугировании. После 10 циклов центрифугирования мРНК остается стабильной, по данным анализа с помощью биоанализатора в концентрации 200 нг/мкл.

Е. Трансфекция *in vitro* после хранения

[001169] За день до трансфекции, 20000 клеток HeLa (АКТК № CCL-2; Манассас, 40 Вирджиния) собирают с помощью обработки раствором трипсина-ЭДТА (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) и высевают в общем объеме 100 мкл среды ЕМЕМ (с добавлением 10% СТЭ и 1× Глутамакс) на лунку на 96-луночный планшет для культуры клеток (Corning, Манассас, Вирджиния). Клетки культивируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, на протяжении ночи. На следующий день, 250 нг 45 мРНК люциферазы из препаратов лиофилизированных, центрифугированных образцов с органическим или водным растворителем разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк). Липофектамин 2000 (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) используют в качестве реактива

трансфекции; 0,2 мкл разбавляют до конечного объема 10 мкл OPTI-MEM. После 5 минут инкубации при комнатной температуре, оба раствора объединяют и инкубируют еще 15 минут при комнатной температуре. Далее 20 мкл объединенного раствора добавляют к 100 мкл питательной среды, содержащей клетки HeLa. После этого

5 планшеты инкубируют, как было раскрыто выше.

[001170] Через 18-22 часа инкубации, клетки, экспрессирующие люциферазу, подвергают лизису с использованием 100 мкл буферного раствора для пассивного лизиса (Promega, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя. Аликвоты лизатов переносят на белые непрозрачные 96-луночные планшеты из

10 полистирола (Corning, Манассас, Вирджиния) и объединяют со 100 мкл полного раствора для анализа люциферазы (Promega, Мэдисон, Висконсин). Фоновый сигнал планшетов без реактива составляет приблизительно 200 относительных световых единиц на лунку. В качестве устройства для считывания планшетов используют BioTek Synergy H1 (BioTek, Винуски, Вермонт).

15 [001171] Также оценивают контрольные образцы холостой трансфекции (только реактив трансфекции), контрольный образец мРНК люциферазы в воде и необработанные образцы. Клетки собирают, и средняя биолуминесценция (в относительных световых единицах, ОСЕ) для каждого сигнала приведена в Табл. 109. Трансфекцию указанных образцов подтверждают тем, что лиофилизация,

20 центрифугирование, органические растворители и водные растворители, за исключением цитратного буфера, не влияют на активность мРНК люциферазы. Цитратный буфер демонстрирует сниженную активность после трансфекции.

Таблица 109.

Биолуминесценция	
Образец	Биолуминесценция (ОСЕ)
1 лиофилизация	2832350
1 лиофилизация контроль	3453250
2 лиофилизации	2480000
2 лиофилизации контроль	3716130
3 лиофилизации	1893960
3 лиофилизации контроль	3009020
Центрифугирование, 10 циклов	3697590
Центрифугирование контроль	5472920
Этанол, 1 день	4214780
Метанол, 1 день	2834520
35 Дихлорметан, 1 день	3017890
Водный контроль, органический, 1 день	2641450
Цитратный буфер, 1 час	280160
ФБР, 1 час	2762050
Буфер ТЭ, 1 час	3141250
Водный контроль, водный, 1 час	3394000
40 Цитратный буфер, 1 день	269790
ФБР, 1 день	4084330
Буфер ТЭ, 1 день	5344400
Водный контроль, водный, 1 день	3579270
Необработанный	5580
Холостая трансфекция	7560
45 Контрольная мРНК люциферазы	4950090

Пример 73. Гомогенизация

[001172] Различные растворы мРНК люциферазы (как раскрыто в Табл. 110, где «X» обозначает раствор, содержащий указанный компонент) (последовательность мРНК

представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и псевдоуридином) оценивают для определения процентного выхода из различных растворов, целостности мРНК по данным биоанализатора и экспрессии белка мРНК после трансфекции *in vitro*. Растворы мРНК получают в воде, 1× буфере ТЭ в концентрации 4 мг/мл, как проиллюстрировано в Табл. 110, и добавляют к дихлорметану (ДХМ) или ДХМ, содержащему 200 мг/мл поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (ПМГК) (Lactel, кат. № В6010-2, внутренняя вязкость 0,55-0,75, МК/ГК 50: 50), с получением конечной концентрации мРНК 0,8 мг/мл. Растворы, требующие гомогенизации, гомогенизируют в течение 30 секунд на скорости 5 (приблизительно 19000 об/мин) (IKA Ultra-Turrax Homogenizer, T18). Образцы мРНК в воде, дихлорметане и поли(молочной-со-гликолевой кислоте) (ПМГК) не поддаются извлечению (НПИ). Во всех образцах, за исключением образцов НИ, сохранялась целостность мРНК, по данным биоанализатора (Bio-rad Experion).

[001173] За день до трансфекции, 20000 клеток HeLa (АКТК № ССL-2; Манассас, Вирджиния) собирают с помощью обработки раствором трипсина-ЭДТА (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) и высевают в общем объеме 100 мкл среды ЕМЕМ (с добавкой 10% СТЭ и 1× Глутамакс) на лунку в 96-луночный планшет для культуры клеток (Corning, Манассас, Вирджиния). Клетки культивируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, на протяжении ночи. На следующий день, по 250 нг мРНК люциферазы из поддающихся извлечению образцов разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк). Липофектамин 2000 (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) используют в качестве реактива трансфекции; 0,2 мкл разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ. После 5 минут инкубации при комнатной температуре, оба раствора объединяют и инкубируют еще 15 минут при комнатной температуре. Далее 20 мкл объединенного раствора добавляют к 100 мкл питательной среды, содержащей клетки HeLa. После этого планшеты инкубируют, как было раскрыто выше. Также оценивают контрольную мРНК люциферазы (мРНК люциферазы в солевом растворе) (Контроль) и необработанные клетки (Необработанные). Клетки собирают, и средняя биолюминесценция (в фотонах/секунду) для каждого сигнала также приведена в Табл. 110. Все поддающиеся извлечению образцы в анализе продемонстрировали активность мРНК люциферазы.

[001174] Через 18-22 часа инкубации клетки, экспрессирующие люциферазу, подвергают лизису с использованием 100 мкл буферного раствора для пассивного лизиса (Promega, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя. Аликвоты лизатов переносят на белые непрозрачные 96-луночные планшеты из полистирола (Corning, Манассас, Вирджиния) и объединяют со 100 мкл полного раствора для анализа люциферазы (Promega, Мэдисон, Висконсин). Фоновый сигнал планшетов без реактива составляет приблизительно 200 относительных световых единиц на лунку. В качестве устройства для считывания планшетов используют BioTek Synergy H1 (BioTek, Винуски, Вермонт).

[001175] Клетки собирают, и средняя биолюминесценция (в относительных световых единицах, ОСЕ) для каждого образца приведена в Табл. 110. Все поддающиеся извлечению образцы в анализе продемонстрировали активность мРНК люциферазы.

Таблица 110.
Растворы

Раствор №	Вода	1× Буферный раствор ТЭ	ДХМ	ДХМ/ПМГК	Гомогенизатор	Выход (%)	Биоломинесценция (ОСЕ)
1	X					96	5423780
2		X			X	95	4911950
3	X				X	92	2367230
4		X			X	90	4349410
5	X		X		X	66	4145340
6		X	X		X	71	3834440
7	X			X	X	НПИ	н/о
8		X		X	X	24	3182080
9	X			X		НПИ	н/о
10		X		X		79	3276800
11	X		X			79	5563550
12		X	X			79	4919100
Контроль							2158060
Необработанные							3530

Пример 74. Оценка буферного раствора ТЭ и воды

[001176] мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозин и псевдоуридин) растворяют в воде или буферном растворе ТЭ, как коротко описано в Табл. 111, после чего вводят в микросферы ПМГК. Микросферы ПМГК синтезируют с использованием методов двойной эмульгации вода/масло/вода, известных из уровня техники, с использованием ПМГК-эфирного кэпа (Lactel, кат. № В6010-2, внутренняя вязкость 0,55-0,75, МК/ГК 50:50), поливинилового спирта (ПВС) (Sigma, кат. №348406-25G, М. м. 13-23 тысячи), дихлорметана и воды. Если коротко, 0,2-0,6 мл мРНК в воде или буфере ТЭ с концентрацией от 2 до 6 мг/мл (W1) добавляют к 2 мл ПМГК, растворенной в дихлорметане (ДХМ) (O1), при концентрации ПМГК 100 мг/мл. Эмульсию W1/O1 гомогенизируют (IKA Ultra-Turrax Homogenizer, T18) в течение 30 секунд на скорости 5 (~19000 об/мин). Затем эмульсию W1/O1 добавляют к 250 мл 1% ПВС (W2) и гомогенизируют в течение 1 минуты на скорости 5 (~19000 об/мин). Препараты перемешивают в течение 3 час, затем пропускают сквозь нейлоновый сетчатый фильтр с размером пор 100 мкм (Fisherbrand Cell Strainer, кат. №22-363-549) для удаления более крупных агрегатов, и в конце промывают центрифугированием (10 минут, 9250 об/мин, 4°C). Супернатант отбрасывают, и ПМГК гранулы ресуспендируют в 5-10 мл воды, повторяют 2х. Промытые препараты замораживают в жидком азоте, и затем лиофилизируют в течение 2-3 дней. После лиофилизации, ~10 мг МС ПМГК взвешивают, помещают в пробирки Эппендорфа емкостью 2 мл и нарушают структуру добавлением 1 мл ДХМ со встряхиванием образцов в течение 2-6 часов. мРНК экстрагируют из разрушенных микросфер ПМГК с помощью добавления 0,5 мл воды и встряхивания образца в течение ночи. Неструктурированную мРНК люциферазы в воде или буфере ТЭ (неструктурированный контроль) помещают в ДХМ, и осуществляют процесс разрушения структуры для использования в качестве контрольных образцов в анализе трансфекции.

[001177] За день до трансфекции, 20000 клеток HeLa (АКТК № ССЛ-2; Манассас, Вирджиния) собирают с помощью обработки раствором трипсина-ЭДТА (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) и высевают в общем объеме 100 мкл среды ЕМЕМ (с добавкой 10% СТЭ и 1× Глутамакс) на лунку в 96-луночный планшет для культуры клеток (Corning, Манассас, Вирджиния). Клетки культивируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, на протяжении ночи. На следующий день, по 100 нг

деструктурированных образцов мРНК люциферазы разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк). Липофектамин 2000 (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) используют в качестве реактива трансфекции; 0,2 мкл разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ. Через 5 минут инкубации при комнатной температуре, оба раствора объединяют и инкубируют еще 15 минут при комнатной температуре. Далее 20 мкл объединенного раствора добавляют к 100 мкл питательной среды, содержащей клетки HeLa. После этого планшеты инкубируют, как было раскрыто выше.

[001178] Через 18-22 часа инкубации клетки, экспрессирующие люциферазу, подвергают лизису с использованием 100 мкл буферного раствора для пассивного лизиса (Promega, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя. Аликвоты лизатов переносят на белые непрозрачные 96-луночные планшеты из полистирола (Corning, Манассас, Вирджиния) и объединяют со 100 мкл полного раствора для анализа люциферазы (Promega, Мэдисон, Висконсин). Фоновый сигнал планшетов без реактива составляет приблизительно 200 относительных световых единиц на лунку. В качестве устройства для считывания планшетов используют BioTek Synergy H1 (BioTek, Винуски, Вермонт). Для определения активности мРНК люциферазы из каждого препарата, относительные световые единицы (ОСЕ) для каждого препарата делят на ОСЕ соответствующего деструктурированного контроля мРНК (мРНК в воде или буфере ТЭ). В Табл. 111 приведена активность мРНК люциферазы. Активность мРНК люциферазы в препаратах микросфер ПМГК (Препарат) значительно повышается при введении в буфер ТЭ по сравнению с водой.

Таблица 111.

Препараты							
Препарат	Концентрация мРНК (мг/мл)	Объем растворителя W1 (мкл)	Общая мРНК (мкг)	Теоретическая нагрузка мРНК (% масс)	Фактическая нагрузка мРНК (% масс)	Растворитель W1	Активность (% от деструктурированного контроля)
ПМГК А	4	400	1600	0,80	0,14	Вода	12,5%
ПМГК В	4	200	800	0,40	0,13	Вода	1,3%
ПМГК С	4	600	2400	1,20	0,13	Вода	12,1%
ПМГК D	2	400	800	0,40	0,07	Вода	1,3%
ПМГК Е	6	400	2400	1,20	0,18	Буфер	38,9%
						ТЭ	
ПМГК F	4	400	1600	0,80	0,16	Буфер	39,7%
						ТЭ	
ПМГК G	4	400	1600	0,80	0,10	Буфер	26,6%
						ТЭ	

Пример 75. Химические модификации мРНК

[001179] За день до трансфекции, 20000 клеток HeLa (АКТК № ССL-2; Манассас, Вирджиния) собирают с помощью обработки раствором трипсина-ЭДТА (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) и высевают в общем объеме 100 мкл среды ЕМЕМ (с добавкой 10% СТЭ и 1× Глутамакс) на лунку в 96-луночный планшет для культуры клеток (Corning, Манассас, Вирджиния). Клетки культивируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, на протяжении ночи. На следующий день, 83 нг модифицированной мРНК люциферазы (последовательность мРНК показана SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1) с химической модификацией, раскрытой в Табл. 112, разбавляют до конечного объема 10 мкл ОПТИ-МЕМ (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк). Липофектамин 2000 (LifeTechnologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк)

используют в качестве реактива трансфекции; 0,2 мкл разбавляют до конечного объема 10 мкл OPTI-MEM. Через 5 минут инкубации при комнатной температуре, оба раствора объединяют и инкубируют еще 15 минут при комнатной температуре. Далее 20 мкл объединенного раствора добавляют к 100 мкл питательной среды, содержащей клетки HeLa, и инкубируют при комнатной температуре.

[001180] Через 18-22 часа инкубации клетки, экспрессирующие люциферазу, подвергают лизису с использованием 100 мкл буферного раствора для пассивного лизиса (Promega, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя. Аликвоты лизатов переносят на белые непрозрачные 96-луночные планшеты из полистирола (Corning, Манассас, Вирджиния) и объединяют со 100 мкл полного раствора для анализа люциферазы (Promega, Мэдисон, Висконсин). Объемы лизатов корректируют или разбавляют до тех пор, пока для образцов с наиболее интенсивным сигналом не будет обнаруживаться не более 2 млн относительных световых единиц (ОСЕ) на лунку; ОСЕ для каждой исследованной химической модификации приведены в Табл. 112. В качестве устройства для считывания планшетов используют BioTek Synergy H1 (BioTek, Винуски, Вермонт). Фоновый сигнал планшетов без реактива составляет приблизительно 200 относительных световых единиц на лунку.

Химические модификации	
Образец	ОСЕ
Необработанный	336
Немодифицированная люцифераза	33980
5-Метилцитозин и псевдоурин	1601234
5-Метилцитозин и N1-метилпсевдоурин	421189
Замена 25% цитозина 5-метилцитозином и замена 25% уридина 2-тиоуридином	222114
N1-Метилпсевдоурин	3068261
Псевдоурин	140234
N4-Ацетилцитидин	1073251
5-Метоксиурин	219657
5-Бромуридин	6787
N4-Ацетилцитидин и N1-метилпсевдоурин	976219
5-Метилцитозин и 5-метоксиурин	66621
5-Метилцитозин и 2'фторуридин	11333

Пример 76. Внутримышечное и подкожное введение модифицированной мРНК

[001181] Модифицированную мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и псевдоуридином (5 мС/рU), полностью модифицированную 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином (5 мС/N1mpU), полностью модифицированную псевдоуридином (рU), полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином (N1mpU) или модифицирована заменой 25% цитозина 5-метилцитозином и заменой 25% уридина 2-тиоуридином (5 мС/s2U) в ФБР (рН 7,4) вводят мышам Balb-C внутримышечно или подкожно в дозе 2,5 мг/кг. Получают снимки мышей через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часа, 72 часа, 96 часов, 120 часов и 144 часов в случае внутримышечного введения, и через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов и 120 часов в случае подкожного введения. За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутривентрально раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биолюминесценцию измеряют как общий световой поток

(фотоны/секунду) всего тела мыши. Средний общий световой поток (фотоны/секунду) для внутримышечного введения приведен в Табл. 113, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) для подкожного введения приведен в Табл. 114. Фоновый сигнал составляет $3,79E+05$ (фотонов/с). Пик экспрессии при внутримышечном введении наблюдался в интервале от 24 до 48 для всех химических модификаций, и экспрессия все еще обнаруживалась через 144 часа. При подкожном введении пик экспрессии наблюдался через 2-8 часов, и экспрессия обнаруживалась еще через 72 часа.

Таблица 113.

Внутримышечное введение					
	5 мC/pU	5 мC/N1mpU	5 мC/s2U	PU	N1mpU
	световой поток (фотоны/с)				
2 часа	1,98E+07	4,65E+06	4,68E+06	2,33E+06	3,66E+07
8 часов	1,42E+07	3,64E+06	3,78E+06	8,07E+06	7,21E+07
24 часа	2,92E+07	1,22E+07	3,35E+07	1,01E+07	1,75E+08
48 часов	2,64E+07	1,01E+07	5,06E+07	7,46E+06	3,42E+08
72 часа	2,18E+07	8,59E+06	3,42E+07	4,08E+06	5,83E+07
96 часов	2,75E+07	2,70E+06	2,38E+07	4,35E+06	7,15E+07
120 часов	2,19E+07	1,60E+06	1,54E+07	1,25E+06	3,87E+07
144 часа	9,17E+06	2,19E+06	1,14E+07	1,86E+06	5,04E+07

Таблица 114.

Подкожное введение					
	5 мC/pU	5 мC/N1mpU	5 мC/s2U	PU	N1mpU
	световой поток (фотоны/с)				
2 часа	5,26E+06	4,54E+06	9,34E+06	2,43E+06	2,80E+07
8 часов	2,32E+06	8,75E+05	8,15E+06	2,12E+06	3,09E+07
24 часа	2,67E+06	5,49E+06	3,80E+06	2,24E+06	1,48E+07
48 часов	1,22E+06	1,77E+06	3,07E+06	1,58E+06	1,24E+07
72 часа	1,12E+06	8,00E+05	8,53E+05	4,80E+05	2,29E+06
96 часов	5,16E+05	5,33E+05	4,30E+05	4,30E+05	6,62E+05
120 часов	3,80E+05	4,09E+05	3,21E+05	6,82E+05	5,05E+05

Пример 77. Исследование с применением осмотического насоса

[001182] Перед имплантацией, в осмотический насос (осмотический насос ALZET® 2001D, DURECT Corp., Купертино, Калифорния) помещают 0,2 мл 1X ФБР (pH 7,4) (заполненный ФБР насос) или 0,2 мл модифицированной мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO:16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином) с концентрацией 1 мг/мл в 1x ФБР (pH 7,4) (нагруженный люциферазой насос) и инкубируют в течение ночи в 1x ФБР (pH 7,4) при 37°C.

[001183] Мышам Valb-C (n=3) подкожно имплантируют заполненный ФБР насос или нагруженный люциферазой насос и получают снимки через 2 часа, 8 часов и 24 часа. В качестве контроля заполненный ФБР насос имплантируют подкожно, и мышам вводят подкожной инъекцией модифицированную мРНК люциферазы в 1x ФБР (заполненный ФБР насос; п/к люцифераза), или имплантацию осмотического насоса не производят, и мышам инъекционно вводят подкожно модифицированную мРНК люциферазы в 1x ФБР (п/к люцифераза). Препараты люциферазы кратко охарактеризованы в Табл. 115

Таблица 115.

Препараты люциферазы

Группа	Растворитель	Концентрация (мг/мл)	Объем инъекции (мкл)	Кол-во (мкг)	Доза (мг/кг)
Заполненный ФБР насос; п/к люцифераза	ФБР	1,00	50	50	2,5
Нагруженный люциферазой насос	ФБР	1,00		200	10,0
Заполненный ФБР насос	ФБР	-	-	-	-
П/к люцифераза	ФБР	1,00	50	50	2,5

Пример 78. Исследование с использованием внешнего осмотического насоса [001184] Во внешний осмотический насос (осмотический насос ALZET® 2001D, DURECT Corp., Купертино, Калифорния) помещают 0,2 мл 1X ФБР (рН 7,4) (заполненный ФБР насос) или 0,2 мл модифицированной мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином) в концентрации 1 мг/мл в 1x ФБР (рН 7,4) (нагруженный люциферазой насос) и инкубируют в течение ночи в 1x ФБР (рН 7,4) при 37°C.

[001185] С использованием катетера, соединенного с внешним заполненным ФБР насосом или нагруженным люциферазой насосом, мышам Valb-C (n=3) вводят препарат. Снимки мышей получают через 2 часа, 8 часов и 24 часа. В качестве контроля используют внешний заполненный ФБР насос, и мышам инъекционно вводят подкожно модифицированную мРНК люциферазы в 1x ФБР (заполненный ФБР насос; п/к люцифераза), или внешний насос не используют, и мышам вводят модифицированную мРНК люциферазы в 1x ФБР только подкожной инъекцией (п/к люцифераза). За 20 минут до получения снимков мышам вводят внутривенно раствор D-люциферина в концентрации 150 мг/кг. Затем животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биоломинесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Препараты люциферазы кратко охарактеризованы в Табл. 116, и приведено среднее значение общего светового потока (фотоны/секунду).

Таблица 116.

Препараты люциферазы					
Группа	Растворитель	Концентрация (мг/мл)	Объем инъекции (мкл)	Кол-во (мкг)	Доза (мг/кг)
Заполненный ФБР насос; п/к люцифераза	ФБР	1,00	50	50	2,5
Нагруженный люциферазой насос	ФБР	1,00	-	200	10,0
Заполненный ФБР насос	ФБР	-	-	-	-
П/к люцифераза	ФБР	1,00	50	50	2,5

Пример 79. Исследование фибринового герметика

[001186] Фибриновый герметик, такой как Tisseel (Baxter Healthcare Corp., Дирфилд, Иллинойс), состоит из фибриногена и тромбина в шприце с двумя отделениями. При смешивании фибриноген превращается в фибрин с образованием фибринового сгустка в течение приблизительно 10-30 с. Образовавшийся сгусток может имитировать природный механизм свертывания организма. Дополнительно, фибриновый гидрогель имеет трехмерную структуру, которая потенциально может использоваться в целях доставки с замедленным высвобождением. В настоящее время, фибриновый герметик зарегистрирован для применения с целью остановки кровотечения и герметизации для замены традиционных хирургических техник, таких как шов, лигатура и прижигание.

[001187] Тромбиновый и фибриногеновый компоненты загружают по отдельности

в шприц с двумя отделениями. Мышам Valb-C (n=3) вводят подкожной инъекцией 50 мкл фибриногена, 50 мкл тромбина, и в то же место вводят модифицированную мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином) (Tisseel + люцифераза), 50 мкл фибриногена и 50 мкл тромбина (Tisseel) или модифицированную мРНК люциферазы (Люцифераза). Инъекцию фибриногена и тромбина осуществляют одновременно с использованием шприца с двумя отделениями. Подкожную инъекцию люциферазы осуществляют через 15 минут после инъекции фибриногена/тромбина, чтобы дать возможность фибринового гидрогелю полимеризоваться (группа Tisseel + люциферазы). Контрольную группу нелеченных мышей также оценивают. Снимки мышей получают через 5 часов и 24 часа. За 20 минут до получения снимков мышам вводят внутривенно раствор D-люциферина в концентрации 150 мг/кг. Затем животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биолюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Препараты люциферазы кратко охарактеризованы в Табл. 117, и приведено среднее значение общего светового потока (фотоны/секунду) в Табл. 118. Обнаружено, что фибриновый герметик не мешает визуализации, и инъекция люциферазы и Tisseel демонстрирует экспрессию люциферазы.

Таблица 117.

Препараты люциферазы					
Группа	Растворитель	Концентрация (мг/мл)	Объем инъекции (мкл)	Кол-во (мкг)	Доза (мг/кг)
Tisseel + люцифераза	ФБР	1,00	50	50	2,5
Tisseel	-	-	-	-	-
Люцифераза	ФБР	1,00	50	50	2,5
Необработанный	-	-	-	-	-

Таблица 118.

Общий световой поток		
Группа	5 часов	24 часа
	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)
Tisseel + люцифераза	4,59E+05	3,39E+05
Tisseel	1,99E+06	1,06E+06
Люцифераза	9,94E+05	7,44E+05
Необработанный	3,90E+05	3,79E+05

Пример 80. Исследование фибринового герметика, содержащего мРНК

А. Модифицированная мРНК и кальция хлорид

[001188] Перед разведением, мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином добавляют к кальция хлориду. В дальнейшем кальция хлорид используют для разведения тромбина. Фибриноген разводят раствором ингибитора фибринолиза в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный тромбин, содержащий модифицированную мРНК и фибриноген, помещают в шприц с двумя отделениями. Мышам вводят подкожной инъекцией 50 мкл фибриногена и 50 мкл тромбина, содержащего модифицированную мРНК, или 50 мкл ФБР, содержащего эквивалентные дозы модифицированной мРНК люциферазы. Контрольную группу нелеченных мышей также оценивают. Получают снимки мышей через предварительно определенные промежутки времени для определения среднего общего светового потока

(фотоны/секунду).

Б. Липидные наночастицы, содержащие модифицированную мРНК и кальция хлорид [001189] Перед разведением, мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином, вводят в липидную наночастицу и добавляют к кальция хлориду. В дальнейшем кальция хлорид используют для разведения тромбина. Фибриноген разводят раствором ингибитора фибринолиза в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный тромбин, содержащий модифицированную мРНК и фибриноген, помещают в шприц с двумя отделениями. Мышам вводят подкожной инъекцией 50 мкл фибриногена и 50 мкл тромбина, содержащего модифицированную мРНК, или 50 мкл ФБР, содержащего эквивалентные дозы модифицированной мРНК люциферазы. Контрольную группу нелеченных мышей также оценивают. Получают снимки мышей через предварительно определенные промежутки времени для определения среднего общего светового потока (фотоны/секунду).

В. Модифицированная мРНК и фибриноген

[001190] Перед разведением, мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином, добавляют к раствору ингибитора фибринолиза. В дальнейшем раствор ингибитора фибринолиза используют для разведения фибриногена. Тромбин разводят раствором кальция хлорида в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный фибриноген, содержащий модифицированную мРНК и тромбин, помещают в шприц с двумя отделениями. Мышам вводят подкожно 50 мкл тромбина и 50 мкл фибриногена, содержащего модифицированную мРНК, или 50 мкл ФБР, содержащего эквивалентные дозы модифицированной мРНК люциферазы. Контрольную группу нелеченных мышей также оценивают. Получают снимки мышей через предварительно определенные промежутки времени для определения среднего общего светового потока (фотоны/секунду).

Г. Липидная наночастица, содержащая модифицированную мРНК и фибриноген

[001191] Перед разведением, мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином, вводят в липидную наночастицу и добавляют к раствору ингибитора фибринолиза. В дальнейшем раствор ингибитора фибринолиза используют для разведения фибриногена. Тромбин разводят раствором кальция хлорида в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный фибриноген, содержащий модифицированную мРНК и тромбин, помещают в шприц с двумя отделениями. Мышам вводят подкожно 50 мкл тромбина и 50 мкл фибриногена, содержащего модифицированную мРНК, или 50 мкл ФБР, содержащего эквивалентные дозы модифицированной мРНК люциферазы. Контрольную группу нелеченных мышей также оценивают. Получают снимки мышей через предварительно определенные промежутки времени для определения среднего общего светового потока (фотоны/секунду).

Д. Модифицированная мРНК и тромбин

[001192] Перед разведением, мРНК люциферазы (последовательность мРНК

представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином, добавляют к тромбину после его разведения раствором кальция хлорида, в соответствии с инструкциями производителя. В дальнейшем раствор ингибитора фибринолиза используют для разведения фибриногена в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный фибриноген и тромбин, содержащий модифицированную мРНК, помещают в шприц с двумя отделениями. Мышам вводят подкожно 50 мкл тромбина, содержащего модифицированную мРНК, и 50 мкл фибриногена или 50 мкл ФБР, содержащего эквивалентные дозы модифицированной мРНК люциферазы. Контрольную группу нелеченных мышей также оценивают. Получают снимки мышей через предварительно определенные промежутки времени для определения среднего общего светового потока (фотоны/секунду).

Е. Липидная наночастица, содержащая модифицированную мРНК и тромбин [001193] Перед разведением, мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином, вводит в липидную наночастицу и добавляют к тромбину после его разведения кальция хлоридом в соответствии с инструкциями производителя. В дальнейшем раствор ингибитора фибринолиза используют для разведения фибриногена в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный фибриноген и тромбин, содержащий модифицированную мРНК, помещают в шприц с двумя отделениями. Мышам вводят подкожно 50 мкл тромбина, содержащего модифицированную мРНК, и 50 мкл фибриногена или 50 мкл ФБР, содержащего эквивалентные дозы модифицированной мРНК люциферазы. Контрольную группу нелеченных мышей также оценивают. Получают снимки мышей через предварительно определенные промежутки времени для определения среднего общего светового потока (фотоны/секунду).

Пример 81. Препарат модифицированной 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином мРНК на основе катионного липида

[001194] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином, вводят в катионные липиды, раскрытые в Табл. 119. Препараты вводят внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам Balb-C в дозе 0,05 мг/кг.

Таблица 119.

Препараты катионных липидов					
Препарат	NPA-126-1	NPA-127-1	NPA-128-1	NPA-129-1	111612-B
Липид	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-КС2-ДМА	С12-200	ДЛинДМА	ДОДМА
Соотношение липид/мРНК (масс)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
Средний размер	122 нм	114 нм	153 нм	137 нм	223,2 нм
	ИПД: 0,13	ИПД: 0,10	ИПД: 0,17	ИПД: 0,09	ИПД: 0,142
Зета при pH 7,4	-1,4 мВ	-0,5 мВ	-1,4 мВ	2,0 мВ	-3,09 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	95%	77%	69%	80%	64%

[001195] За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутривенно раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биолюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Снимки мышей

получают через 2 часа, 8 часов и 24 часа, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Фоновый сигнал составляет 4,17E+05 (фотонов/с). Результаты визуализации приведены в Табл. 120. В Табл. 120 «НТ» обозначает «не тестировали».

5

Световой поток						
Способ введения	Временная точка	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-КС2-ДМА	С12-200	Длин-ДМА	ДОДМА
		световой поток (фотоны/с)				
В/м	2 часа	1,92E+08	2,91E+08	1,08E+08	2,53E+07	8,40E+06
В/м	8 часов	1,47E+08	2,13E+08	3,72E+07	3,82E+07	5,62E+06
В/м	24 часа	1,32E+07	2,41E+07	5,35E+06	4,20E+06	8,97E+05
В/м	2 часа	8,29E+06	2,37E+07	1,80E+07	1,51E+06	НТ
В/м	8 часов	5,83E+07	2,12E+08	2,60E+07	1,99E+07	НТ
В/м	24 часа	4,30E+06	2,64E+07	3,01E+06	9,46E+05	НТ
П/к	2 часа	1,90E+07	5,16E+07	8,91E+07	4,66E+06	9,61E+06
П/к	8 часов	7,74E+07	2,00E+08	4,58E+07	9,67E+07	1,90E+07
П/к	24 часа	7,49E+07	2,47E+07	6,96E+06	6,50E+06	1,28E+06

10

15

Пример 82. Исследование внутривенного введения липидной наночастицы [001196] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и псевдоуридином) вводят в липидную наночастицу, содержащую 50% ДЛин-МС3-ДМА ИЛИ ДЛин-КС2-ДМА, как раскрыто в Табл. 121, 38,5% холестерина, 10% ДСФХ и 1,5% ПЭГ. Препарат вводят внутривенно (в/в) мышам Balb-C в дозах 0,5 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,005 мг/кг или 0,0005 мг/кг. За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутрибрюшинно раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биолюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши.

20

25

30

Препараты		
Препарат	НРА-098-1	НРА-100-1
Липид	ДЛин-КС2-ДМА	ДЛин-МС3-ДМА
Соотношение липид/мРНК (масс)	20:1	20:1
Средний размер	135 нм	152 нм
	ИПД: 0,08	ИПД: 0,08
Зета при pH 7,4	-0,6 мВ	-1,2 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	91%	94%

35

[001197] В случае ДЛин-КС2-ДМА снимки мышей получают через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 72 часа, 96 часов и 168 часов после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Фоновый световой поток составляет приблизительно 3,66E+05 фотонов/с. Результаты визуализации приведены в Табл. 122. Снимки органов получают через 8 часов, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для печени, селезенки, легкого и почки. Контрольный образец каждого органа также анализируют. Результаты приведены в Табл. 123. Пиковый сигнал для всех уровней дозы наблюдается через 8 часов после введения. Кроме того, по-видимому, распределение в различных органах (печень, селезенка, легкое и почка) можно контролировать путем увеличения или уменьшения дозы ЛНЧ.

45

Таблица 122.				
Световой поток				
Временная точка	0,5 мг/кг	0,05 мг/кг	0,005 мг/кг	0 0005 мг/кг
	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)

5

2 часа	3,54E+08	1,75E+07	2,30E+06	4,09E+05
8 часов	1,67E+09	1,71E+08	9,81E+06	7,84E+05
24 часа	2,05E+08	2,67E+07	2,49E+06	5,51E+05
72 часа	8,17E+07	1,43E+07	1,01E+06	3,75E+05
96 часов	4,10E+07	9,15E+06	9,58E+05	4,29E+05
168 часов	3,42E+07	9,15E+06	1,47E+06	5,29E+05

10

Таблица 123.

Световой поток органов				
	Печень	Селезенка	Легкое	Почка
	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)

15

0,5 мг/кг	1,42E+08	4,86E+07	1,90E+05	3,20E+05
0,05 мг/кг	7,45E+06	4,62E+05	6,86E+04	9,11E+04
0,005 мг/кг	3,32E+05	2,97E+04	1,42E+04	1,15E+04
0 0005 мг/кг	2,34E+04	1,08E+04	1,87E+04	9,78E+03
Нелеченные	1,88E+04	1,02E+04	1,41E+04	9,20E+03

20

[001198] В случае ДЛин-МС3-ДМА снимки мышей получают через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 144 часа после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Фоновый световой поток составляет приблизительно 4,51E+05 фотонов/с. Результаты визуализации приведены в Табл. 124. Снимки органов получают через 8 часов, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для печени, селезенки, легкого и почки. Контрольный образец каждого органа также анализируют. Результаты приведены в Табл. 125. Пиковый сигнал для всех уровней дозы наблюдается через 8 часов после введения. Кроме того, похоже, что распределение в различных органах (печень, селезенка, легкое и почка) можно контролировать путем увеличения или уменьшения дозы ЛНЧ.

25

30

Таблица 124.				
Световой поток				
Временная точка	0,5 мг/кг	0,05 мг/кг	0,005 мг/кг	0 0005 мг/кг
	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)

35

Таблица 125.				
Световой поток органов				
	Печень	Селезенка	Легкое	Почка
	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)

45

Пример 83. Исследование с подкожным введением липидной наночастицы [001199] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и псевдоуридином) вводят в липидную наночастицу, содержащую 50% ДЛин-КС2-ДМА, как раскрыто в Табл. 126, 385% холестерина, 10% ДСФХ и 1,5% ПЭГ. Препарат вводят подкожно (п/к) мышам Balb-C в дозе 0,5 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,005 мг/кг.

Таблица 126.	
Препарат ДЛин-КС2-ДМА	
Препарат	NPA-098-1
Липид	ДЛин-КС2-ДМА
Соотношение липид/мРНК (масс)	20:1
Средний размер	135 нм
	ИПД: 0,08
Зета при pH 7,4	-0,6 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	91%

[001200] За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутрибрюшинно раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации WIS Lumina II (Perkin Elmer). Билюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Снимки мышей получают через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 144 часа после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Нижний предел обнаружения составляет приблизительно $3E+05$ фотонов/с. Результаты визуализации приведены в Табл. 127. Снимки органов получают через 8 часов, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для печени, селезенки, легкого и почки. Контрольный образец каждого органа также анализируют. Результаты приведены в Табл. 128. Пиковый сигнал для всех уровней дозы наблюдается через 8 часов после введения. Кроме того, по-видимому, что распределение в различных органах (печень, селезенка, легкое и почка) можно контролировать путем увеличения или уменьшения дозы ЛНЧ. При введении высоких доз, препарат ЛНЧ мигрирует наружу из места подкожной инъекции, о чем свидетельствуют высокие уровни экспрессии люциферазы в печени, селезенке, легком и почке.

Таблица 127.			
Временная точка	Световой поток		
	0,5 мг/кг световой поток (фотоны/с)	0,05 мг/кг световой поток (фотоны/с)	0,005 мг/кг световой поток (фотоны/с)
2 часа	3,18E+07	7,46E+06	8,94E+05
8 часов	5,15E+08	2,18E+08	1,34E+07
24 часа	1,56E+08	5,30E+07	7,16E+06
48 часов	5,22E+07	8,75E+06	9,06E+05
72 часа	8,87E+06	1,50E+06	2,98E+05
144 часа	4,55E+05	3,51E+05	2,87E+05

Таблица 128.				
	Световой поток органов			
	Печень световой поток (фотоны/с)	Селезенка световой поток (фотоны/с)	Легкое световой поток (фотоны/с)	Почка световой поток (фотоны/с)
0,5 мг/кг	1,01E+07	7,43E+05	9,75E+04	1,75E+05
0,05 мг/кг	1,61E+05	3,94E+04	4,04E+04	3,29E+04

0,005 мг/кг	2,84E+04	2,94E+04	2,42E+04	9,79E+04
Нелеченные	1,88E+04	1,02E+04	1,41E+04	9,20E+03

Пример 84. Исследование с подкожным введением наночастицы катионного липида [001201] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и псевдоуридином) вводят в липидную наночастицу, содержащую 50% ДЛин-МСЗ-ДМА, 38,5% холестерина, 10% ДСФХ и 1,5% ПЭГ. Препарат подкожно (п/к) вводят мышам Valb-C в дозах 0,5 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,005 мг/кг.

[001202] Снимки мышей получают через 2 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 144 часа после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Снимки органов получают через 8 часов, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для печени, селезенки, легкого и почки. Контрольный образец каждого органа также анализируют.

Пример 85. Исследование липоплекса

[001203] Липоплексированную мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и псевдоуридином (5 mC/pU), полностью модифицированную 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином (5 mC/N1mpU) или модифицированную заменой 25% цитозина на 5-метилцитозин и заменой 25% уридина на 2-тиоуридин (5 mC/s2U). Препарат вводят внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам Valb-C в дозе 0,10 мг/кг.

[001204] За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутрибрюшинно раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биолюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Снимки мышей получают через 8 часов, 24 часа и 48 часов после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и химической модификации. Фоновый сигнал составляет приблизительно 3,91E+05 фотонов/с. Результаты визуализации приведены в Табл. 129. Снимки органов получают через 6 часов, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для печени, селезенки, легкого и почки. Контрольный образец каждого органа также анализируют. Результаты приведены в Табл. 130.

		Световой поток		
Способ введения	Временная точка	5 mC/pU	5 mC/N1mpU	5 mC/s2U
		световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)
В/м	8 часов	5,76E+06	1,78E+06	1,88E+06
В/м	24 часа	1,02E+06	7,13E+05	5,28E+05
В/м	48 часов	4,53E+05	3,76E+05	4,14E+05
В/м	8 часов	1,90E+06	2,53E+06	1,29E+06
В/м	24 часа	9,33E+05	7,84E+05	6,48E+05
В/м	48 часов	8,51E+05	6,59E+05	5,49E+05
П/к	8 часов	2,85E+06	6,48E+06	1,14E+06
П/к	24 часа	6,66E+05	7,15E+06	3,93E+05
П/к	48 часов	3,24E+05	3,20E+06	5,45E+05

Таблица 130.

Световой поток органов						
Способ введения	Химическая модификация	Печень	Селезенка	Легкое	Почка	Место инъекции
		световой поток (фотоны/с)				
5 В/м	5 мС/рU	5,26E+05	2,04E+07	4,28E+06	1,77E+04	н/о
В/м	5 мС/N1mpU	1,48E+05	5,00E+06	1,93E+06	1,77E+04	н/о
В/м	5 мС/s2U	2,14E+04	3,29E+06	5,48E+05	2,16E+04	н/о
В/м	5 мС/рU	2,46E+04	1,38E+04	1,50E+04	1,44E+04	1,15E+06
В/м	5 мС/N1mpU	1,72E+04	1,76E+04	1,99E+04	1,56E+04	1,20E+06
В/м	5 мС/s2U	1,28E+04	1,36E+04	1,33E+04	1,07E+04	7,60E+05
10 П/к	5 мС/рU	1,55E+04	1,67E+04	1,45E+04	1,69E+04	4,46E+04
П/к	5 мС/N1mpU	1,20E+04	1,46E+04	1,38E+04	1,14E+04	8,29E+04
П/к	5 мС/s2U	1,22E+04	1,31E+04	1,45E+04	1,08E+04	5,62E+04
	Нелеченные	2,59E+04	1,34E+04	1,26E+04	1,22E+04	н/о

Пример 86. Препарат катионного липида, содержащий модифицированную мРНК [001205] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), модифицированную заменой 25% цитозина 5-метилцитозином и заменой 25% уридина 2-тиоуридином (5 мС/s2U) вводят в катионные липиды, раскрытые в Табл. 131. Препараты вводят внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам Balb-C в дозах 0,05 мг/кг.

Таблица 131.					
Препараты катионных липидов					
Препарат	NPA-130-1	NPA-131-1	NPA-132-1	NPA-133-1	111612-C
Липид	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-КС2-ДМА	С12-200	ДЛинДМА	ДОДМА
Соотношение липид/мРНК (масс)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
Средний размер	120 нм	105 нм	122 нм ИПД:	105 нм	221,3 нм
	ИПД: 0,10	ИПД: 0,11	0,13	ИПД: 0,14	ИПД: 0,063
Зета при pH 7,4	0,2 мВ	-0,6 мВ	-0,5 мВ	-0,3 мВ	-3,10 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	100%	100%	93%	93%	60%

[001206] За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутривенно раствор Д-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации FVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биолюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Снимки мышей получают через 2 часа, 8 часов и 24 часа после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Фоновый световой поток составляет 3,31E+05 (фотонов/с). Результаты визуализации приведены в Табл. 132. В Табл. 132 «НТ» обозначает «не тестировали». Нелеченные мыши демонстрируют средний световой поток 3,14E+05 через 2 часа, 3,33E+05 через 8 часов и 3,46E+05 через 24 часа. Пик экспрессии наблюдается для всех 3-х способов введения через 8 часов. ДЛин-КС2-ДМА демонстрирует более высокую экспрессию, чем ДЛин-МС3-ДМА и ДОДМА для всех изученных способов введения.

Таблица 132.						
Световой поток						
Способ введения	Временная точка	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-КС2-ДМА	С12-200	ДЛин-ДМА	ДОДМА
		световой поток (фотоны/с)				
В/м	2 часа	9,88E+06	6,98E+07	9,18E+06	3,98E+06	5,79E+06
В/м	8 часов	1,21E+07	1,23E+08	1,02E+07	5,98E+06	6,14E+06

В/м	24 часа	2,02E+06	1,05E+07	1,25E+06	1,35E+06	5,72E+05
В/м	2 часа	6,72E+05	3,66E+06	3,25E+06	7,34E+05	4,42E+05
В/м	8 часов	7,78E+06	2,85E+07	4,29E+06	2,22E+06	1,38E+05
В/м	24 часа	4,22E+05	8,79E+05	5,95E+05	8,48E+05	4,80E+05
П/к	2 часа	2,37E+06	4,77E+06	4,44E+06	1,07E+06	1,05E+06
П/к	8 часов	3,65E+07	1,17E+08	3,71E+06	9,33E+06	2,57E+06
П/к	24 часа	4,47E+06	1,28E+07	6,39E+05	8,89E+05	4,27E+05

Пример 87. Препарат мРНК, модифицированной 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином

[001207] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и N1-метилпсевдоуридином, вводят в ФБР (рН 7,4). Препараты вводят внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам Balb-C в дозе 2,5 мг/кг.

[001208] За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутривентрально раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Билюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Снимки мышей получают через 5 минут, 30 минут, 60 минут и 120 минут после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Фоновый световой поток составляет 3,78E+05 (фотонов/с). Результаты визуализации приведены в Табл. 133. Экспрессия люциферазы начинается уже через 30 минут для обоих способов введения. Пик экспрессии для подкожного введения наблюдается в интервале 30-60 минут. Экспрессия при внутримышечном введении через 120 минут еще увеличивается.

Таблица 133.		
Световой поток		
Способ введения	Временная точка	ФБР (рН 7,4)
		световой поток (фотоны/с)
В/м	5 минут	4,38E+05
В/м	30 минут	1,09E+06
В/м	60 минут	1,18E+06
В/м	120 минут	2,86E+06
П/к	5 минут	4,19E+05
П/к	30 минут	6,38E+06
П/к	60 минут	5,61E+06
П/к	120 минут	2,66E+06

Пример 88. Внутримышечное и подкожное введение химически модифицированной мРНК

[001209] Модифицированную мРНК люциферазы (последовательность мРНК представлена в SEQ ED NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную N4-ацетилцитидином, полностью модифицированную 5-метоксиуридином, полностью модифицированную N4-ацетилцитидином и N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную 5-метилцитозином и 5-метоксиуридином, вводят в ФБР (рН 7,4) и вводят мышам Balb-C внутримышечно или подкожно в дозе 2,5 мг/кг. За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутривентрально раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Билюминесценцию измеряют как общий

световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Снимки мышей получают через 2 часа, 8 часов и 24 часа. Средний общий световой поток (фотоны/секунду) для внутримышечного введения проиллюстрирован в Табл. 134, и средний общий световой поток (фотонов/секунду) для подкожного введения проиллюстрирован в Табл. 135.

5 Фоновый сигнал составляет $3,84E+05$ (фотоны/секунду). Пик экспрессии для внутримышечного введения наблюдается через 24-48 часов для всех химических модификаций, и экспрессия все еще обнаруживается через 120 часов. В случае подкожного введения пик экспрессии наблюдается через 2-8 часов, и экспрессия еще обнаруживается через 72 часа.

10

Таблица 134.			
Внутримышечное введение			
	2 часа	8 часов	24 часа
	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)
N4-Ацетилцитидин	1,32E+07	2,15E+07	4,01E+07
5-Метоксиуридин	4,93E+06	1,80E+07	4,53E+07
N4-Ацетилцитидин/N1-метилпсевдоуридин	2,02E+07	1,93E+07	1,63E+08
5-Метилцитозин/5-метоксиуридин	6,79E+06	4,55E+07	3,44E+07
Таблица 135.			
Подкожное введение			
	2 часа	8 часов	24 часа
	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)
N4-Ацетилцитидин	3,07E+07	1,23E+07	1,28E+07
5-Метоксиуридин	7,10E+06	9,38E+06	1,32E+07
N4-Ацетилцитидин/N1-метилпсевдоуридин	7,12E+06	3,07E+06	1,03E+07
5-Метилцитозин/5-метоксиуридин	7,15E+06	1,25E+07	1,11E+07

20

25

Пример 89. Исследование *in vivo*

[001210] Модифицированную мРНК люциферазы, содержащую по меньшей мере одну химическую модификацию, вводят в липидную наночастицу (ЛНЧ) с применением способа шприцевого насоса и характеризуют по размеру частиц, зета потенциалу и инкапсуляции.

30

[001211] Как коротко описано в Табл. 136, препарат ЛНЧ люциферазы вводят мышам Balb-C внутримышечно (в/м), внутривенно (в/в) и подкожно (п/к). В качестве контроля мышам внутривенно вводят модифицированную РНК люциферазы в ФБР.

35

Таблица 136.						
Препараты люциферазы						
Препарат	Растворитель	Способ введения	Концентрация (мг/мл)	Объем инъекции (мкл)	Количество модифицированной РНК (мкг)	Доза (мг/кг)
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	п/к	0,2000	50	10	0,5000
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	п/к	0,0200	50	1	0,0500
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	п/к	0,0020	50	од	0,0050
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	п/к	0 0002	50	0,01	0,0005
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	в/м	0,2000	50	10	0,5000

40

45

Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	в/м	0,0200	50	1	0,0500
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	в/м	0,0020	50	0,1	0,0050
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	в/м	0 0002	50	0,01	0,0005
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	в/м	0,2000	50	10	0,5000
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	в/м	0,0200	50	1	0,0500
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	в/м	0,0020	50	0,1	0,0050
Люцифераза-ЛНЧ	ФБР	в/м	0 0002	50	0,01	0,0005

Люцифераза-ФБР	ФБР	в/м	0,20	50	10	0,50
----------------	-----	-----	------	----	----	------

[001212] Снимки мышей получают через 2, 8, 24, 48, 120 и 192 часов для определения билюминесценции (измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши). Через 8 часов или 192 часа получают снимки печени, селезенки, почки и места инъекции в случае подкожного и внутримышечного введения для определения билюминесценции.

Пример 90. Исследование препарата катионного липида, содержащего химически модифицированную мРНК

[001213] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, КЭп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозином и псевдоуридином (5 мС/рU), псевдоуридином (рU) или N1-метилпсевдоуридином (N1mpU) вводят в катионные липиды, раскрытые в Табл. 137. Препараты вводят внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам Balb-C в дозе 0,05 мг/кг.

Таблица 137.					
Препараты катионных липидов					
Препарат	NPA-137-1	NPA-134-1	NPA-135-1	NPA-136-1	111612-A
Липид	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-КС2-ДМА	С12-200	ДОДМА
Соотношение липид/ мРНК (масс)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
Средний размер	111 нм	104 нм ИПД:	95 нм ИПД:	143 нм	223,2 нм
	ИПД: 0,15	0,13	0,11	ИПД: 0,12	ИПД: 0,142
Зета при pH 7,4	-4,1 мВ	-1,9 мВ	-1,0 мВ	0,2 мВ	-3,09 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	97%	100%	100%	78%	64%
Химическая модификация	рU	N1mpU	N1mpU	N1mpU	5 мС/рU

[001214] За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутрибрюшинно раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Билюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Снимки мышей получают через 2 часа, 8 часов и 24 часа после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Фоновый световой поток составляет приблизительно $4,11E+05$ (фотонов/секунду). Результаты визуализации приведены в Табл. 138. Пик экспрессии наблюдается для всех 3-х исследуемых способов введения через 8 час.

Таблица 138.						
Световой поток						
Способ введения	Временная точка	ДЛин-МС3-ДМА (рU)	ДЛин-МС3-ДМА (N1mpU)	ДЛин-КС2-ДМА (N1mpU)	С12-200 (N1mpU)	ДОДМА (5 мС/рU)
		световой поток (фотоны/с)				
В/м	2 часа	3,21E+08	1,24E+09	1,01E+09	9,00E+08	3,90E+07
В/м	8 часов	1,60E+09	3,22E+09	2,38E+09	1,11E+09	1,17E+07
В/м	24 часа	1,41E+08	3,68E+08	3,93E+08	8,06E+07	1,11E+07
В/м	2 часа	2,09E+07	3,29E+07	8,32E+07	9,43E+07	4,66E+06
В/м	8 часов	2,16E+08	6,14E+08	1,00E+09	8,77E+07	7,05E+06
В/м	24 часа	1,23E+07	1,40E+08	5,09E+08	1,36E+07	1,14E+06
П/к	2 часа	2,32E+07	3,60E+07	2,14E+08	1,01E+08	3,11E+07
П/к	8 часов	5,55E+08	9,80E+08	4,93E+09	1,01E+09	8,04E+07
П/к	24 часа	1,81E+08	2,74E+08	2,12E+09	4,74E+07	1,34E+07

Пример 91. Исследование химически модифицированной мРНК

[001215] мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную N4-ацетилцитидином (N4-ацетил), полностью модифицированную 5-метоксиуридином (5 мет), полностью модифицированную N4-ацетилцитидином и N1-метилпсевдоуридином (N4-ацетил/N1mpU) или полностью модифицированную 5-метилцитозином и 5-метоксиуридином (5 мС/5-мет) вводят в Длин-МС3-ДМА, как раскрыто в Табл. 139. Препараты вводят внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам Balb-C в дозе 0,05 мг/кг.

Таблица 139.

Препараты катионных липидов				
Препарат	NPA-141-1	NPA-142-1	NPA-143-1	NPA-144-1
Липид	Длин-МС3-ДМА	Длин-МС3-ДМА	Длин-МС3-ДМА	Длин-МС3-ДМА
Соотношение липид/мРНК (массе)	20:1	20:1	20:1	20:1
Средний размер	138 нм	116 нм	144 нм	131 нм
	ИПД: 0,16	ИПД: 0,15	ИПД: 0,15	ИПД: 0,15
Зета при рН 7,4	-2,8 мВ	-2,8 мВ	-4,3 мВ	-5,0 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	97%	100%	75%	72%
Химическая модификация	N4-ацетил	5 мет	N4-ацетил/N1mpU	5 мС/5 мет

[001216] За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутривенно раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Биолюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши. Снимки мышей получают через 2 часа, 6 часов и 24 часа после введения дозы, и средний общий световой поток (фотоны/секунду) измеряют для каждого способа введения и препарата катионного липида. Фоновый световой поток составляет приблизительно 2,70E+05 (фотонов/секунду). Результаты визуализации приведены в Табл. 140.

Таблица 140.

Световой поток					
Способ введения	Временная точка	N4-Ацетил	5 мет	N4-Ацетил/N1mpU	5 мС/5-мет
		световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)	световой поток (фотоны/с)
В/м	2 часа	9,77E+07	3,19E+06	4,21E+07	1,88E+06
В/м	6 часов	7,70E+08	9,28E+06	2,34E+08	7,75E+06
В/м	24 часа	6,84E+07	1,04E+06	3,55E+07	3,21E+06
В/м	2 часа	8,59E+06	7,86E+05	5,30E+06	5,11E+05
В/м	6 часов	1,27E+08	8,88E+06	3,82E+07	3,17E+06
В/м	24 часа	4,46E+07	1,38E+06	2,00E+07	1,39E+06
П/к	2 часа	1,83E+07	9,67E+05	4,45E+06	1,01E+06
П/к	6 часов	2,89E+08	1,78E+07	8,91E+07	1,29E+07
П/к	24 часа	6,09E+07	6,40E+06	2,08E+08	6,63E+06

Пример 92. Микросферы ПМГК

А. Синтез микросфер ПМГК

[001217] Микросферы полимолочногликолевой кислоты (ПМГК) синтезируют с применением методов двойной эмульсии вода/масло/вода, известных из уровня техники, с использованием ПМГК-эфирного кэпа (Lactel, кат. № В6010-2, внутренняя вязкость 0,55-0,75, МК/ГК 50:50) или ПМГК-кислотного кэпа (Lactel, кат. № В6013-2, внутренняя вязкость 0,55-0,75, МК/ГК 50:50), поливинилового спирта (ЛВС) (Sigma, кат. №348406-25G, М. м. 13-23 тысячи), дихлорметана и воды. Если коротко, 0,4 мл мРНК в воде (W1) с концентрацией 4 мг/мл добавляют к 2 мл ПМГК, растворенной в

дихлорметане (ДХМ) (O1) при концентрациях ПМГК, варьирующих в интервале 50-200 мг/мл. Эмульсию W1/O1 гомогенизируют (гомогенизатор IKA Ultra-Turrax, T18) в течение 30 секунд на скорости 4 (~15000 об/мин). Далее эмульсию W1/O1 добавляют к 250 мл 1% ПВС (W2) и гомогенизируют в течение 1 минуты на скорости 5 (~19000 об/мин). Препараты перемешивают в течение 3 часов, затем пропускают сквозь нейлоновый сетчатый фильтр с размером пор 100 мкм (Fisherbrand Cell Strainer, кат. №22-363-549) для удаления более крупных агрегатов, и в конце промывают центрифугированием (10 минут, 9250 об/мин, 4°C). Супернатант отбрасывают, и ПМГК гранулы ресуспендируют в 5-10 мл воды, повторяют 2х. Промытые препараты замораживают в жидком азоте, и затем лиофилизируют в течение 2-3 дней.

Б. Снижение скорости гомогенизации или концентрации ПМГК

[001218] Микросферы ПМГК люциферазы (мРНК люциферазы представлена в SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозинном и псевдоуридинном) получают с применением условий, раскрытых выше для кэппированной сложным эфиром ПМГК. После промывания и ресуспендирования водой, 100-200 мкл образца микросфер ПМГК используют для измерения размера частиц препаратов методом лазерной дифракции (Malvern Mastersizer2000). Размер частицы для микросфер, полученных при снижении скорости гомогенизации в ходе добавления первой эмульсии ко второй эмульсии с концентрацией ПМГК 200 мг/мл, приведен в Табл. 141, и размер частицы для микросфер, полученных при снижении концентрации ПМГК в дихлорметане (ДХМ) со скоростью гомогенизации 5 в ходе добавления первой эмульсии ко второй эмульсии, приведен в Табл. 142.

Таблица 141.	
Снижение скорости гомогенизации	
Скорость гомогенизатора в процессе добавления	Средний размер D50 (мкм)
2	41,5
3	35,9
4	32,5
5	26,5
6	25,0

Таблица 142.

Снижение концентрация ПМГК в ДХМ	
Концентрация ПМГК (мг/мл)	Средний размер D50 (мкм)
200	27,7
100	14,2
50	8,7

[001219] ПМГК с внутренней вязкостью 0,55-0,75 и кислотным или эфирным кэпом, которую используют для получения микросфер, проиллюстрирована в Табл. 143. Размер частицы микросфер и кинетика высвобождения также определены и приведены в Табл. 143.

Таблица 143.							
Снижение концентрации ПМГК в ДХМ							
Образец	Концентрация ПМГК (мг/мл)	Концевая группа	Скорость гомогенизатора в процессе добавления	Теоретическая нагрузка мРНК (% масс)	Фактическая нагрузка мРНК (% масс)	Эффективность инкапсуляции (%)	Средний размер D50 (мкм)
A	200	Сложный эфир	3	0,4	0,14	45	38,7
B	200	Кислота	3	0,4	0,06	18	31,3
C	200	Сложный эфир	5	0,4	0,13	41	32,2
D	200	Кислота	5	0,4	0,07	22	28,0

E	100	Сложный эфир	5	0,8	0,15	23	17,1
F	100	Кислота	5	0,8	0,10	18	15,9

В. Исследование высвобождения модифицированной мРНК, инкапсулированной в микросферы ПМГК

- 5 [001220] Микросферы ПМГК, содержащие модифицированную РНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и псевдоуридином) разрушают, и целостность экстрагированной модифицированной РНК определяют методом автоматизированного электрофореза (Bio-Rad Experion).
- 10 После лиофилизации, -10 мг МС ПМГК взвешивают, помещают в пробирки Эппендорфа емкостью 2 мл и разрушают микросферы добавлением 1 мл ДХМ со встряхиванием образцов в течение 2-6 часов. мРНК экстрагируют из разрушенных микросфер ПМГК добавлением 0,5 мл воды со встряхиванием образца в течение ночи.
- 15 Неструктурированную МНС люциферазы в воде (деструктурированный контроль) помещают в ДХМ, и осуществляют процесс разрушения микросфер для использования в качестве контроля. Экстрагированную модифицированную мРНК сравнивают с неструктурированной модифицированной мРНК и деструктурированным контролем для проверки целостности инкапсулированной модифицированной мРНК. Большая часть модифицированной РНК для серий А, В, С, D, Е является интактной, по сравнению
- 20 с деструктурированным контролем (Деструктурированный контроль) и Неструктурированным контролем (Неструктурированный контроль).

Г. Исследование высвобождения модифицированной мРНК, инкапсулированной в микросферы ПМГК

- 25 [001221] Микросферы ПМГК, содержащие модифицированную РНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 160 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозином и псевдоуридином), ресуспендируют в буферном растворе ТЭ до концентрации микросфер ПМГК 80 мг/мл в 2-х или 3-х экземплярах. После ресуспендирования, образцы
- 30 инкубируют и встряхивают при 37°C в течение всего исследования. В каждой временной точке (0,04, 0,25, 1, 2, 4 и 7 дней) пробирки центрифугируют, супернатант извлекают, и гранулу ресуспендируют в 0,25 мл свежего буферного раствора ТЭ. Для определения количества модифицированной РНК, высвобожденной из микросфер ПМГК, концентрацию модифицированной РНК в супернатанте определяют на основании значения OD 260. Процент высвобождения, приведенный в Табл. 144, вычисляют на
- 35 основе общего количества модифицированной РНК в каждом образце. Скорость высвобождения препаратов мРНК можно регулировать путем изменения размера частиц, концентрации ПМГК и химической природы концевой кэпа (кислота против сложного эфира).

40 Таблица 144.

Процент высвобождения						
Время (дни)	Серия А	Серия В	Серия С	Серия D	Серия Е	Серия F
	% высвобождения					
0,04	7,1	13,6	9,5	9,5	21,2	21,7
0,25	18,0	23,3	17,5	24,0	31,3	37,7
1,2	26,3	29,1	22,8	31,6	41,0	46,5
4	33,5	37,1	29,0	40,4	48,8	60,7
7	37,6	41,5	32,4	45,2	55,0	68,3

45

Д. Исследование микросфер ПМГК люциферазы *in vivo*

[001222] Микросферы ПМГК, содержащие мРНК люциферазы (SEQ ID NO: 16; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1), полностью модифицированную 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином или полностью модифицированную N1-метилпсевдоуридином, получают, как раскрыто в Табл. 145, и вводят подкожно мышам. За 20 минут до визуализации, мышам вводят внутрибрюшинно раствор D-люциферина в дозе 150 мг/кг. Далее животным проводят анестезию, и получают снимки с помощью системы визуализации IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Билюминесценцию измеряют как общий световой поток (фотоны/секунду) всего тела мыши.

Препарат				
Группа	n	Доза (мкг)	Объем (мкл)	Растворитель
1	6	50	200	0,5% КМЦ, 5% маннита, 0,1% полисорбата 80
2	6	50	200	5% сахарозы
3	3	5	200	5% сахарозы

Пример 93. Препараты на основе буферного раствора

[001223] Модифицированная мРНК может быть введена в водные буферные растворы. Буферные растворы, сходные с биологическими системами, традиционно являются изотоническими. Такие буферы и буферные растворы могут быть получены в соответствии с изложенными ниже указаниями. Примеры компонентов приведены в Табл. 146.

[001224] В некоторых вариантах реализации ионы кальция могут быть добавлены к буферному раствору для препаратов.

Буферные растворы	
Буферный раствор	Компоненты
Буферизованный Трис раствор соли	Трис и натрия хлорид

Буферизованный фосфатом раствор соли	Натрия хлорид, натрия фосфат, и, в некоторых препаратах, калия хлорид и калия фосфат
Раствор Рингера с лактатом (на 1 литр)	130 мЭкв иона натрия = 130 ммоль/л
	109 мЭкв хлорид-иона = 109 ммоль/л
	28 мЭкв лактат-иона = 28 ммоль/л
	4 мЭкв иона калия = 4 ммоль/л
	3 мЭкв иона кальция = 1,5 ммоль/л

Пример 94. Липидная наночастица, содержащая несколько модифицированных мРНК

[001225] мРНК ЭПО (SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином), мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином) и мРНК Фактора IX (SEQ ID NO: 10; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозинном и N1-метилпсевдоуридином) вводят в ДЛин-МС3-ДМА, как раскрыто в Табл. 147. Препараты вводят внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам Valb-C в дозе 0,05 мг/кг. Контрольный препарат ЛНЧ, содержащий только одну мРНК, также вводят в эквивалентной дозе.

Таблица 147.	
Препарат ДЛин-МС3-ДМА	
Препарат	НРА-157-1
Липид	ДЛин-МС3-ДМА
Соотношение липид/мРНК (масс)	20:1
Средний размер	89 нм
	ИПД: 0,08
Зета при рН 7,4	1,1 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	97%

5 [001226] Сыворотку мышей собирают через 8 часов, 24 часа, 72 часа и/или 7 дней
10 после введения препарата. Сыворотку анализируют методом ТИФА для определения экспрессии белков ЭПО, G-CSF и Фактора IX.

Пример 95. Исследования препарата катионного липида, содержащего модифицированную 5-метилцитозин и N1-метилпсевдоуридин мРНК

15 [001227] мРНК ЭПО (SEQ ID NO: 9; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозин и N1-метилпсевдоуридин) или мРНК G-CSF (SEQ ID NO: 6; хвост поли-А длиной приблизительно 140 нуклеотидов не показан в последовательности; 5' кэп, Кэп 1; полностью модифицирована 5-метилцитозин и N1-метилпсевдоуридин) вводят в ДЛин-МС3-ДМА и ДЛин-КС2-ДМА, как раскрыто в Табл. 148. Препараты
20 вводят внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м) или подкожно (п/к) мышам Balb-C в дозе 0,05 мг/кг.

Таблица 148.				
Препараты ДЛин-МС3-ДМА и ДЛин-КС2-ДМА				
Препарат	НРА-147-1	НРА-148-1	НРА-150-1	НРА-151-1
мРНК	ЭПО	ЭПО	G-CSF	G-CSF
Липид	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-КС2-ДМА	ДЛин-МС3-ДМА	ДЛин-КС2-ДМА
Соотношение липид/мРНК (масс)	20:1	20:1	20:1	20:1
Средний размер	117 нм	82 нм	119 нм	88 нм
	ИПД: 0,14	ИПД: 0,08	ИПД: 0,13	ИПД: 0,08
Зета при рН 7,4	-1,7 мВ	0,6 мВ	3,6 мВ	2,2 мВ
Инкапсуляция (RiboGreen)	100%	96%	100%	100%

35 [001228] Сыворотку мышей собирают через 8 часов, 24 часа, 72 часа и/или 7 дней после введения препарата. Сыворотку анализируют методом ТИФА для определения экспрессии белков ЭПО и G-CSF.

Пример 96. Направленный анализ взаимоотношений «структура-активность» для псевдоуридина и N1-метилпсевдоуридина

40 [001229] С учетом недавнего фокуса на пиримидиновом нуклеозиде псевдоуридине, была спроектирована серия исследований взаимоотношения структура-активность для изучения мРНК, модифицированной псевдоуридином или N1-метил-псевдоуридином.

45 [001230] Дизайн исследования включал изучение эффекта длины цепи, повышенной липофильности, присутствия кольцевых структур и изменения гидрофобных или гидрофильных взаимодействий, если модификации содержатся в положении N1, положении C6, положении 2, положении 4 и в фосфатном скелете. Кроме того, исследовали стабильность.

[001231] До этого времени были изучены модификации, включающие алкилирование, циклоалкилирование, алкил-циклоалкилирование, арилирование, алкил-арилирование, алкилирование фрагментов с аминогруппой, алкилирование фрагментов с

карбоксильной группой и алкилирование фрагментов, содержащих заряженные аминокислотные фрагменты. Степень алкилирования, в общем, составляет C₁-C₆. Примеры химических модификаций включают перечисленные в Табл. 149 и Табл. 150.

Таблица 149.		
Взаимоотношения структура-активность для псевдоуридина и N1-метилпсевдоуридина		
Химическая модификация	Номер соединения	Встречаемость в природе
N1-Модификации		
N1-Этил-псевдо-уридин-5'-трифосфат (УТФ)	1	нет
N1-Пропил-псевдо-УТФ	2	нет
N1-изо-Пропил-псевдо-УТФ	3	нет
N1-(2,2,2-Трифторэтил)-псевдо-УТФ	4	нет
N1-Циклопропил-псевдо-УТФ	5	нет
N1-Циклопропилметил-псевдо-УТФ	6	нет
N1-Фенил-псевдо-УТФ	7	нет
N1-Бензил-псевдо-УТФ	8	нет
N1-Аминометил-псевдо-УТФ	9	нет
Псевдо-УТФ-N1-2-зтановая кислота	10	нет
N1-(3-Амино-3-карбоксипропил)псевдо-УТФ	11	нет
N1-Метил-3-(3-амино-3-карбоксипропил)псевдо-УТФ	12	да
C-6 Модификации		
6-Метил-псевдо-УТФ	13	нет
6-Трифторметил-псевдо-УТФ	14	нет
6-Метокси-псевдо-УТФ	15	нет
6-Фенил-псевдо-УТФ	16	нет
6-Йод-псевдо-УТФ	17	нет
6-Бром-псевдо-УТФ	18	нет
6-Хлор-псевдо-УТФ	19	нет
6-Фтор-псевдо-УТФ	20	
Модификации в положении 2 или 4		
4-Тио-псевдо-УТФ	21	нет
2-Тио-псевдо-УТФ	22	нет
Модификации фосфатного скелета		
Альфа-тио-псевдо-УТФ	23	нет
N1-Ме-Альфа-тио-псевдо-УТФ	24	нет
Таблица 150.		
Взаимоотношения структура-активность для псевдоуридина и N1-метилпсевдоуридина		
Химическая модификация	Номер соединения	Встречаемость в природе
N1-Метил-псевдо-УТФ		
N1-Метил-псевдо-УТФ	1	да
N1-Бутил-псевдо-УТФ	2	нет
N1-трет-Бутил-псевдо-УТФ	3	нет
N1-Пентил-псевдо-УТФ		
N1-Пентил-псевдо-УТФ	4	нет
N1-Гексил-псевдо-УТФ		
N1-Гексил-псевдо-УТФ	5	нет
N1-Трифторметил-псевдо-УТФ		
N1-Трифторметил-псевдо-УТФ	6	да
N1-Циклобутил-псевдо-УТФ		
N1-Циклобутил-псевдо-УТФ	7	нет
N1-Цикл опентил-псевдо-УТФ		
N1-Цикл опентил-псевдо-УТФ	8	нет
N1-Циклогексил-псевдо-УТФ		
N1-Циклогексил-псевдо-УТФ	9	нет
N1-Цикл огептил-псевдо-УТФ		
N1-Цикл огептил-псевдо-УТФ	10	нет
N1-Циклооктил-псевдо-УТФ		
N1-Циклооктил-псевдо-УТФ	11	нет
N1-Циклобутилметил-псевдо-УТФ		
N1-Циклобутилметил-псевдо-УТФ	12	нет
N1-Циклопентилметил-псевдо-УТФ		
N1-Циклопентилметил-псевдо-УТФ	13	нет
N1-Циклогексилметил-псевдо-УТФ		
N1-Циклогексилметил-псевдо-УТФ	14	нет
N1-Циклогептилметил-псевдо-УТФ		
N1-Циклогептилметил-псевдо-УТФ	15	нет
N1-Циклоокталметил-псевдо-УТФ		
N1-Циклоокталметил-псевдо-УТФ	16	нет
N1-п-Толил-псевдо-УТФ		
N1-п-Толил-псевдо-УТФ	17	нет

	N1-(2,4,6-Триметил-фенил)псевдо-УТФ	18	нет
	N1-(4-Метокси-фенил)псевдо-УТФ	19	нет
	N1-(4-Амино-фенил)псевдо-УТФ	20	нет
	N1(4-Нитро-фенил)псевдо-УТФ	21	нет
5	Псевдо-УТФ-N1-п-бензойная кислота	22	нет
	N1-(4-Метил-бензил)псевдо-УТФ	24	нет
	N1-(2,4,6-Триметил-бензил)псевдо-УТФ	23	нет
	N1-(4-Метокси-бензил)псевдо-УТФ	25	нет
	N1-(4-Амино-бензил)псевдо-УТФ	26	нет
	N1-(4-Нитро-бензил)псевдо-УТФ	27	нет
10	Псевдо-УТФ-N1-метил-п-бензойная кислота	28	нет
	N1-(2-Амино-этил)псевдо-УТФ	29	нет
	N1-(3-Амино-пропил)псевдо-УТФ	30	нет
	N1-(4-Амино-бутил)псевдо-УТФ	31	нет
	N1-(5-Амино-пентил)псевдо-УТФ	32	нет
	N1-(6-Амино-гексил)псевдо-УТФ	33	нет
15	Псевдо-УТФ-N1-3-пропионовая кислота	34	нет
	Псевдо-УТФ-N1-4-бутановая кислота	35	нет
	Псевдо-УТФ-N1-5-пентановая кислота	36	нет
	Псевдо-УТФ-N1-6-гексановая кислота	37	нет
	Псевдо-УТФ-N1-7-гептановая кислота	38	нет
	N1-(2-Амино-2-карбоксиэтил)псевдо-УТФ	39	нет
20	N1-(4-Амино-4-карбоксибутил)псевдо-УТФ	40	нет
	N3-Алкил-псевдо-УТФ	41	нет
	6-Этил-псевдо-УТФ	42	нет
	6-Пропил-псевдо-УТФ	43	нет
	6-изо-Пропил-псевдо-УТФ	44	нет
	6-Бутил-псевдо-УТФ	45	нет
25	6-трет-Бутил-псевдо-УТФ	46	нет
	6-(2,2,2-Трифторэтил)-псевдо-УТФ	47	нет
	6-Этокси-псевдо-УТФ	48	нет
	6-Трифторметокси-псевдо-УТФ	49	нет
	6-Фенил-псевдо-УТФ	50	нет
	6-(Замещенный фенил)-псевдо-УТФ	51	нет
30	6-Циано-псевдо-УТФ	52	нет
	6-Азидо-псевдо-УТФ	53	нет
	6-Амино-псевдо-УТФ	54	нет
	6-Этилкарбоксилат-псевдо-УТФ	54b	нет
	6-Гидрокси-псевдо-УТФ	55	нет
35	6-Метиламино-псевдо-УТФ	55b	нет
	6-Диметиламино-псевдо-УТФ	57	нет
	6-Гидроксиламино-псевдо-УТФ	59	нет
	6-Формил-псевдо-УТФ	60	нет
	6-(4-Морфолино)-псевдо-УТФ	61	нет
	6-(4-Тиоморфолино)-псевдо-УТФ	62	нет
40	N1-Ме-4-Тео-псевдо-УТФ	63	нет
	N1-Ме-2-Тео-псевдо-УТФ	64	нет
	1,6-Диметил-псевдо-УТФ	65	нет
	1-Метил-6-трифторметил-псевдо-УТФ	66	нет
	1-Метил-6-этил-псевдо-УТФ	67	нет
	1-Метил-6-пропил-псевдо-УТФ	68	нет
45	1-Метил-6-изо-пропил-псевдо-УТФ	69	нет
	1-Метил-6-бутил-псевдо-УТФ	70	нет
	1-Метил-6-лиреАи-бутил-псевдо-УТФ	71	нет
	1-Метил-6-(2,2,2-трифторэтил)псевдо-УТФ	72	нет
	1-Метил-6-йод-псевдо-УТФ	73	нет

	1-Метил-6-бром-псевдо-УТФ	74	нет
	1-Метил-6-хлор-псевдо-УТФ	75	нет
	1-Метил-6-фтор-псевдо-УТФ	76	нет
	1-Метил-6-метокси-псевдо-УТФ	77	нет
5	1-Метил-6-этокси-псевдо-УТФ	78	нет
	1-Метил-6-трифторметокси-псевдо-УТФ	79	нет
	1-Метил-6-фенил-псевдо-УТФ	80	нет
	1-Метил-6-(замещенный фенил)псевдо-УТФ	81	нет
	1-Метил-6-циано-псевдо-УТФ	82	нет
	1-Метил-6-азидо-псевдо-УТФ	83	нет
10	1-Метил-6-амино-псевдо-УТФ	84	нет
	1-Метил-6-этилкарбоксилат-псевдо-УТФ	85	нет
	1-Метил-6-гидрокси-псевдо-УТФ	86	нет
	1-Метил-6-метиламино-псевдо-УТФ	87	нет
	1-Метил-6-диметиламино-псевдо-УТФ	88	нет
	1-Метил-6-гидроксиамино-псевдо-УТФ	89	нет
15	1-Метил-6-формил-псевдо-УТФ	90	нет
	1-Метил-6-(4-морфолино)-псевдо-УТФ	91	нет
	1-Метил-6-(4-тиоморфолино)-псевдо-УТФ	92	нет
	1-Алкил-6-винил-псевдо-УТФ	93	нет
	1-Алкил-6-аллил-псевдо-УТФ	94	нет
	1-Алкил-6-гомоаллил-псевдо-УТФ	95	нет
20	1-Алкил-6-этанил-псевдо-УТФ	96	нет
	1-Алкил-6-(2-пропинил)-псевдо-УТФ	97	нет
	1-Алкил-6-(1-пропинил)-псевдо-УТФ	98	нет

Пример 97. Инкорпорация природных и не встречающихся в природе нуклеозидов [001232] Природные и не встречающиеся в природе нуклеозиды вводят в мРНК, кодирующую целевой полипептид. Примеры приведены в Табл. 151 и 152. Некоторые коммерчески доступные нуклеозидтрифосфаты (НТФ) исследуются в полинуклеотидах по изобретению. Их выбор приведен в Табл. 152. В дальнейшем, полученную мРНК исследуют на предмет ее способности приводить к выработке белка, индукции цитокинов и/или достижению терапевтического результата.

30

Таблица 151.		
Природные и не встречающиеся в природе нуклеозиды		
Химическая модификация	Номер соединения	Встречаемость в природе
N4-Метил-цитозин	1	да
N4,N4-Диметил-2'-ОМе-цитозин	2	да
5-Оксиуксусной кислоты-метиловый эфир-уридин	3	да
N3-Метил-псевдо-уридин	4	да
5-Гидроксиметил-цитозин	5	да
5-Трифторметил-цитозин	6	нет
5-Трифторметил-уридин	7	нет
5-Метил-амино-метил-уридин	8	да
5-Карбокси-метил-амино-метил-уридин	9	да
5-Карбоксиметиламинометил-2'-ОМе-уридин	10	да
5-Карбоксиметиламинометил-2-тио-уридин	11	да
5-Метиламинометил-2-тио-уридин	12	да
5-Метокси-карбонил-метил-уридин	13	да
5-Метокси-карбонил-метил-2'-ОМе-уридин	14	да
5-Оксиуксусная кислота-уридин	15	да
3-(3-Амино-3-карбоксипропил)-уридин	16	да
5-(Карбоксигидроксиметил)уридина метиловый эфир	17	да
5-(Карбоксигидроксиметил)уридин	18	да

Таблица 152.

Не встречающиеся в природе нуклеозидтрифосфаты		
Химическая модификация	Номер соединения	Встречаемость в природе
N1-Ме-ГТФ	1	нет
2'-ОМе-2'-Амино-АТФ	2	нет
2'-ОМе-Псевдо-УТФ	3	да
2'-ОМе-6-Ме-УТФ	4	нет
2'-Азидо-2'-дезоксид-АТФ	5	нет
2'-Азидо-2'-дезоксид-ГТФ	6	нет
2'-Азидо-2'-дезоксид-УТФ	7	нет
2'-Азидо-2'-дезоксид-ЦТФ	8	нет
2'-Амино-2'-дезоксид-АТФ	9	нет
2'-Амино-2'-дезоксид-ГТФ	10	нет
2'-Амино-2'-дезоксид-УТФ	11	нет

2'-Амино-2'-дезоксид-ЦТФ	12	нет
2-Амино-АТФ	13	нет
8-Азаа-АТФ	14	нет
Ксантозин-5'-трифосфат (ТФ)	15	нет
5-Бром-цитозинтрифосфат (ЦТФ)	16	нет
2'-F-5-Метил-2'-дезоксид-УТФ	17	нет
5'-Аминоаллил-ЦТФ	18	нет
2-Амино-рибозид-ТФ	19	нет

Пример 98. Введение модификаций в нуклеиновое основание и углевод (сахар) [001233] Природные и не встречающиеся в природе нуклеозиды вводят в мРНК, кодирующую целевой полипептид. Коммерчески доступные нуклеозиды и НТФ, содержащие модификации нуклеинового основания и углевода (сахар) исследуют на предмет их способности к встраиванию в мРНК и выработке белка, индукции цитокинов и/или достижения терапевтического результата. Примеры указанных нуклеозидов приведены в Табл. 153 и 154.

Таблица 153.		
Комбинации модификаций		
Химическая модификация	Номер соединения	
5-Йод-2'-фтор-дезоксидурин дин	1	
5-Йод-цитидин	6	
2'-Бром-дезоксидурин	7	
8-Бром-аденозин	8	
8-Бром-гуанозин	9	
2,2'-Ангидро-цитидина гидрохлорид	10	
2,2'-Ангидро-уридин	11	
2'-Азидо-дезоксидурин	12	
2-Амино-аденозин	13	
N4-Бензоил-цитидин	14	
N4-Амино-цитидин	15	
2'-О-Метил-N4-ацетил-цитидин	16	
2'-Фтор-N4-ацетил-цитидин	17	
2'-Фтор-N4-Bz-цитидин дин	18	
2'-О-Метил-N4-Bz-цитидин	19	
2'-О-Метил-N6-Bz-дезоксидаденозин	20	
2'-Фтор-N6-Bz-дезоксидаденозин	21	
N2-Изобутил-гуанозин	22	
2'-Фтор-N2-изобутил-гуанозин	23	
2'-О-Метил-N2-изобутил-гуанозин	24	

Таблица 154.

Природные комбинации		
Название	Номер соединения	Встречаемость в природе
5-Метоксикарбонилметил-2-тиоуридина ТФ	1	Да
5-Метиламинометил-2-тиоуридина ТФ	2	Да
5-Карбамоилметилуридина ТФ	3	Да
5-Карбамоилметил-2'-О-метилуридина ТФ	4	Да
1-Метил-3-(3-амино-3-карбокситропил)-псевдоуридина ТФ	5	Да
5-Метиламинометил-2-селеноуридина ТФ	6	Да
5-Карбоксиметилуридина ТФ	7	Да
5-Метилдигидроуридина ТФ	8	Да
Лизидина ТФ	9	Да
5-Тауринометилуридина ТФ	10	Да
5-Тауринометил-2-тиоуридина ТФ	11	да
5-(изо-Пентениламинометил)уридина ТФ	12	да
5-(изо-Пентениламинометил)-2-тиоуридина ТФ	13	Да
5-(изо-Пентениламинометил)-2'-О-метилуридина ТФ	14	да
N4-Ацетил-2'-О-метилцитидина ТФ	15	Да
N4,2'-О-Диметилцитидина ТФ	16	да
5-Формил-2'-О-метилцитидина ТФ	17	да
2'-О-Метилпсевдоуридина ТФ	18	да
2-Тео-2'-О-метилуридина ТФ	19	да
3,2'-О-Диметилуридина ТФ	20	да

20 [001234] В таблицах «УТФ» обозначает уридинтрифосфат, «ГТФ» обозначает гуанозинтрифосфат, «АТФ» обозначает аденозинтрифосфат, «ЦТФ» обозначает цитозинтрифосфат, «ТФ» обозначает трифосфат и «Vz» обозначает бензил.

25 [001235] Следует понимать, что используемые слова скорее являются описательными, чем ограничивающими, и что модификации могут быть осуществлены в рамках прилагаемой формулы изобретения, без отхода от истинного контекста и духа изобретения в ее более широких аспектах.

30 [001236] Хотя данное изобретение раскрыто до некоторой протяженности и степени подробности с учетом определенных раскрытых вариантов, оно не ограничивается любыми из таких подробностей или вариантов или любым конкретным вариантом, но ограничивается ссылкой на прилагаемую формулу изобретения, таким образом, чтобы обеспечить наиболее широкую возможную интерпретацию такой формулы изобретения с учетом уровня техники, и, таким образом, эффективно охватывать предусмотренные рамки изобретения.

35 [001237] Все публикации, патентные заявки, патенты и другие источники, упомянутые в настоящем документе, включены в полном объеме посредством ссылки. В случае конфликта, будет превалировать настоящий документ, в том числе, определения. Кроме того, заголовки разделов, материалы, методы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

40 (57) Формула изобретения

1. Композиция для продукции целевого полипептида в клетке или ткани млекопитающего, содержащая эффективное количество состава, содержащего модифицированную мРНК, кодирующую целевой полипептид, где по меньшей мере один уридин в модифицированной мРНК заменен 1-метилпсевдоуридином, и где состав представляет собой препарат в виде наночастиц, содержащих катионный липид, фузогенный липид, холестерин и ПЭГ липид,

где композиция способна продуцировать целевой полипептид в клетке или ткани млекопитающего.

2. Композиция по п.1, где композиция имеет фармакологический эффект, который (а) больше, чем фармакологический эффект, связанный с терапевтическим агентом, который, как известно, вызывает указанный фармакологический эффект;

(b) больше, чем фармакологический эффект, вызванный композицией, содержащей свободную модифицированную мРНК, кодирующую целевой полипептид;

(c) больше, чем фармакологический эффект, вызванный композицией, содержащей немодифицированную мРНК, кодирующую целевой полипептид; или

(d) приводит к терапевтически эффективному результату при заболевании, расстройстве, состоянии или инфекции и предпочтительно выбран из группы, состоящей из изменения количества клеток, изменения химических реакций в сыворотке, изменения активности ферментов, повышения уровня гемоглобина и повышения уровня гематокрита.

3. Способ получения целевого полипептида в клетке или ткани млекопитающего *in vitro*, включающий приведение в контакт указанной клетки или ткани млекопитающего с композицией, содержащей солевой буферный состав, содержащий модифицированную мРНК, кодирующую целевой полипептид, где по меньшей мере один уридин в модифицированной мРНК заменен 1-метилпсевдоуридином.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что буферный состав дополнительно содержит кальций в концентрации 1-10 мМ.

5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что модифицированная мРНК содержит очищенный транскрипт IVT.

6. Способ по п.3, отличающийся тем, что модифицированная мРНК содержит очищенный транскрипт IVT.

7. Способ продукции целевого полипептида в клетке или ткани млекопитающего, где указанный способ включает контактирование указанной клетки или ткани млекопитающего с композицией по п.1.

8. Способ по п.7, где

(a) массовое соотношение липида к модифицированной мРНК составляет от 10:1 до 30:1; где предпочтительно средний размер наночастицы для состава в форме наночастицы, содержащей модифицированную мРНК, составляет 60-225 нм, где предпочтительно индекс полидисперсности для состава в форме наночастицы, содержащей модифицированную мРНК, составляет от 0,03 до 0,15, где состав в форме наночастицы, содержащий модифицированную мРНК, имеет молярное соотношение 50:10:38,5:1,5-3,0 (катионный липид:фузогенный липид:холестерин:ПЭГ липид), где ПЭГ липид выбран из ПЭГ-к-ДМПО и ПЭГ-ДМГ и фузогенный липид представляет собой ДСФХ; или

(b) зета потенциал липида составляет от -10 до +10 при pH 7,4.

9. Способ по п.7, где состав дополнительно содержит вторую и, необязательно, третью модифицированную мРНК.

10. Способ по п.7, где композиция содержит катионный липид, выбранный из ДЛин-МС3-ДМА с внутренним эфиром и ДЛин-МС3-ДМА с концевым эфиром.

11. Способ по п. 3 или 7, где модифицированная мРНК содержит по меньшей мере один 5'-концевой кэп, выбранный из группы, состоящей из Cap0, Cap1, ARCA, инозина, N1-метил-гуанозина, 2'-фтор-гуанозина, 7-деаза-гуанозина, 8-оксо-гуанозина, 2-амино-гуанозина, LNA-гуанозина и 2-азидо-гуанозина, где предпочтительно 5'-концевой кэп представляет собой Cap1, и где предпочтительно модифицированная мРНК дополнительно содержит вторую модификацию, причем вторая модификация выбрана из группы, состоящей из: 5-метилцитидина и псевдоуридина.

12. Способ по п.3 или 6, в котором композиция контактирует с указанной клеткой или тканью млекопитающего по меньшей мере два раза в день.

13. Композиция по п.1, в которой массовое соотношение липида к модифицированной мРНК составляет примерно 15:1.

5 14. Композиция по п.1, в которой массовое соотношение липида к модифицированной мРНК составляет примерно 20:1.

10

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> MODERNA THERAPEUTICS
 <120> СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО НУКЛЕОЗИДА,
 НУКЛЕОТИДА И НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ
 <130> M011.20/2030.1011PCT
 <140> PCT/US2012/XXXXXX
 <141> 2012-12-14
 <150> US 61/576,705
 <151> 2011-12-16
 <150> US 61/618,957
 <151> 2012-04-02
 <150> US 61/648,244
 <151> 2012-05-17
 <150> US 61/681,712
 <151> 2012-08-10
 <150> US 61/696,381
 <151> 2012-09-04
 <150> US 61/709,303
 <151> 2012-10-03
 <150> US 61/712,490
 <151> 2012-10-11
 <150> PCT/US2012/058519
 <151> 2012-10-03
 <160> 25
 <170> FastSEQ для Windows версия 4.0
 <210> 1
 <211> 10
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> модифицированное_основание
 <222> (4) ... (4)
 <223> n= A или G
 <400> 1
 ccrncsaugg

10

<210> 2
 <211> 9
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> модифицированное_основание
 <222> (8) ... (8)
 <223> n= U или A

<220>
 <221> модифицированное_основание
 <222> (9)...(9)
 <223> n = U или A

<400> 2
 uuauuuuann

9

<210> 3
 <211> 615
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 atggctggac ctgccaccca gagcccatg aagctgatgg cctgcagct gctgctgtgg 60
 cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc acccccctgg gccctgccag ctcccctgcc 120
 cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa gtgaggaaga tccagggcga tggcgagcg 180
 ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgtc 240
 ggacactctc tgggcatccc ctgggtccc ctgagcagct gcccagcca ggccctgcag 300
 ctggcaggct gcttgagcca actccatagc ggcttttcc tctaccagg gctcctgcag 360
 gcctggaag g gatctcccc cgagtgggt cccaccttg acacactgca gctggagctc 420
 gccgactttg ccaccacat ctggcagcag atggaagaac tgggaatggc cctgcctcg 480
 cagccccccc aggggtgcat gccggccttc gcctctgctt tccagcgccg ggcaggagg 540
 gtctgggttg cctcccactc gcagagcttc ctggaggtgt cgtaccgcgt tctacgccac 600
 cttgccccagc cctga 615

<210> 4
 <211> 800
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
 caccatggct ggacctgcca cccagagccc catgaagetg atggccctgc agctgctgct 120
 gtggcacagt gcactctgga cagtgcagga agccacccc ctgggcccctg ccagctccc 180
 gccccagagc ttctctgctca agtgcttaga gcaagtggag aagatccagg gcgatggcgc 240
 agcgctccag gagaagctgt gtgccaccta caagctgtgc caccocagg agctggtgct 300
 gctcggacac tctctgggca tcccctgggc tcccctgagc agctgccccca gccaggccct 360
 gcagctggca ggctgcttga gccaaactcca tagcggcctt ttctctacc aggggtcct 420
 gcaggcccctg gaagggatct cccccagtt ggggtcccacc ttggacacac tgcagctgga 480
 cgtcgccgac tttgccacca ccatctggca gcagatggaa gaactgggaa tggcccctgc 540
 cctgcagccc acccagggtg ccatgcccgc cttcgctct gctttccagc gccgggcagg 600
 aggggtcctg gctgcctccc atctgcagag cttctctggag gtgtcgtacc gcgttctacg 660
 ccaccttgcc cagccctgaa gcgctgcctt ctgcggggct tgccttctgg ccatgccctt 720
 cttctctccc ttgcacctgt acctcttggc ctttgaataa agcctgagta ggaaggcggc 780
 cgctcgagca tgcacttaga 800

<210> 5
 <211> 800
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
 caccatggcc ggtcccgcga cccaaagccc catgaaactt atggccctgc agttgctgct 120
 ttggcactcg gccctctgga cagtccaaga agcgactcct ctgggacctg cctcatcggt 180
 gccgcagtc ttccttttga agtgctgga gcagggtgca aagattcagg gcgatggagc 240
 cgcactccaa gagaagctct cgcgcacata caaactttgc catcccagg agctcgtact 300
 gctcgggac agcttgggga tcccctgggc tctctctctg tctgtcctg cgaggcttt 360
 gcagttggca ggtgctctt cccagctcca ctccggttg ttctgtatc agggactgct 420
 gcaagccctt gagggaatct cgccagaatt gggcccagc ctggacacgt tgcagctcga 480
 cgtggcgat ttcgcaacaa ccatctggca gcagatggag gaactgggga tggcaccgc 540
 gctgcagccc acgcagggg caatgcccgc ctttgcgtcc gcgtttcagc gcagggcggg 600
 tggagtctc gttagcagcc accttcaatc attttggaa gtctcgtacc ggtgctgag 660

acatcttgcg cagccgtgaa gcgctgcctt ctgcggggct tgccttctgg ccatgccctt 720
 cttctctccc ttgcacctgt acctcttggc ctttgaataa agcctgagta ggaaggcggc 780
 cgctcgagca tgcattctaga 800

<210> 6
 <211> 758
 <212> PHK
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug gccggucccg 60
 cgacccaaa ccccaugaaa cuuauggccc ugcaguugcu gcuuuggcac ucggccucu 120
 ggacagucca agaagcgacu ccucucggac cugccucauc guugccgcag ucauuccuuu 180
 ugaagugucu ggagcaggug cgaaagauuc agggcgauug agccgcacuc caagagaagc 240
 ucugcgcgac auacaaacu ugcacucccg aggagcucgu acugcucggg cacagcuugg 300
 ggauucccug ggcuccucuc ucguccuguc cgucgcaggc uuugcaguug gcagggugcc 360
 uuucccagcu ccacuccggu uuguucuugu aucagggacu gcugcaagcc cuugagggaa 420
 ucucgccaga auugggcccg acgcuggaca cguugcagcu cgacguggcg gauuucgcaa 480
 caaccaucug gcagcagaug gaggaacugg ggauggcacc cgcgcugcag cccacgcagg 540
 gggcaaugcc ggcuuuugcg uccgcuuuc agcgcagggc ggguggaguc cucguagcga 600
 gccaccuua aucuuuuuug gaagucucgu accgggugcu gagacaucu gcgcagccgu 660
 gaagcgcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuuucucucu cccuugcacc 720
 uguaccucu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 758

<210> 7
 <211> 854
 <212> PHK
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug guauccaagg 60
 gggaggagga caacauggcg aucaucaagg aguucaugcg auucaaggug cacauuggaag 120
 guucggucua cggcacacgaa uuugaaucg aaggagaggg ugaagggaag cccuauugaag 180
 ggacacagac cgcgaaacuc aaggucacga aagggggacc acuuccuuuc gccugggaca 240
 uucuuucgcc ccaguuuaug uacgggucca aagcauauug gaagcauucc gccgauauuc 300
 cugacuaucu gaaacucagc uuucccgagg gauucaaugug ggagcggguc augaacuuug 360
 aggcggggg uguagucacc gaaacccaag acucaagccu ccaagacggc gaguucucu 420
 acaaggucua acugcggggg acuaacuuc cgucggauug gccggugaug cagaagaaaa 480
 cgauuggaug ggaagcgua ucggagagga uguaccaga agauuggugca uugaaggggg 540
 agaucagca gagacugaag uuuaaagau ggggacauua ugaugccgag gugaaaacga 600
 cauacaaagc gaaaagccg gucgagcuuc ccggagcgua uaaugugaau aucaaugug 660
 auuuuacuuc acacaauag gacuaacaa uuugcgaaca guacgaaccg gcugagggua 720
 gacacucgac gggaggcaug gacgaguugu acaaaugua agcugccuuc ugcggggcuu 780
 gccuucuggc caugcccuuc uucucuccu ugcaccugua ccucuuuguc uuugaauaaa 840
 gccugaguag gaag 854

<210> 8
 <211> 896
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
 caccatggta tccaaggggg aggaggacaa catggcgatc atcaaggagt tcatgggatt 120
 caaggtgcac atggaaggtt cgtcaacgg acacgaattt gaaatcgaag gagagggtga 180
 aggaaggccc tatgaagggg cacagaccgc gaaactcaag gtcacgaaag ggggaccact 240
 tcctttcgcc tgggacattc tttcgcccca gtttatgtac gggccaaaag catatgtgaa 300
 gcatcccgcc gatattcctg actatctgaa actcagctt cccgagggat tcaagtggga 360
 gcgggtcatg aactttgagg acgggggtgt agtcaccgta acccaagact caagcctcca 420
 agacggcgag ttcattctaca aggtcaaact gcgggggact aactttccgt cggatgggcc 480
 ggtgatgcag aagaaaacga tgggatggga agcgtcatcg gagaggatgt acccagaaga 540
 tgggtgattg aagggggaga tcaagcagag actgaagttg aaagatgggg gacattatga 600
 tgccgaggtg aaaacgacat acaaagcgaa aaagccgggtg cagcttcccg gagcgtataa 660
 tgtgaatadc aagttggata ttacttcaca caatgaggac tacacaattg tcgaacagta 720

cgaacgcgct gagggtagac actcgacggg aggcgatggac gagttgtaca aatgataagc 780
 tgccttctgc ggggcttgcc ttctggccat gcccttcttc tctcccttgc acctgtacct 840
 cttggtcttt gaataaagcc tgagtaggaa ggcggccgct cgagcatgca tctaga 896

<210> 9
 <211> 725
 <212> PHK
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauaauag agccaccaug ggagugcacg 60
 aguguccccgc gugguugugg uugcugcugu cgcucuugag ccucccacug ggacugccug 120
 ugcuggggggc accaccaca uugaucugcg acucacgggu acuugagagg uaccuucuu 180
 aagcacaaga agccgaaaac aucacaaccg gaugcgccga gcacugcucc cucaaugaga 240
 acuuuacugc accggauaca aaggucauuu ucuuugcaug gaagagaauu gaaguaggac 300
 agcaggccgu cgaagugugg caggggcucg cgcuuuuguc ggaggcggug uugcgggguc 360
 aggccuccu cguaacuca ucacagccgu gggagcccu ccaacucau gucgaaaaag 420
 cggugucggg gcuccgcagc uugacgacgu ugcucgggc ucugggcgca caaaggagg 480
 cuuuuucgcc gccugacgag gccuccgagg caccucccg aacgaucacc ggcgacacgu 540
 uuaggaaugu uuuuagagug uacagcauuu uccuccgagg aaagcugaaa uuguaucug 600
 gugaagcgug uaggacaggg gaucgugau aagcugccuu cugcggggcu ugccuucug 660
 ccaugcccu cuucucucc uugcaccugu accucuuugu cuuugaaua agccugagua 720
 ggaag 725

<210> 10
 <211> 1536
 <212> PHK
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauaauag agccaccaau gcagcgcguc 60
 aacaugauua uggccgauc gccgggacuc aucacaauuc gccucuuugg uuaucucuu 120
 ucggcagaau guaccguguu cuuggaucac gaaaacgcga acaaaaauuc uaacgcgccg 180
 aagcgguaa acuccgggaa acuuaggagg uuugugcagg gcaaucuuga acgagagugc 240
 auggaggaga aaugcuccuu ugaggaggcg agggaaugug uugaaaacac agagcgaa 300
 acggaguuuu ggaagcaua cguagauggg gaccagugug agucgaauc gugccucaa 360
 gggggaucuu guaaagauga caucaauagc uaugaaugcu ggugcccguu ugguuuuga 420
 gggagaacu gugagcugga ugugacgugc aacaucaaa agggacgugc ugagcaguuu 480
 uguaagaacu cggcugaca uaagguagua ugcucgugca cagagggauc ccggcugggc 540
 gagaaccaa aaucgucgag gcccgaguc ccguuccuu gguggagggu gagcuguga 600
 cagacuagca aguuagcagc agcggagacu guuuucccg acguggacua cgucaacagc 660
 accgaagccg aaacaauccu cgauaacauc acgcagagca cucaguccu caaugacuuu 720
 acgagggucg uaggugguga ggacgcgaaa cccggucagu ucccucggca ggugguauu 780
 aacggaaaag ucgaugccuu uuguggaggu uccauuguca acgagaagug gauugucaca 840
 gcggcacacu gcguagaaac aggagugaaa aucacgguag uggcgggaga gcauaacau 900
 gaagagacag agcacacgga acaaaagcga aaugucauca gaaucauucc acaccaaac 960
 uuaaacggcg caucaauaa guacaauac gacaucgcac uuuuggagcu ugacgaaccu 1020
 uuggugcuua auucguacgu caccuccuu uguuuugccg acaaaagaga uacaacauc 1080
 uucuuagaau ucggcuccgg guacguaucg ggcuggggca gaguguucca uaagguuga 1140
 uccgcacug uguugcaua ccucagggug cccucgugc aucgagccac uugucugcg 1200
 uccaccaau ucacaauca caacaauaug uucugugcgg gauuccauga agguaggaga 1260
 gauagcugcc agggagacuc aggggucucc cagcugagcg aagucgaggg gacgucuuu 1320
 cugacgggaa uuaucuaug gggagagaa ugugcgauga aggggaaaua uggcaucuc 1380
 acuaaagug cacgguaugu caauuggauc aaggaaaaga cgaaacucac gugaucagc 1440
 agcgcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugccu ucuucucucc cuugcaccug 1500
 uaccucuuug ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1536

<210> 11
 <211> 767
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaaga atataagagc 60

```

caccatggga gtgcacgagt gtccccgctg gttgtggttg ctgctgtcgc tcttgagcct 120
cccactggga ctgcctgtgc tgggggcacc acccagattg atctgcgact cacgggtact 180
tgagaggtac cttcttgaag ccaaagaagc cgaaaacatc acaaccggat gcgccgagca 240
ctgctccctc aatgagaaca ttactgtacc ggatacaaaag gtcaatttct atgcatggaa 300
gagaatggaa gtaggacagc aggccgtcga agtgtggcag gggctcgcgc ttttgtcgga 360
ggcgggtgtg cggggtcagg cctcctcctg caactcatca cagccgtggg agccccctca 420
acttcatgtc gataaagcgg tgtcggggct ccgcagcttg acgacgttgc ttcgggctct 480
ggg'gcacaa aaggaggcta tttcgcgcgc tgacgcggcc tccgcggcac cctccgaaac 540
gatcaccgcg gacacgttta ggaagctttt tagagtgtac agcaatttcc tccgcggaaa 600
gctgaaattg tatactggtg aagcgtgtag gacaggggat cgctgataag ctgccttctg 660
cggggcttgc cttctggcca tgcccttctt ctctcccttg cacctgtacc tcttggctct 720
tgaataaagc ctgagtagga aggcggccgc tgcagcatgc atctaga 767

```

```

<210> 12
<211> 750
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 12
taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggga gtgcacgagt gtccccgctg gttgtggttg ctgctgtcgc tcttgagcct 120
cccactggga ctgcctgtgc tgggggcacc acccagattg atctgcgact cacgggtact 180
tgagaggtac cttcttgaag ccaaagaagc cgaaaacatc acaaccggat gcgccgagca 240
ctgctccctc aatgagaaca ttactgtacc ggatacaaaag gtcaatttct atgcatggaa 300
gagaatggaa gtaggacagc aggccgtcga agtgtggcag gggctcgcgc ttttgtcgga 360
ggcgggtgtg cggggtcagg cctcctcctg caactcatca cagccgtggg agccccctca 420
acttcatgtc gataaagcgg tgtcggggct ccgcagcttg acgacgttgc ttcgggctct 480
ggg'gcacaa aaggaggcta tttcgcgcgc tgacgcggcc tccgcggcac cctccgaaac 540
gatcaccgcg gacacgttta ggaagctttt tagagtgtac agcaatttcc tccgcggaaa 600
gctgaaattg tatactggtg aagcgtgtag gacaggggat cgctgataag ctgccttctg 660
cggggcttgc cttctggcca tgcccttctt ctctcccttg cacctgtacc tcttggctct 720
tgaataaagc ctgagtagga aggcggccgc

```

```

<210> 13
<211> 1578
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 13
taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccaatgca gcgcgtcaac atgattatgg ccgaatcgcc gggactcatc acaatctgcc 120
tcttgggtta tctcttgtcg gcagaatgta ccgtgttctt ggatcacgaa aacgcgaaaca 180
aaattcttaa tcgcccgaag cgggtataact ccgggaaact tgaggagtth gtgcagggca 240
atcttgaacg agagtgcatt gaggagaaat gctccttga ggaggcggag gaagtgtttg 300
aaaacacaga gcgaacaacg gaggtttga agcaatacgt agatggggac cagtgtgagt 360
cgaatccgtg cctcaatggg ggatcatgta aagatgacat caatagctat gaatgctggt 420
gcccgttttg gtttgaaggg aagaactgtg agctggatgt gacgtgcaac atcaaaaacg 480
gacgctgtga gcagttttgt aagaactcgg ctgacaataa ggtagtatgc tctgacacag 540
agggataacc gctggcggag aacaaaaaat cgtgcgagcc cgcagtcctg ttccttctgt 600
ggaggggtgag cgtgtcacag actagcaagt tgacgagagc ggagactgta tccccgacg 660
tggactacgt caacagcacc gaagccgaaa caatcctcga taacatcacg cagagcactc 720
agtccttcaa tgactttacg agggctgtag gtggtgagga cgcgaaacc ggtcagttcc 780
cctggcaggt ggtattgaac ggaagctcg atgccttttg tggaggttcc attgtcaacg 840
agaagtggat tgtcacagcg gcacactcgg tagaaacagg agtgaaaatc acggtagtgg 900
cgggagagca taacattgaa gagacagagc acacggaaca aaagcgaat gtcacagaa 960
tcattccaca ccataactat aacgcggcaa tcaataagta caatcacgac atcgactttt 1020
tggagcttga cgaacctttg gtgcttaatt cgtacgtcac ccctatttgt attgccgaca 1080
aagagtatac aaacatcttc ttgaaattcg gctccgggta cgtatcgggc tggggcagag 1140
tgttccataa gggtagatcc gactggtgtg tgcaatacct caggggtgcc ctctggtgatc 1200
gagccacttg tctcgggtcc accaaattca caatctacaa caatatgttc tgtcggggat 1260
tccatgaagg tgggagagat agctgccagg gagactcagg gggccccac gtgacggaag 1320
tcgaggggac gtcatttctg acgggaatta tctcatgggg agaggaatgt gcgatgaagg 1380
ggaaatattg catctacact aaagtgtcac ggtatgtcaa ttggatcaag gaaaagacga 1440
aactcacgtg atcagccagc gctgccttct cgggggcttg ccttctggcc atgcccttct 1500

```

tctctccctt gcacctgtac ctcttggctt ttgaataaag cctgagtagg aaggcggccg 1560
ctcgagcatg catctaga 1578

<210> 14
<211> 848
<212> PHK
<213> Homo sapiens

<400> 14
aaauaagaga gaaaagaaga guaagaagaa auauaagagc caccauggug agcaagggcg 60
aggaggauaa cauggccauc aucaaggagau ucaugcgcuu caaggugcac auggagggcu 120
ccgugaacga ccacgaguuc gagaucgagg gcgagggcga gggccgcccc uacgagggca 180
cccagaccgc caagcugaag gugaccaagg guggcccccu gcccuucgcc ugggacauc 240
uguccccuca guucauguac ggcuccaagg ccuacgugaa gcaccccgcc gacaucgccg 300
acuacuugaa gcuguccuuc cccgagggcu ucaaguggga gcgcgugaug aacuucgagg 360
acggcggcgu ggugaccgug acccaggacu ccuccugca ggacggcggag uucaucuaca 420
aggugaagcu gcgcgccacc aacuucccu ccgacggccc cguaaugcag aagaagacca 480
ugggcuugga ggccuccucc gagcggauu accccgagga cggcgcccg aagggcgaga 540
ucaagcagag gcugaagcug aaggacggcg gccacuacga cgcugagguc aagaccacu 600
acaaggccaa gaagcccgug cagcugcccg gcgccuacaa cguaacauc aaguuggaca 660
ucaccuccca caacgaggac uacaccaucg uggaacagua cgaacgcgcc gagggccgcc 720
acuccaccgc cggcauggac gagcuguaca agugagcugc cuucugcggg gcuugccuuc 780
uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc uguaccucu uguucuugaa uaaagccuga 840
guaggaaag 848

<210> 15
<211> 1838
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 15
taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggaa gatgcaaga acatcaagaa gggacctgcc ccgttttacc ctttggagga 120
cggtagcaga ggagaacagc tccacaagc gatgaaacgc tacgccttgg tccccggaac 180
gattgcgttt accgatgcac atattgaggt agacatcaca tacgcagaat acttcgaaat 240
gtcggtaggg ctggcggaag cgatgaagag atatggctct aacactaatc accgcatcgt 300
ggtgtgtctc gagaactcat tgcagttttt catgcccgtc cttggagcac ttttcatcgg 360
ggtcgcagtc gcgccagcga acgacatcta caatgagcgg gaactcttga atagcatggg 420
aatctcccag ccgacggctc tgtttgtctc caaaaagggg ctgcagaaaa tcctcaacgt 480
gcagaagaag ctcccatta ttcaaaagat catcattatg gatagcaaga cagattacca 540
agggttccag tcgatgtata cttttgtgac atcgcatttg ccgccagggt ttaacgagta 600
tgactctgtc ccgagtcac ttgacagaga taaaaccatc gcgctgatta tgaattcctc 660
gggtagcacc ggtttgcca aggggggtggc gttgccccac cgcactgctt gtgtgcggtt 720
ctcgcacgct agggatccta tctttggtaa tcagatcatt cccgacacag caatcctgtc 780
cgtggtacct tttcatcacg gttttggcat gttcacgact ctcggctatt tgatttgcg 840
tttcagggtc gtacttatgt atcggttcga ggaagaactg tttttgagat ctttgcaga 900
ttacaagatc cagtcgcccc tccttgtgcc aacgcttttc tcattctttg cgaaatcgac 960
acttattgat aagtatgacc tttccaatct gcatgagatt gcctcagggg gaggccgct 1020
tagcaaggaa gtcggggagg cagtggccaa gcgcttcac cttccccgaa ttcggcaggg 1080
atacgggctc acggagacaa catcccgcat ccttatcacg cccgaggggt acgataagcc 1140
gggagccgtc ggaaaagtgg tccccttctt tgaagccaag gtcgtagacc tcgacacggg 1200
aaaaaccctc ggagtgaacc agaggggcca gctctgctg agagggccga tgatcatgtc 1260
aggttacgtg aataaccctg aagcagcga tgcgctgac gacaaggatg ggtggttga 1320
ttcgggagac atgtcctatt gggatgagga tgagcacttc tttatcgtag atcgaactaa 1380
gagcttgatc aaatacaaa gctatcaggt agcgcctgcc gagctcagat caatcctgct 1440
ccagcaccoc aacattttcg acgcccaggt gcccggttg cccgatgacg acgcccgtga 1500
gctgccagcg gccgtggtag tcctcgaaca tgggaaaaca atgaccgaaa aggagatcgt 1560
ggactacgta gcatcacaag tgacgactgc gaagaaactg aggggagggg tagtctttgt 1620
ggacgaggtc ccgaaaaggt tgactgggaa gcttgacgct cgcgaaatcc gggaaatcct 1680
gattaaggca aagaaaaggc ggaaaatcgc tgtctgataa gctgccttct gcggggcttg 1740
ccttctggcc atgccttct tctctccctt gcacctgtac ctcttggctt ttgaataaag 1800
cctgagtagg aaggcggccg ctcgagcatg catctaga 1838

<210> 16

<211> 1796
 <212> PHK
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug gaagaugcga 60
 agaacaucac gaagggaccu gccccguuuu acccuuugga ggacgguaca gcaggagaac 120
 agcuccacaa ggcgauaгаа cgcuaacgccc uggucccccgg aacgauugcg uuuaccgaug 180
 cacauauuga gguagacauc acauacgcag aaucacuuga aaugucggug aggcuggcgg 240
 aagcgauгаа gagauuggu cuuaacacua aucaccgcau cguugugugu ucggagaacu 300
 cauugcaguu uuucaugcgg guccuuggag cacuuuucu cggggucgca gucgcgccag 360
 cgaacgcau cuacaaugag cgggaacucu ugaauagcau gggaaucucc cagccgacgg 420
 ucguguuugu cuccaaaaag gggcugcaga aaauccucaa cgugcagaag aagcucccca 480
 uuauucacaa gaucaucauu auggauagca agacagaуаа ccaagggуаа cagucgaugu 540
 auaccuuugu gacaucgcau uugccgccag gguuaacga гуагacуаа guccccgagu 600
 cauuugcag agauaaaacc aucgcgcuga uuauгааааа cucggguagc accgguuugc 660
 caaagggggуаа ggcgуагccc caccgcacug cuugugugcg гууссгсac gcuaagggauc 720
 cuaucuuugg uauacgaуас auucccgaca cagcauuccu guccguggua ccuuuуаас 780
 acgguuuugg cauguуасac acucucggcu auuugauuug cgguuуасgg gucguacuua 840
 uguuucgggu cgaggaaгаа cuguuuuuga guccuugca agauuааааг auccagucgg 900
 ccucuuugu gccaacgcuu uucucauucu uugcgaaуас gacacuuauu gauaaguaug 960
 accuuuccaa ucugcaugag auugccucag ggggagcggc gcuuagcaag gaagucgggg 1020
 aggcaguggc caagcgcuuc caccuucccg gaauucggca gggauacggg cucacggaga 1080
 caacaucggc cgauуааас agtcccaggg гуgacгаааа cccgggagcc gucggaaaag 1140
 uggucccuu cuuugaagcc aagguсgуаг accucgacac gggaaaaacc cucggaguga 1200
 accagagggg cgagcucugc гуgagaggggc cгаugacau gucagguuac гуgаааасс 1260
 cugaagcgac gaugcgugc aucgacaagg augggugguu gcauucggga gacauugccu 1320
 auugggага gгаugcgac uucuuuucg uагаucгac uаagagcuug aucaaaуаа 1380
 aaggcuauca gguagcgccu gccgagcugc агucaauccu gcuccagcac cccaacauuu 1440
 ucgacgcccгг агuggcccggg uugcccгаug acgacgcccгг ugagcugcca gcggccgggg 1500
 uagucccga acaugggaaa асаагaccg aaaaggгагау cгuggacuaс гуагсacac 1560
 aagugacgac ugсгаагааа cugagggggгг gggуагсuu uguggacgag guccccгааг 1620
 guugacugg gaagcuugac gcucgcaaaa uccgggaaуас ccugauuaг gcaaaгааг 1680
 gcgggaaaau cgcugucuga uaagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugccu 1740
 ucuucuccc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaааа aagccugagu aggaag 1796

<210> 17
 <211> 902
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaагаа atataagagc 60
 caccatggtg agcaaggggc aggagctgtt caccggggtg gtgccatcc tggtcgagct 120
 ggacggcgac gtaaaccggc acaagtтcag cgtgtcccggc gagggcgagg gcgatgccac 180
 ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg caccaccggc aagctgcccгг tgcctggcc 240
 caccctcgtg accaccctga cctacggcgt gcagtgtctc agccgtacc ccgaccacat 300
 gaagcagcac gacttcttca agtccgccat gcccgaggc tacgtccagg agcgaccat 360
 cttcttcaag gacgacggca actacaagac cgcgcggag gtgaagtтcг agggcgacac 420
 cctgggтаас cгatcgagc tгаaggгсat cгacttcaag gaggacggca acatcctggg 480
 gcacaagctg gagtacaact асаасгсса саагтсtаt atcatggccg асаагсгаа 540
 gaacggcатс ааггггаас tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca cгgtгсagct 600
 cgcgaccac taccagaga acacccccat cggcgacggc cccgtgtgc tgcccгaаа 660
 ccactacctg агсacccagт ccgcccгггг caaagacccc aacgagaagc гсgatcaat 720
 ggtcctgctg gaggтсггга ccgcccгггг gatcactctc ggcattggac agctgtacaa 780
 gtaagctgcc ttctgccccгг cttgcttctt ggccatgccc ttcttctctc cctgtacact 840
 gtacctcttg gtctttgaaт aaagcctgag taggaaggcg gccgtcгггг catgcatcta 900
 ga 902

<210> 18
 <211> 863
 <212> PHK
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauuaag agccaccaug guguccaagg 60
 gugaggaaau guuuaccggg guggugccua uucucgucga acuugacggg gaugugaaug 120
 gacacaaguu uucgguaucg ggagaaggag agggugacgc cacauacgga aagcuuacac 180
 ucaaaaucau cuguaacgacg gggaaacugc ccguaccug gccuacgcuc guaaccacgc 240
 ugacuuaugg agugcagugc uuuagcagau accccgacca uaugaagcag cagcacuuc 300
 ucaagucggc gaugcccagag ggguacgugc aagagaggac cauuuuucuc aaagacgaug 360
 gcauuuacaa aacacgcgca gaagucaagu uugagggcga uacucugguc aaucggaucg 420
 aaaugaaggg aaucgaauc aaagaagaug gaaacaucuu uggccaauag cucgaguaca 480
 acuuaaacuc gcauaauguc uauaucaugg cugacaagca gaaaaacggu aucaaaguca 540
 acuuuaagau ccgacacaau auugaggacg guucggugca gcuugcggac cacuaucaac 600
 agaauacgcc gauuggggau ggucggguc uuuugccgga uaaccauuau cucucaacc 660
 agucagcccu gagcaaagau ccaaaccgaga agagggacca cauggucuuu cucgaaucg 720
 ugacagcggc agggauacacu cugggaauug acgaguugua caagugauaa gcugccuuc 780
 gcggggcuug ccuucuggcc augccuucuu ucucuccuu gcaccuguauc cucuuggucu 840
 uugaauaaag ccugaguagg aag 863

<210> 19
 <211> 716
 <212> PHK
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauuaag agccaccaug aacuuucucu 60
 ugucaugggu gcacuggagc cuugcgcugc ugcuguaucu ucaucacgcu aaguggagcc 120
 aggccgcacc caugcgggag ggugggcgac agaauacca cgaaguaguc aaauucaugg 180
 acguguacca gagucgguau ugccaucgga uugaaacucu uugggauauc uuucaagaau 240
 accccgauga aaucgaguac auuuucaaac cgucgugugu ccucucaug agggcgggg 300
 gaugcugcaa ugaugaaggg uuggagugug uccccacgga ggagucgaau aucacaauagc 360
 aaaucaugcg caucaaaacca caucaggguc agcauuuugg agagaugucc uuucuccagc 420
 acaacaaaug ugaguguaga ccgaagaagg accgagcccg acaggaaaac ccaugcggac 480
 cgugcuccga gcggcgcaaa cacuuguucg uacaagaccc ccagacaugc aagugcucau 540
 guaagaauac cgauucgagg uguaaggcga gacagcugga auugaacgag gcacagugua 600
 ggugcgaca gccaugacgg ugagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugccu 660
 ucuucucucc cuugcaccug uaccucuug ucuuugaaua aagccugagu aggaag 716

<210> 20
 <211> 758
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaaga atataagagc 60
 caccatgaac tttctcttgt catgggtgca ctggagcctt gcgctgctgc tgtatcttca 120
 tcacgctaag tggagccagg ccgacccat ggcggagggt ggcggacaga atcaccacga 180
 agtagtcaaa ttcattggacg tgtaccagag gtcgtattgc catccgattg aaactcttgt 240
 ggatatcttt caagaatacc ccgatgaaat cgagtacatt ttcaaaccgt cgtgtgtccc 300
 tctcatgagg tgcgggggat gctgcaatga tgaagggttg gactgtgtcc ccacggagga 360
 gtcgaatata acaatgcaaa tcatgcgcat caaacacat cagggtcagc atattggaga 420
 gatgtccttt ctccagcaca acaaatgtga gtgtagaccg aagaaggacc gagcccgaca 480
 ggaaaaccca tgcggaccgt gctccgagcg gcgcaaacac ttgttcgtac aagaccccca 540
 gacatgcaag tgctcatgta agaataccga ttcgcggtgt aaggcgagac agctggaatt 600
 gaacgagcgc acgtgtaggt gcgacaagcc tagacggtga gctgccttct gcggggcttg 660
 cttctggcc atgccttct tctctcctt gcacctgtac ctcttggctt ttgaataaag 720
 cctgagtagg aaggcggccg ctcgagcatg catctaga 758

<210> 21
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala
 20 25 30

<210> 22
 <211> 25
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala
 20 25

<210> 23
 <211> 46
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Ser Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg
 35 40 45

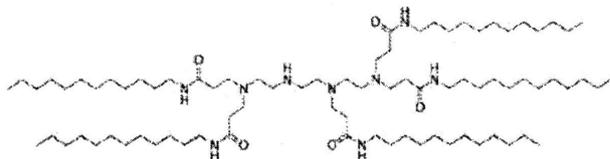
<210> 24
 <211> 21
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Met Lys Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Gln Ser Val Ala Pro
 20

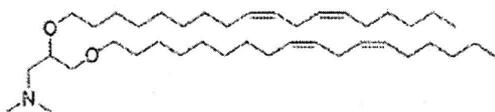
<210> 25
 <211> 24
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
 20

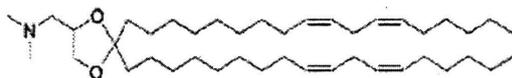
98N12-5 (TETA5-LAP)



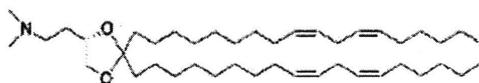
Длин-ДМА



Длин-К-ДМА (2,2-Дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан)



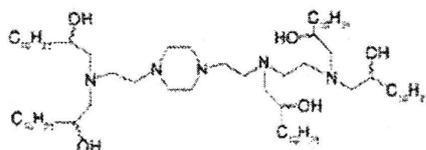
Длин-КС2-ДМА



Длин-МС3-ДМА



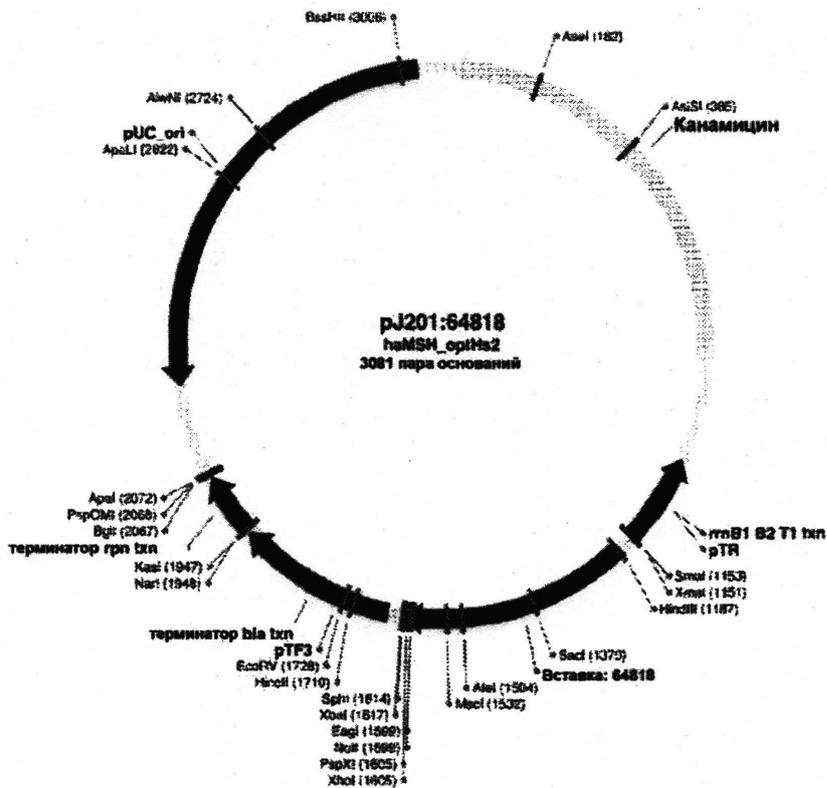
С12-200



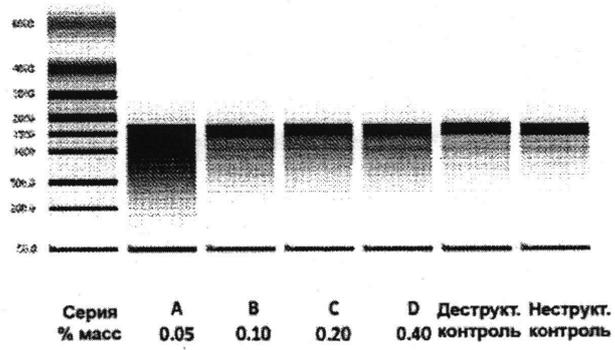
УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

ФИГ. 1

На карте приведены только одинарные отсекатели



ФИГ. 2



ФИГ. 3